

## СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ АУТОФАГИИ И АПОПТОЗА ПРИ ОСТРОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

Луговая А. В.,<sup>1</sup> Эмануэль В.С.,<sup>1</sup> Артемова А.В.,<sup>1</sup> Митрейкин В.Ф.<sup>1</sup>

*ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, e-mail: g89213159748@gmail.com*

В течение последних десятилетий острый ишемический инсульт (ОИИ) является актуальной медицинской и социальной проблемой. Высокая смертность и инвалидизация, сопровождающие ОИИ, диктуют необходимость создания новых алгоритмов профилактики, диагностики и прогноза исхода заболевания. Помочь в этом могут надежные биологические маркеры и высокотехнологичные методы лабораторной диагностики. Результаты новейших исследований свидетельствуют о том, что апоптоз, аутофагия и некроз являются основными механизмами гибели нейронов при ОИИ. Тем не менее до конца не ясно, какой из этих процессов преобладает на конкретном этапе ишемического каскада и в большей степени влияет на исход заболевания. Исследования в области нейроиммунологии позволили установить сигнальные белки, инициирующие как апоптотическую, так и аутофагическую гибель клеток головного мозга при ОИИ. Эти белки действуют либо синергично за счет создания общих модулей, либо альтернативно, в качестве переключателей с одной клеточной программы на другую. По мнению ученых, исследование перекрестных взаимодействий между апоптозом и аутофагией и их отдельными медиаторами в патогенезе ОИИ представляет большой интерес. Сравнительная оценка динамики концентрации биомаркеров аутофагии и апоптоза в периферической крови пациентов с ОИИ в сопоставлении с динамикой тяжести неврологического дефицита и объемом поражения головного мозга поможет глубже понять перекрестные взаимодействия между этими процессами на разных этапах острого периода ишемического инсульта. По мнению ряда авторов, исследование белков, участвующих в индукции аутофагии и апоптоза при ОИИ, будет способствовать не только более глубокому пониманию патогенеза заболевания, но и созданию новых диагностических алгоритмов, разработке специфических биомаркеров, предикторов течения и исхода заболевания.

Ключевые слова: апоптоз, аутофагия, острый ишемический инсульт, биомаркеры аутофагии, биомаркеры апоптоза, вестерн-блоттинг, проточная цитометрия.

## MODERN APPROACHES TO THE ASSESSMENT OF BIOLOGICAL MARKERS OF AUTOPHAGY AND APOPTOSIS IN ACUTE ISCHEMIC STROKE

Lugovaya A.V.,<sup>1</sup> Emanuel V.S.,<sup>1</sup> Artemova A.V.,<sup>1</sup> Mitreikin V.F.<sup>1</sup>

*FGBOU VO «First Saint Petersburg State Medical University named after Academician I.P. Pavlova» Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg, e-mail: g89213159748@gmail.com*

Over the past decades, acute ischemic stroke (AIS) has been an urgent medical and social problem. The high mortality and disability accompanying AIS necessitate the creation of new algorithms for the prevention, diagnosis and prognosis of the outcome of the disease. Reliable biological markers and high-tech laboratory diagnostic methods can help. The results of recent studies indicate that apoptosis, autophagy and necrosis are the main mechanisms of neuronal death in AIS. However, it is not completely clear which of these processes prevails at a particular stage of the ischemic cascade and to a greater extent affects the outcome of the disease. Research in the field of neuroimmunology made it possible to establish signaling proteins that initiate both apoptotic and autophagic death of brain cells in AIS. These proteins act either synergistically by creating common modules, or alternatively, as switches from one cell program to another. According to scientists, the study of cross-interactions between apoptosis and autophagy and their individual mediators in the pathogenesis of AIS is of great interest. A comparative assessment of the dynamics of the concentration of autophagy and apoptosis biomarkers in the peripheral blood of patients with AIS in comparison with the dynamics of the severity of neurological deficit and the volume of brain damage will help to better understand the cross-interactions between these processes at different stages of the acute period of ischemic stroke. According to some authors, the study of proteins involved in the induction of autophagy and apoptosis in acute respiratory infections will contribute not only to a deeper understanding of the pathogenesis of the disease, but also to the creation of new diagnostic algorithms, the development of specific biomarkers, predictors of the course and outcome of the disease.

Keywords: apoptosis, autophagy, acute ischemic stroke, autophagy biomarkers, apoptosis biomarkers, western blotting, flow cytometry.

Заболеваемость инсультом в мире постоянно растет. Европейская ассоциация по борьбе с инсультом (ESO) совместно с Национальной ассоциацией по борьбе с инсультом (НАБИ) указывают на необходимость формирования единой противоинсультной программы, главной задачей которой является разработка новых алгоритмов профилактики и ранней диагностики заболевания с целью сокращения смертности и инвалидизации [1].

В настоящее время особый интерес исследователей вызывает гибель нейронов по механизму апоптоза и аутофагии – программированной клеточной гибели I и II типа, усиление которой отмечается после острой ишемической атаки и приводит к увеличению объема очага поражения паренхимы головного мозга [2, 3]. В экспериментах установлено, что аутофагия, как и апоптоз, активируется в пенумбре [4]. По мнению ряда авторов, выяснение путей, которые лежат в основе патогенетических механизмов, действующих в пенумбре и, как было показано, влияющих на распространение аутоиммунного постишемического воспаления, имеет большой клинический интерес для разработки новых терапевтических стратегий [5]. Считается, что поврежденные апоптозом и аутофагией нейроны в зоне пенумбры можно восстановить, в отличие от нейронов, погибших по механизму некроза, локализующихся в зоне ишемического ядра и не подлежащих регенерации [6, 7]. Кроме того, эффекторные молекулы, участвующие в сигнальных каскадах апоптоза и аутофагии при остром ишемическом инсульте (ОИИ), представляют интерес не только в качестве мишеней для разработки новых методов лечения ОИИ, но и как новые биологические маркеры в диагностике данного заболевания [8, 9].

Большинство результатов по изучению механизмов апоптоза и аутофагии в патогенезе ОИИ получено в экспериментальных моделях церебральной ишемии. Не вызывает сомнений тот факт, что патологические изменения в организме человека носят более глубокий характер и экстраполяция эффектов, выявленных в системе *in vitro* или в экспериментальных моделях ОИИ с использованием животных, на организм человека не всегда правомочна. В связи с актуальностью проблемы и малой освещенностью вопроса, касающегося взаимодействия ключевых медиаторов апоптоза и аутофагии в патогенезе ОИИ, представляется перспективным изучение маркеров апоптоза и аутофагии в периферической крови у больных ОИИ в динамике острого периода заболевания [10].

Цель исследования – провести анализ данных литературы за последние 10 лет, посвященных современным лабораторным методам оценки биологических маркеров аутофагии и апоптоза, представляющим интерес для углубленного понимания патогенеза ОИИ и создания новых методов диагностики ОИИ.

#### **Материал и методы исследования**

При подготовке обзора были проанализированы 350 источников литературы,

полученных из международных и отечественных баз данных: Scopus, Web of Science, Springer, Pubmed и РИНЦ. 45 публикаций были отобраны и включены в настоящий обзор.

## **Результаты исследования и их обсуждение**

### Актуальность исследуемой задачи

По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно от цереброваскулярных заболеваний (ЦВЗ) умирают около 5 млн человек. При этом удельный вес острого ишемического инсульта (ОИИ) среди форм острого нарушения мозгового кровообращения достигает 80–85% [1, 11].

В обновленных клинических рекомендациях по ведению пациентов с ОИИ, разработанных совместно с Национальной ассоциацией по борьбе с инсультом, Всероссийским обществом неврологов, Ассоциацией нейрохирургов России, а также Союзом реабилитологов России, особое внимание уделяется нейропротекции. В текущей редакции выделено важнейшее направление нейропротекции – уменьшение выраженности «отдаленных последствий» ишемии: окислительного стресса, избыточного синтеза NO, дисбаланса цитокинов, а также снижение активности процессов апоптоза, лежащих в основе отсроченной смерти клеток нервной ткани [11].

В РФ в качестве нейропротективной терапии наиболее часто назначаются препараты мексидол (этилметилгидроксипиридина сукцинат, ООО «НПК Фармасофт», РФ) и церебролизин (МНН: нет, РУ: «ЭВЕР Нейро Фарма ГмбХ», Австрия) [11, 12]. В рандомизированном двойном слепом мультицентровом плацебо-контролируемом исследовании, проведенном в Российской Федерации в 2017 г., в параллельных группах оценивались эффективность и безопасность длительной последовательной терапии мексидолом у пациентов с полушарным ОИИ в остром и раннем восстановительном периодах. В исследование были включены 150 человек (62 мужчины и 88 женщин). В группе пациентов, получавших мексидол, были выявлены статистически достоверное снижение тяжести неврологического дефицита, оцениваемого по шкале NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale), достоверное улучшение жизнедеятельности, измеренное по модифицированной шкале Рэнкина, и улучшение качества жизни по сравнению с группой пациентов, получавших плацебо [12]. Следует подчеркнуть, что важнейшим фармакологическим свойством мексидола является ингибирование апоптоза, лежащего в основе отсроченной гибели нейронов [11].

В систематическом обзоре, включающем 221 публикацию, проиндексированную в базах данных Scopus и Pubmed в период с октября 1993 г. по август 2019 г., А. Steliga и соавторы [13] проводят сравнительный анализ известных на сегодняшний день биомаркеров, используемых для диагностики ОИИ. Обсуждая перспективы дальнейшего улучшения

диагностики заболевания, авторы обращают внимание на необходимость разработки лабораторных предикторов отсроченной гибели нейронов, влияющей на исход заболевания. Данное утверждение подчеркивает диагностическую значимость биомаркеров апоптоза и аутофагии – процессов, принимающих непосредственное участие в отсроченной гибели клеток головного мозга.

Таким образом, апоптоз и аутофагия представляют собой перспективные задачи для исследования с целью разработки принципиально новых методов нейропротекции, диагностики и прогноза исхода ОИИ.

#### Ключевые маркеры аутофагии, имеющие патогенетическое значение при ОИИ

Результаты анализа, полученные в ходе структурированного исследования библиографических баз данных последних 10 лет, посвященных роли аутофагии в патогенезе ОИИ, позволили сделать вывод, что в настоящее время наиболее надежными молекулярными биомаркерами аутофагии, определяемыми с помощью методов лабораторной диагностики, являются белки LC3, Beclin-1 и p62. В нескольких новейших литературных источниках, суммирующих результаты последних экспериментальных данных, полученных на клеточных культурах, а также с использованием лабораторных животных, делается вывод, что для получения более достоверных результатов рекомендована одновременная оценка всех трех показателей аутофагии в исследуемом биологическом материале [14, 15].

Белок LC3, являющийся убиквитин-подобным белком (кодируется геном Atg8), представляет собой надежный маркер аутофагии, так как его содержание в исследуемом биологическом материале положительно коррелирует с количеством активных аутофагосом – важнейших компонентов процесса аутофагии [16]. Показано, что синтез LC3 усиливается в процессе аутофагии [17]. Следует подчеркнуть, что белок LC3 существует в растворимой форме (LC3-I) и липидированной форме (LC3-II) [18]. Они также называются «цитоплазматическая и аутофагосомальная формы», так как в процессе аутофагии происходит транслокация цитоплазматического LC3-I в аутофагосому, где он липидируется с переходом в LC3-II форму и изолируется в аутофагосомальной мембране. Для оценки активности процесса аутофагии определяют липидированную форму LC3-II [19]. Установлено, что повышенные концентрации белков LC3-II и Beclin-1 в сыворотке и в спинномозговой жидкости пациентов с острым ИИ связаны с хорошим исходом заболевания [10]. Эти данные свидетельствуют в пользу защитной роли аутофагии при остром ИИ.

Другим маркером аутофагии является белок Beclin-1 (кодируется геном Atg6), играющий ключевую роль в инициации аутофагии [20]. В составе белкового комплекса, включающего серин-треониновую киназу p150, фосфатидилинозитол-3-киназу класса III

(PI3KIII), протеин Atg14L и белки семейства Bcl-2, Beclin-1 участвует в инициации аутофагии [21]. При стимуляции аутофагии Beclin-1 и протеинкиназа PI3KIII образуют агрегаты в области комплекса Гольджи, которые можно верифицировать с помощью метода флуоресцентной микроскопии или вестерн-блоттинга (Western blotting) и рассматривать в качестве маркера ранней аутофагии (фаза инициации) [22]. Beclin-1 необходим для нормального протекания митофагии (митохондриальной аутофагии). В эксперименте установлено, что ингибирование Beclin-1 в нейронах мышей с ОИИ приводит к митохондриальной дисфункции и прогрессированию постишемического нейровоспаления [23, 24].

Белок p62 (nucleorogin) является убиквитин-связывающим каркасным белком, участвующим в регуляции аутофагии и в формировании аутофагосомы [25]. Этот протеин непосредственно взаимодействует с белком LC3 и служит связующим звеном между LC3 и убиквитинированными субстратами [26]. Протеин p62 активно диссоциирует в процессе аутофагии. Таким образом, количественное определение уровня p62 может быть использовано для мониторинга аутофагического процесса [14, 27]. Установлено, что в отличие от белка LC3 содержание p62 в исследуемом биологическом материале обратно коррелирует с интенсивностью аутофагии, поэтому активность процесса аутофагии оценивают по отношению LC3-II/p62 [15, 28]. Скопление p62-позитивных включений, выявляемое иммуноцитохимическим методом, или повышенный уровень p62, детектируемый с помощью вестерн-блоттинга, расцениваются как признак снижения активности аутофагии [18, 29]. В литературе имеются указания на то, что при поверхностной экспрессии белка p62 может происходить его самоагрегация, занижающая показатели активности процесса аутофагии, поэтому рекомендуется определять концентрацию растворимого p62 совместно с оценкой его поверхностной экспрессии [15, 29]. В экспериментальной модели ОИИ показано, что в нейронах мышей содержание p62 повышено [30]. По мнению авторов, повышение p62 носит компенсаторный характер, так как этот белок осуществляет элиминацию поврежденных митохондрий посредством p62-опосредованной митофагии, основными целями которой являются осуществление «контроля качества» митохондрий и поддержание митохондриального гомеостаза [4, 30].

#### Ключевые маркеры апоптоза, имеющие патогенетическое значение при остром ИИ

Критический анализ 250 литературных источников последних 10 лет, посвященных роли ключевых апоптотических белков в патогенезе ОИИ, позволил выделить 56 наиболее релевантных исследований, 47 из которых свидетельствовали о двойственной роли белков p53 и Bcl-2 в гибели клеток головного мозга при ОИИ, в то время как 9 публикаций указывали на прямое участие этих белков в апоптотической гибели нейронов. Эти 9 работ

были отобраны и включены в настоящий обзор.

В большинстве исследований последних 8 лет белок p53 рассматривается как один из основных проапоптотических факторов, участвующих в индукции программированной смерти клеток головного мозга при ОИИ [31, 32]. Это объясняется тем, что p53 способен индуцировать не только апоптоз, но и аутофагию [33, 34]. Показано, что ядерный p53 индуцирует аутофагию [3, 32]. Однако цитоплазматический p53 может выступать в качестве основного супрессора аутофагии в случае своей транслокации в митохондрии и связывания с антиапоптотическими членами семейства Bcl-2 (или при инактивации проапоптотических белков семейства Bcl-2). Таким образом, p53 регулирует баланс между апоптозом и аутофагией, а также контролирует выживание и гибель клеток в ответ на стресс [34].

Новейшие исследования выявили статистически достоверное повышение концентрации p53 в сыворотке пациентов с ОИИ на 1-е, 2-е и 3-и сутки после ишемической атаки по сравнению с пациентами с хронической ишемией головного мозга (группа сравнения) [31].

Семейство Bcl-2 включает как противоапоптотические белки Bcl-2 и Bcl-xL, так и проапоптотические белки Bax, Bim, Bik и Bak [33, 34]. Эти белки являются регуляторами митохондриального пути запуска апоптоза [35], играющего ключевую роль в гибели нейронов при церебральной ишемии [16, 31]. Установлено, что избыток противоапоптотических белков семейства Bcl-2 защищает ткань мозга от ишемии [30].

Экспериментальные исследования на лабораторных животных показали, что объем ишемического поражения головного мозга может быть уменьшен при введении таурина, способствующего активации противоапоптотических белков семейства Bcl-2, которые ингибируют митохондриально-опосредованный апоптоз нейронов за счет подавления цитозольного цитохрома С и поддержания активности противоапоптотического белка Bcl-xL [4, 30]. Отношение Bax/Bcl-2 регулирует баланс между процессами индукции и ингибирования апоптоза, предотвращая падение мембранного потенциала митохондрий через блокирование экспрессии кальпаина и активной каспазы-3 [3].

#### Современные подходы к верификации биологических маркеров аутофагии с помощью методов лабораторной диагностики

В систематическом обзоре, включающем 86 литературных источников, опубликованных в период с 1997 по 2010 гг., посвященном анализу лабораторных методов оценки аутофагии в клеточных культурах, тканевых биоптатах и периферической крови экспериментальных животных, N. Mizushima и соавторы [14] приходят к выводу, что среди современных лабораторных методов единого «золотого стандарта» для мониторинга активности процесса аутофагии не существует. Считается необходимым параллельное использование нескольких различных методов для точной оценки аутофагической

активности в любом биологическом материале [15, 18, 23].

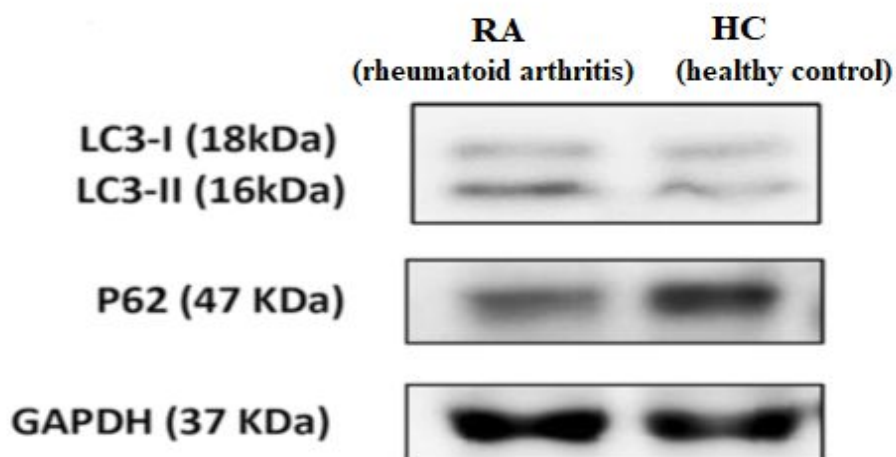
Оценка аутофагии с помощью лабораторных методов включает определение количества активных аутофагосом, мониторинг всех стадий аутофагии, а также измерение активности аутофагического процесса, осуществляемое с использованием индукторов и ингибиторов аутофагии [14, 15].

Для определения количества аутофагосом в клетке оценивают содержание липидированной формы белка LC3 (LC3-II), так как LC3-II является маркером активных аутофагосом [28]. Для определения LC3-II применяют моноклональные антитела, тандемные флуорохромы и используют следующие методы лабораторной диагностики: электронную микроскопию, флуоресцентную микроскопию, вестерн-блоттинг, проточную цитометрию [14].

Электронная микроскопия дает возможность визуализировать аутофагосомы и аутофаголизосомы, образующиеся на этапе слияния аутофагосом с лизосомами. На ультраструктурном уровне аутофаголизосома определяется в виде двухчленной структуры, содержащей непереваренные фрагменты цитоплазмы, которые не слились с лизосомой [18, 36]. Аутофагосомы также могут содержать включения в виде внутриклеточных органелл, например поврежденные митохондрии или фрагменты эндоплазматического ретикулума, выявляемые при электронной микроскопии [14, 22].

Флуоресцентная микроскопия позволяет визуализировать LC3-I, конъюгированный с флуоресцентным красителем GFP (green fluorescent protein), выявляемый по характерному диффузному зеленому свечению в цитоплазме или в виде пунктатных структур, которые в основном представляют собой активные аутофагосомы [22].

Метод вестерн-блоттинга (Western blotting) позволяет осуществлять мониторинг преобразования растворимой формы белка LC3-I, конъюгированного с GFP, в липидированную форму LC3-II [36, 37]. С помощью моноклональных антител (МКАТ) к LC3-I, к LC3-II и флуорохрому GFP можно выявить превращение комплекса GFP-LC3-I в комплекс GFP-LC3-II [37]. Данный метод позволяет оценивать уровень экспрессии и других маркеров аутофагии: Beclin-1 и p62 [16, 19]. Проспективное исследование, включавшее 72 пациента с ревматоидным артритом и 20 доноров (контрольная группа), проведенное в 2018 г. Y. Chen и соавторами [28], выявило статистически достоверное повышение экспрессии LC3-I и LC3-II ( $p < 0,05$  и  $p < 0,01$  соответственно) и статически значимое снижение экспрессии p62 ( $p < 0,001$ ) в мононуклеарах периферической крови (ПК) больных ревматоидным артритом по сравнению с группой контроля (рис. 1).



*Рис. 1. Пример экспрессии белков LC3-I, LC3-II и p62 в мононуклеарах периферической крови у пациента с ревматоидным артритом (RA – rheumatoid arthritis) и донора (HC – healthy control), определяемой методом вестерн-блоттинга. Уровень экспрессии LC3-I, LC3-II и p62 оценивался относительно уровня экспрессии GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, используемой в качестве положительного контроля (Chen Y. et al., 2018 [28])*

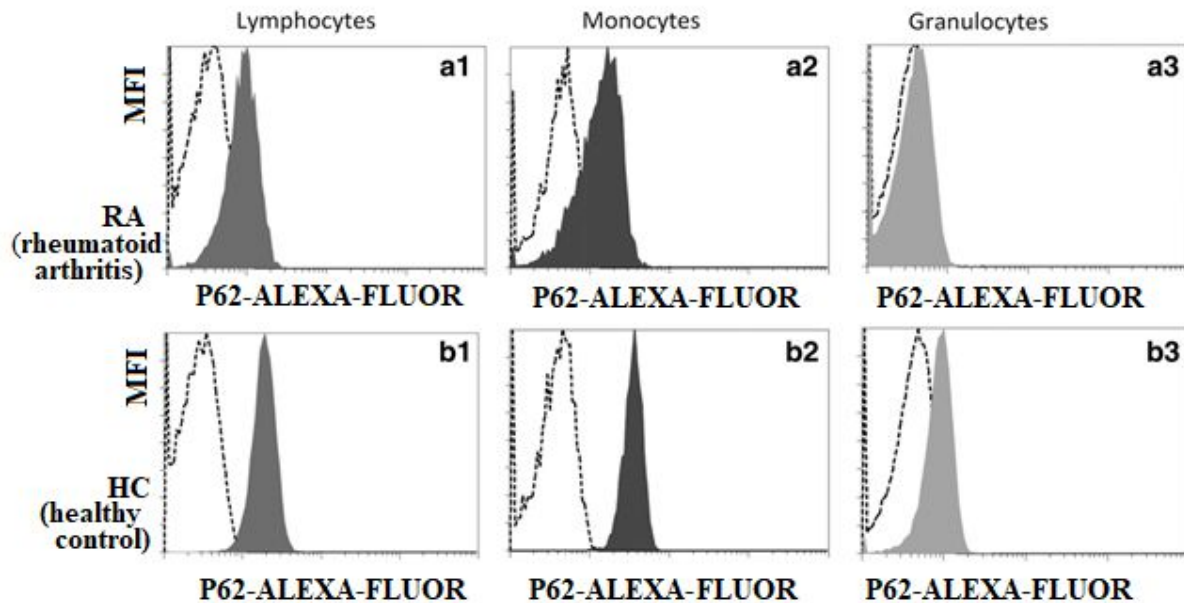
Мониторинг процесса аутофагии включает анализ конверсии LC3-I в липидированную форму (LC3-II), оценку диссоциации липидированного LC3-II с помощью тандемных красителей (анализ расщепления комплекса GFP-LC3-II) и мониторинг доставки белкового комплекса mRFP-GFP-LC3-II (LC3, конъюгированный с GFP и красным флуорохромом RFP – red fluorescent protein) в лизосому [14, 22].

Измерение активности аутофагического процесса проводится только с использованием тщательно подобранных концентраций индукторов и ингибиторов аутофагии, определяемых в результате серии предварительных экспериментов для установления оптимальных доз используемых препаратов [15]. Результаты регистрируют с помощью метода проточной цитометрии [38, 39].

Для оценки биологических маркеров аутофагии в различных популяциях клеток ПК проводится тщательная подготовка образцов крови, используются реагенты для фиксации и пермеабиллизации мембраны клеток, специальные катионные амфифильные индикаторные красители, конъюгированные с флуорохромами, которые специфически распознают аутофагосомы и делают возможной их визуализацию с помощью проточной цитометрии [40]. Например, для количественного определения аутофагосом в циркулирующих клетках ПК применяют индикаторный краситель с коммерческим названием «Cyto-ID» [28, 38]. Исследуемую популяцию клеток окрашивают МКАТ, конъюгированными с флуорохромами,



к основным маркерам аутофагии (LC3, Beclin-1, p62) и визуализируют с помощью проточной цитометрии [40, 41]. Полученные данные оценивают по средней интенсивности флуоресценции (MFI – mean fluorescence intensity) красителя «Cyto-ID» или флуорохрома, конъюгированного с МКАТ [38, 40]. В проспективном исследовании, проведенном Y. Chen и соавторами [28], было выявлено статистически достоверное снижение экспрессии p62 ( $p < 0,05$ ) в клетках ПК больных ревматоидным артритом по сравнению с группой контроля (рис. 2).



*Рис. 2. Цитометрические гистограммы уровня экспрессии белка p62 в популяции лимфоцитов (a1 и b1), моноцитов (a2 и b2) и гранулоцитов (a3 и b3) периферической крови пациента с ревматоидным артритом (RA – rheumatoid arthritis) и донора (HC – healthy control). MFI – средняя интенсивность флуоресценции. На гистограмме клетки, экспрессирующие p62, представлены в виде окрашенных пиков серого и темно-серого цвета, демонстрирующих интенсивную флуоресценцию красителя Alexa-Fluor по сравнению с p62-«негативными» клетками, представленными неокрашенными пиками на гистограммах (Chen Y. et al., 2018 [28])*

Согласно проанализированным данным литературы в настоящий момент не существует единого унифицированного метода для исследования биомаркеров аутофагии в клетках ПК с помощью конкретных методов лабораторной диагностики [15]. Новейшие литературные источники содержат рекомендации по усовершенствованию методов исследования аутофагии в ПК [15, 22]. В соответствии с этими рекомендациями при проведении пермеабиллизации мембраны клеток для предотвращения преждевременной лизосомальной деградации необходимо использовать унифицированные ингибиторы аутофагии

(Бафиломицин А1, хлорохин дифосфат, фолимицин). Для блокирования конечной точки лизосомальной деградации применяется ингибитор аутофагии 3-метиладенин [14]. Для оценки активности процесса аутофагии рекомендовано исследовать экспрессию маркеров аутофагии в клетках ПК методом проточной цитометрии с использованием тандемных флуорохромных красителей. В дополнение к измерению экспрессии белка LC3 рекомендуется определять уровень экспрессии белков p62 или Beclin-1 [15, 25].

#### Современные подходы к верификации биологических маркеров апоптоза с помощью методов лабораторной диагностики

В критическом обзоре, посвященном анализу современных методов изучения показателей апоптоза в различном биологическом материале, G. Banfalvi [42] приходит к выводу, что «золотым стандартом» среди лабораторных методов по-прежнему остаются исследования раннего и позднего спонтанного и индуцированного апоптоза с помощью определения количества аннексинV<sup>+</sup>-клеток (аннексин-«позитивные» клетки) и оценки поверхностной экспрессии активной формы эффекторной каспазы-3, осуществляемой методом проточной цитометрии. Однако Z. Xu и соавторы [43] в своем систематическом обзоре, включающем 93 источника литературы, суммируют результаты исследований оптической визуализации апоптоза последних 20 лет и приходят к выводу, что визуализационная проточная цитометрия имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами оценки апоптоза. Недостатком метода является высокая стоимость прибора и реагентов.

Установлено, что снижение мембранного потенциала митохондрий ( $\Delta\Psi_m$ ) служит одним из самых ранних признаков апоптоза, так как оно предшествует транслокации фосфатидилсерина на наружную поверхность мембраны клеток и фрагментации ДНК [34], в связи с чем оценка данного показателя не менее востребована, чем определение количества аннексин-V<sup>+</sup>-клеток. Среди методов, позволяющих определять изменение  $\Delta\Psi_m$ , используются флуоресцентная микроскопия или проточная цитометрия с применением таких флуорохромов, как JC-1, CM-x-ROS, DiOC6(3), нонилакридин оранжевый (NAO), сафранин O, родамин-123 (Rh123) [44]. Приведенные выше флуорохромы представляют собой мембранопроницаемые липофильные катионы, обладающие способностью накапливаться в живых клетках и органеллах, обнаруживающих отрицательный мембранный заряд с внутренней стороны мембраны. После накопления в клетках катионные красители проявляют оптическую и флуоресцентную активность, что способствует их широкому применению для оценки состояния  $\Delta\Psi_m$  [42]. При снижении  $\Delta\Psi_m$  наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции этих красителей, что позволяет отличить живые неповрежденные клетки от клеток, в которых произошел запуск апоптоза [44].

Новейшие источники литературы свидетельствуют о том, что растворимые маркеры апоптоза, наиболее востребованными из которых в диагностике ОИИ являются белки-антагонисты Bcl-2 и p53, определяются методом иммуноферментного анализа ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) [31, 45] или вестерн-блоттинга [16].

### **Заключение**

Таким образом, проведенный анализ литературы показывает, что биологические маркеры апоптоза и аутофагии, представляющие диагностическую ценность при ОИИ, могут быть определены в периферической крови пациентов с помощью современных высокотехнологичных методов лабораторной диагностики. Согласно результатам последних научных исследований перспективным направлением в современной инсультологии является сравнительная оценка динамики концентрации показателей апоптоза и аутофагии в периферической крови пациентов в остром периоде ишемического инсульта в сопоставлении с динамикой тяжести неврологического дефицита по шкале NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale – шкала инсульта Национального института здоровья) и объемом очага поражения головного мозга по результатам магнитно-резонансной томографии. Возможно, одновременная оценка показателей апоптоза и аутофагии сразу после начала заболевания и в динамике острого периода инсульта поможет созданию новых алгоритмов диагностики, прогноза течения и исхода заболевания.

### **Список литературы**

1. Инсульт. Современные подходы диагностики, лечения и профилактики: методические рекомендации / Под ред. Д.Р. Хасановой, В.И. Данилова. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР–Медиа, 2019. 352 с.
2. Александров В.Н., Камилова Т.А., Мартынов Б.В., Калюжная Л.И. Клеточная терапия при ишемическом инсульте // Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2013. № 3. С. 199-205.
3. Гомазков О.А. Старение мозга и нейротрофическая терапия. М.: ИКАР, 2011. 92 с.
4. Tang Y.C., Tian H.X., Yi T., Chen H.B. The critical roles of mitophagy in cerebral ischemia. *Protein Cell*. 2016. vol. 7. no. 10. P. 699–713.
5. Matthew R.B., White P., Cowley P., Werring D.J. Revolution in acute ischemic stroke care: a practical guide to mechanical thrombectomy. *Pract. Neurol*. 2017. vol. 17. no. 4. P. 252-265.
6. Carmichael S.T. Targets for neural repair therapies after stroke. *Stroke*. 2010. vol. 41. no. 10. P. 124-126.
7. Hu C., Zhao L., Wu D., Li L. Modulating autophagy in mesenchymal stem cells effectively

protects against hypoxia- or ischemia-induced injury. *Stem Cell Res. Ther.* 2019. vol. 10. no. 1. Article 120. DOI: 10.1186/s13287-019-1225-x.

8. Константинова Е.В., Кочетов А.Г., Шостак Н.А., Шурдумова М.Х., Еремин И.И., Лянг О.В., Скворцова В.И. Особенности иммунного ответа и воспалительной реакции при атеротромботическом инсульте и инфаркте миокарда // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2015. Т. 115. № 12. С. 48-53.

9. Стаховская Л.В., Тютюмова Е.А., Федин А.И. Современные подходы к нейропротективной терапии ишемического инсульта // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2017. Т. 117. № 8. С. 75-80.

10. 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. no. 361. Article 359. DOI: 10.1186/s12967-015-0726-3.

11. А.И. Федин, К.Р. Бадалян. Обзор клинических рекомендаций лечения и профилактики ишемического инсульта // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2019. Т. 119. № 8. С. 91-96.

12. Стаховская Л.В., Шамалов Н.А., Хасанова Д.Р., Мельникова Е.В., Агафьина А.С., Голиков К.В., Богданов Э.И., Якупова А.А., Рошковская Л.В., Лукиных Л.В., Локштанова Т.М., Повереннова И.Е., Щепанкевич Л.А. Результаты рандомизированного двойного слепого мультицентрового плацебо-контролируемого в параллельных группах исследования эффективности и безопасности мексидола при длительной последовательной терапии у пациентов в остром и раннем восстановительном периодах полушарного ишемического инсульта (ЭПИКА) // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуск «Инсульт».* 2017. Т. 117. № 3. С. 55-65.

13. Steliga A., Kowiański P., Czuba E., Waśkow M., Moryś J., Lietzau G. Neurovascular Unit as a Source of Ischemic Stroke Biomarkers—Limitations of Experimental Studies and Perspectives for Clinical Application. *Translational Stroke Research.* 2020. vol. 11. P. 553–579. DOI: 10.1007/s12975-019-00744-5

14. Mizushima N., Yoshimori T., Levine B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell.* 2010. vol. 140. no. 3. P. 313–326.

15. Jungverdorben J., Till A., Brüstle O. Induced pluripotent stem cell-based modeling of neurodegenerative diseases: a focus on autophagy. *J. Mol. Med.* 2017. vol. 95. no. 7. P. 705–718.

16. Zhang W. and Meng A. MicroRNA• 124 expression in the brains of rats during early cerebral ischemia and reperfusion injury is associated with cell apoptosis involving STAT3. *Exp. Ther. Med.* 2019. vol. 17. no. 4. P. 2870–2876.

17. Lee Y.K., Lee J.A. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and

compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Reporst*. 2016. vol. 49. no. 8. P. 424-430.

18. Pierzynowska K., Gaffke L., Cyske Z., Puchalski M., Rintz E., Bartkowski M., Osiadły M., Pierzynowski M., Mantej J., Piotrowska E., Węgrzyn G. Autophagy stimulation as a promising approach in treatment of neurodegenerative diseases. *Metabolic Brain Disease*. 2018. vol. 33. P. 989–1008. DOI: 10.1007/s11011-018-0214-6.

19. Minassian B.A., Kalimo H. Autophagy in neuropathology. *Acta Neuropathologica*. 2015. vol.129. no. 3. P. 333–335. DOI: 10.1007/s00401-015-1396-1.

20. Lu N., Li X., Tan R., An J., Cai Z., Hu X., Wang F., Wang H., Lu C., Lu H. HIF-1 $\alpha$ /Beclin-1-Mediated Autophagy Is Involved in Neuroprotection Induced by Hypoxic Preconditioning. *J. Mol. Neurosci*. 2018. vol. 66. no. 2. P. 238–250. DOI: 10.1007/s12031-018-1162-7.

21. Caberlotto L., Nguyen T.P. A systems biology investigation of neurodegenerative dementia reveals a pivotal role of autophagy. *BMC Systems Biology*. 2014. vol. 8. Article 65. DOI: 10.1186/1752-0509-8-65.

22. Klionsky D.J., Abdalla F.C., Abeliovich H., Abaraham R.T., Acevedo–Arozea A., Adeli K., Agholme L., Agnello M., Agostinis P., Aguirre–Ghiso J.A., Ahn J.A., Ait–Mohamed O., Ait–Si–Ali S., Akematsu T., Akira S., Al–Younes H.M., Al–Zeer M.A. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012. vol. 8. no. 4. P. 445–544.

23. Deretic V. Multiple regulatory and effector roles of autophagy in immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2009. vol. 21. no. 1. P. 53–62.

24. Gong Z., Pan J., Shen Q., Li M. and Peng Y. Mitochondrial dysfunction induces NLRP3 inflammasome activation during cerebral ischemia/reperfusion injury. *Journal of Neuroinflammation*. 2018. vol. 15. no. 1. Article 242. DOI: 10.1186/s12974-018-1282-6.

25. 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.

26. Parzych K.R., Klionsky D.J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid. Redox. Signal*. 2014. vol. 20. no. 3. P. 460–473.

27. Rui Y.N., Le W. Selective role of autophagy in neuronal function and neurodegenerative diseases. *Neuroscience Bulletin*. 2015. vol. 31. no. 4. P. 379–381.

28. Chen Y., Chang C., Chen H., Hsieh C.W., Tang K.T., Yang M.C., Lan J.L., Chen D.Y. Association between autophagy and inflammation in patients with rheumatoid arthritis receiving biologic therapy. *Arthritis Res. Ther*. 2018. vol. 20. Article 268. DOI: 10.1186/s13075-018-1763-0.

29. Fu D., Yu J.Y., Yang S., Wu M., Hammad S.M., Connel A. R., Du M., Chen J., Lyons T.J. Survival or death: a dual role for autophagy in stress-induce pericyte loss in diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 2016. vol. 59. no. 10. P. 2251–2261.

30. Guan R., Zou W., Dai X., Yu X., Liu H., Chen O., Teng W. Mitophagy, a potential therapeutic target for stroke. *J. Biomed. Sci.* 2018. vol. 25. no. 1. Article 87. DOI: 10.1186/s12929-018-0487-4.
31. Ключник Т.П., Отман И.Н., Чуканова А.С., Надарейшвили Г.Г., Гулиева М.Ш., Гусев Е.И. Динамика маркеров апоптоза в остром периоде ишемического инсульта // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. 2018. Т. 118. № 9. С. 26-31.
32. Vaseva A.V., Marchenko N.D., Ji K., Stella E., Tsirka S.E., Holzmann S., Moll U.M. P53 Opens the Mitochondrial Permeability Transition Pore to Trigger Necrosis. *Cell.* 2012. vol. 149. no. 7. P. 1536–1548.
33. Goodall M.L., Fitzwalter B.E., Zahedi S., Wu M., Rodriguez D., Mulcahy-Levy J.M., Green D.R., Morgan M., Scott D., Cramer S.D., Thorburn A. The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis. *Developmental Cell.* 2016. vol. 37. no. 4. P. 337–349. DOI: 10.1016/j.devcel.2016.04.018.
34. Nikolettou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2013. vol. 1833. no. 12. P. 3448-3459. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.001.
35. Луговая А.В., Калинина Н.М., Митрейкин В.Ф., Эмануэль Ю.В., Ковальчук Ю.П., Артемова А.В., Эмануэль В.С., Мусихина Ю.В., Эмануэль В.Л. Оценка эффективности Fas-опосредованного апоптоза лимфоцитов периферической крови у больных сахарным диабетом 1 типа // Медицинский алфавит. 2019. Т. 3. № 22. С. 26-31.
36. Taylor M.A., Das B.C., Ray S.K. Targeting autophagy for combating chemoresistance and radioresistance in glioblastoma. *Apoptosis.* 2018. vol. 23. no. 11-12. P. 563–575.
37. Zhang Z., Zhang S., Wang Y., Yang M., Zhang N., Jin Z., Ding L., Jiang W., Yang J., Sun Z., Qiu C., Hu T. Apoptosis. Autophagy inhibits high glucose induced cardiac microvascular endothelial cells apoptosis by mTOR signal pathway. 2017. vol. 22. no. 12. P. 1510–1523.
38. Clarke A.J., Ellinghaus U., Cortini A., Stranks A., Simon A.K. Botto M., Vyse T.J. Autophagy is activated in systemic lupus erythematosus and required for plasmablast development. *Ann. Rheum. Dis.* 2015. vol. 74. no. 5. P. 912–920.
39. Eng K.E., Panas M.D., Hedestam G.K. and McInerney G.M. A novel quantitative flow cytometry-based assay for autophagy. *Autophagy.* 2010. vol. 6. no. 5. P. 634-641.
40. Hundeshagen P., Hamacher-Brady A., Eils R., Brady N.R. Concurrent detection of autolysosome formation and lysosomal degradation by flow cytometry in a high-content screen for inducers of autophagy. *BMC Biol.* 2011. vol. 9. no 1. P. 38-52.
41. Kaminsky V., Abdi A., Zhivotovsky B. A quantitative assay for the monitoring of autophagosome accumulation in different phases of the cell cycle. *Autophagy.* 2011. vol. 7. no. 1.

P. 83-90.

42. Banfalvi G. Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis*. 2017. vol. 22. no. 2. P. 306–323.
43. Xu Z., Song Y., Wang, F. Rational design of genetically encoded reporter genes for optical imaging of apoptosis. *Apoptosis*. 2020. vol. 23. no. 7-8. P. 459-473.
44. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018. 720 с.
45. Battaglini D., Robba C., Lopes da Silva A., Santos Samary C., Silva P.L., Pizzo F.D., Pelosi P., Macedo Rocco P.R. Brain–heart interaction after acute ischemic stroke. *Critical Care*. 2020. vol. 24. Article 163. DOI: 10.1186/s13054-020-02885-8.