

УДК 616.831-005.1-005.4-036-008.853-078

DOI: <https://doi.org/10.22141/2224-0713.21.8.2025.1225>Лебединець П.В.¹, Товажнянська О.Л.^{1,2}, Наконечна О.А.¹¹Харківський національний медичний університет, м. Харків, Україна²ДУ «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України», м. Київ, Україна

Життєздатність та види клітинної загибелі лейкоцитів у пацієнтів з гострим ішемічним інсультом залежно від тяжкості захворювання

Резюме. Актуальність. На сьогодні інсульт залишається другою за поширеністю причиною смертності у світі, поширеність саме цього захворювання швидко зростає серед молодого працездатного населення. Гострий ішемічний інсульт становить більш ніж 80 % усіх випадків інсульту, має високий рівень смертності та призводить до інвалідизації пацієнтів. Основними патологічними процесами, що супроводжують ішемічний інсульт, є оксидативний стрес, ексайтотоксичність, розвиток запального процесу тощо. Актуальним питанням є вивчення видів клітинної загибелі, зокрема апоптозу, некрозу клітин організму за умов впливу активних форм кисню та нітрогену при гострому ішемічному інсульті.

Мета: визначити відсоток життєздатних, ранньо-, пізньоапоптотичних та некротичних лейкоцитів у периферичній крові пацієнтів з гострим ішемічним інсультом (ГІІ) залежно від тяжкості захворювання за шкалою NIHSS. **Матеріали та методи.** Пацієнти з гострим ішемічним інсультом були розподілені на три групи залежно від тяжкості захворювання за шкалою NIHSS. До першої групи увійшли 30 пацієнтів із балами від 1 до 5, до другої групи — 32 пацієнти з балами від 6 до 13, до третьої групи — 23 пацієнти із тяжкістю захворювання, оціненою від 14 до 20 балів. Досліджували цільну венозну кров, яку брали протягом 4,5 години після початку захворювання в стаціонарних умовах. За протоколом готували суспензію лейкоцитів. Відсоток життєздатних, ранньо-, пізньоапоптотичних та некротичних лейкоцитів у периферичній крові пацієнтів з ГІІ визначали методом проточної цитофлюорометрії на проточному цитометрі BD FACSCanto™ II. **Результати.** У хворих з гострим ішемічним інсультом спостерігається зниження відсотка життєздатних лейкоцитів залежно від тяжкості захворювання за шкалою NIHSS порівняно з показниками у здорових осіб. Відсоток ранньо- та пізньоапоптотичних лейкоцитів поступово збільшувався залежно від тяжкості захворювання. Відсоток некротичних клітин у пацієнтів, що увійшли до групи I, статистично не змінювався. У крові пацієнтів, що увійшли до груп II та III, спостерігали збільшення відсотка в 3,77 та 8,14 рази порівняно з відповідними показниками у здорових осіб. **Висновки.** У пацієнтів з гострим ішемічним інсультом спостерігається зниження відсотка життєздатних клітин на тлі підвищення відсотка ранньо-, пізньоапоптотичних та некротичних лейкоцитів, виявлена кореляція показників з тяжкістю захворювання. На нашу думку, активація процесів клітинної загибелі лейкоцитів крові відбувається за умов підвищеної генерації активних форм кисню з залученням АФК-залежних механізмів.

Ключові слова: життєздатність; апоптоз; некроз лейкоцитів; гострий ішемічний інсульт; шкала NIHSS; проточна цитофлюорометрія

Вступ

Однією з провідних причин інвалідизації та смертності працездатного населення у світі залишається гостре порушення мозкового кровообігу, зокрема ішемічний інсульт [1, 2]. За даними ВООЗ, кожного року спостерігається понад 12 млн нових випадків інсульту, серед яких більш ніж 80 % становить ішемічний [3]. На сьогодні визначається значний прогрес у діагностиці, лікуванні та профілактиці гострого ішемічного інсульту (ГІІ), однак наслідки хвороби залишаються незадовільними. Проведений огляд сучасної наукової літератури свідчить, що залишається багато невирішених питань щодо вивчення етіопатогенетичних механізмів ішемічного інсульту та пошуку патогенетичної терапії [4, 5].

На сучасному рівні розвитку науки визначені основні патофізіологічні механізми розвитку цього патологічного стану: гіперперфузія головного мозку, розвиток оксидативного стресу, запальні процеси, активація процесів запрограмованої клітинної загибелі [6, 7]. Формування активних форм кисню та нітрогену на тлі зниження компонентів антиоксидантної системи в організмі пацієнтів з гострим ішемічним інсультом може свідчити про наявність оксидативного стресу та обумовлювати клітинну загибель, порушення перебігу біохімічних процесів у головному мозку за умов неналежного функціонування нейромедіаторів [8]. З огляду на те, що в механізмах розвитку гострого ішемічного інсульту відбувається запальний процес, у якому вирішальну роль відіграють лейкоцити, необхідно було визначити життєздатність та інтенсивність процесів клітинної загибелі лейкоцитів периферичної крові пацієнтів залежно від тяжкості захворювання за шкалою NIHSS. Відомо, що до основних видів загибелі клітин належать апоптоз, анойкіс, партанатос, нетоз, фероптоз, некроз, піроптоз, ериптоз, некроптоз, автофагія, що супроводжуються макроскопічними, морфологічними та біохімічними змінами [9, 10]. Загибель клітин необхідна для здійснення диференціації клітин, підтримки гомеостазу. Через вплив активних форм кисню (АФК) включаються адаптаційно-компенсаторні реакції для відновлення клітинного гомеостазу. Апоптоз як один з видів загибелі клітин є важливим процесом підтримки гомеостазу тканин, завдяки якому усуваються пошкоджені клітини в організмі. Наявні внутрішні (мітохондріальні) та зовнішні (із залученням рецепторів смерті) сигнальні шляхи виникнення апоптозу з залученням ензимів — ініціаторних каспаз (каспаза-8 і -9) та виконавчих каспаз (каспаза-3, -6 та -7) [11].

Таким чином, аналіз життєздатності, видів загибелі клітин крові, зокрема лейкоцитів, є вельми необхідним для визначення діагностичних критеріїв, стратегії лікування, прогнозування та розробки профілактичних заходів гострого ішемічного інсульту.

Метою роботи було визначення відсотка життєздатних клітин та видів клітинної загибелі, зокрема раннього та пізнього апоптозу, некрозу лейкоцитів крові пацієнтів з гострим ішемічним інсультом залежно від тяжкості захворювання за шкалою NIHSS.

Матеріали та методи

Пацієнти з гострим ішемічним інсультом, які перебували на стаціонарному лікуванні в інсультному центрі Харківської клінічної лікарні на залізничному транспорті № 1 (м. Харків), були залучені до дослідження. Критерії включення до дослідження: хворі на ГІІ з локалізацією в каротидному басейні або з діагнозом «гострий півкульовий інфаркт», госпіталізація хворого в перші 4,5 години від початку клінічних проявів хвороби. Діагноз ішемічного інсульту встановлювали за даними клініко-нейровізуалізаційного дослідження, результатами МРТ-дослідження. Визначали загальний бал неврологічної симптоматики за шкалою тяжкості інсульту Національного інституту здоров'я США (National Institutes of Health Stroke Scale; NIHSS) від 1 до 20 балів. У хворих оцінювали свідомість, рухи очей, поля зору, слабкість м'язів обличчя, кінцівок, атаксію, чутливість, можливість розмовляти, увагу. За балами шкали NIHSS визначали тяжкість інсульту: легкому перебігу відповідали менше ніж 5 балів, середній тяжкості відповідали 6–13 балів, від 14 до 20 балів визначали пацієнтів з тяжким перебігом інсульту. Пацієнти, перебіг хвороби яких оцінювали більш ніж 25 балів за шкалою NIHSS, не брали участі у дослідженні. Залежно від тяжкості захворювання за шкалою NIHSS хворих розподілили на 3 групи: першу групу становили 30 пацієнтів (10 жінок та 20 чоловіків) із балом від 1 до 5, середній вік пацієнтів дорівнював $66,6 \pm 4,9$ року, до другої групи увійшли 32 пацієнти (6 жінок та 26 чоловіків) з балами від 6 до 13, середній вік становив $64,0 \pm 5,2$ року, третю групу становили 23 пацієнти (11 жінок та 12 чоловіків) із тяжкістю захворювання від 14 до 20 балів, середній вік пацієнтів відповідав $70,13 \pm 6,5$ року.

Забір венозної крові проводився у 30 практично здорових осіб та 85 пацієнтів з гострим ішемічним інсультом у перші 4,5 години після виникнення клінічних симптомів за умов інформованої згоди пацієнта або його родичів. Цільну кров здорових осіб та хворих на ГІІ доставляли до лабораторії проточної цитометрії Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини Харківського національного медичного університету. При проведенні дослідження спиралися на загальноприйняті світові та вітчизняні норми біоетики з застосуванням Гельсінської декларації, Конвенції Ради Європи щодо захисту прав та гідності людини у зв'язку із використанням досягнень біології та медицини (від 04.04.1997 р.), Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964–2000 рр.) та Наказу МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р. Дослідження схвалено на засіданні комісії з питань етики та біоетики Харківського національного медичного університету (протокол № 6 від 04.10.2017 р.).

З цільної крові здорових осіб та хворих з ГІІ за протоколом отримували суспензію лейкоцитів [12]. До суспензії лейкоцитів додавали барвник анексин V-FITC з піковим випромінюванням при довжині

хвилі 519 нм. Флуоресценцію вимірювали на детекторі FL1. 7-AAD збуджується при довжині хвилі 488 нм й випромінює при 670 нм, флуоресценцію визначали в каналі FL3.

За даними науковців, основними ознаками апоптозу є переміщення фосфоліпиду клітинних мембран фосфатидилсерину із внутрішнього до зовнішнього фосфоліпідного бішару клітинної мембрани та зв'язування з анексином V [13]. Тому для визначення відсотка апоптотичних клітин використовували екстерналізацію фосфоліпиду клітинних мембран та фрагментацію ДНК, що виявляли за забарвленням анексином V-FITS та йодидом пропідію, які є необхідними для виявлення ранньо- та пізньоапоптотичних клітин. Некроз лейкоцитів ідентифікували за порушенням цілісності клітинних мембран й поглинанням 7-AAD (7-аміноактиноміцину). За умов пошкодження цілісності клітинної мембрани барвник 7-AAD потрапляє всередину клітини, зв'язується з молекулою ДНК та флуоресцує. Аналіз лейкоцитів, забарвлених анексином V та 7-AAD, дав змогу ідентифікувати життєздатні лейкоцити та різні види їхньої клітинної загибелі: 1) життєздатні (анексин V⁻, 7AAD⁻ клітини); 2) ранньоапоптотичні (анексин V⁺, 7AAD⁻); 3) пізньоапоптотичні (анексин V⁺, 7AAD⁺); 4) некротичні (анексин V⁻, 7AAD⁺) [13].

Отримані в роботі результати аналізували за допомогою проточного цитометра BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson, США). Для збору та обробки результатів було використано програмне забезпечення BD FACSDiva™ та FlowJo™ v10.8. Для ідентифікації ділянки лейкоцитів та визначення життєздатних клітин використовували SSC/FL6 дотплоти після забарвлення антитілами до CD45, які були мічені тандемним флуорохромом APC-Cy™ 7 (BD Pharmingen, No 561586, клон ОХ-1, США).

Результати та обговорення

З проведеного аналізу сучасної наукової літератури відомо, що одним з видів клітинної загибелі є апоптоз. Зараз визначена роль цього виду клітинної загибелі у патогенезі гострого ішемічного інсульту. Визначається, що зменшення кровотоку головного мозку призводить до дефіциту кисню та глюкози, що є необхідним для функціонування нервової тканини з подальшою загибеллю нейронів [14]. Крім того, апоптоз є регульованим процесом та сприяє фрагментації клітини на апоптотичні тільця з обмеженням плазмолемою, відбувається процес фагоцитозу із залученням макрофагів без запального процесу [15]. За цим видом клітинної загибелі виникають морфологічні зміни: зморщування клітин, конденсація хроматину, фрагментація ДНК, деградація протеїнів ядра та цитоскелета, утворення апоптотичних тілець; експресія лігандів та подальше поглинання фагоцитами [15].

На нашу думку, апоптоз лейкоцитів може запускатися за умов шкідливої дії надмірної генерації АФК. З попередніх досліджень відомо, що інформативним маркером раннього апоптозу є екстерналізація фосфатидилсерину на поверхню клітини [13]. Некроз — це ще один з видів клітинної загибелі, що виникає за рахунок розгортання оксидативного стресу на тлі підвищення вмісту кальцію всередині клітини, характерною ознакою якого є гідропічна дистрофія. Порушення функціонування протеїнового комплексу впливає на мітохондріальні мембрани. Ми вважаємо, що однією з причин порушення роботи комплексу є дисбаланс про- та антиапоптотичних білків, зокрема Bcl 2 та Вах.

У ранніх наукових роботах некроз відносили до нерегульованої форми загибелі клітин. На сьогодні визначено, що некроз є високорегульованим процесом [16].

Таблиця 1. Життєздатність лейкоцитів, ранньо-, пізньоапоптотичні та некротичні клітини крові здорових осіб та хворих з гострим ішемічним інсультом залежно від тяжкості перебігу за шкалою NIHSS (Me [25 %; 75 %])

Групи дослідження	Основні показники			
	Життєздатні лейкоцити, %	Ранньоапоптотичні лейкоцити, %	Пізньоапоптотичні лейкоцити, %	Некротичні лейкоцити, %
Здорові особи (n = 6)	96,98 [95,26; 97,81]	1,79 [1,108; 2,033]	0,795 [0,582; 1,783]	0,485 [0,327; 1,02]
Хворі на інсульт з легким перебігом (n = 6)	91,95 [90,41; 93,53] p = 0,0022	4,31 [3,46; 5,515] p = 0,0022	2,965 [2,268; 3,318] p = 0,0087	0,715 [0,40; 1,053]
Хворі на інсульт з перебігом середньої тяжкості (n = 7)	87,96 [85,15; 90,16] p = 0,0012 p ₁ = 0,0140	6,73 [5,21; 8,15] p = 0,0012 p ₁ = 0,0150	3,53 [2,48; 4,17] p = 0,0023	1,83 [1,40; 2,65] p = 0,0012 p ₁ = 0,0012
Хворі на інсульт з тяжким перебігом (n = 6)	80,20 [77,68; 81,87] p, p ₁ = 0,0022 p ₂ = 0,0012	9,05 [8,625; 10,84] p, p ₁ = 0,0022 p ₂ = 0,0012	6,085 [5,693; 7,688] p, p ₁ = 0,0022 p ₂ = 0,0082	3,95 [3,47; 4,85] p, p ₁ = 0,0022

Примітки: p — значима відмінність порівняно з показниками у здорових осіб; p₁ — значима відмінність порівняно з показниками у пацієнтів з легким перебігом; p₂ — значима відмінність порівняно з показниками у пацієнтів з перебігом хвороби середньої тяжкості.

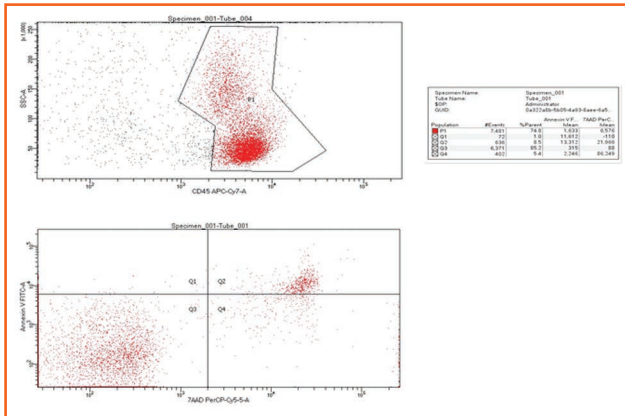


Рисунок 1. Персоніфікована цитограма з візуалізацією життєздатних клітин крові та видів клітинної загибелі лейкоцитів крові пацієнта з легким перебігом гострого ішемічного інсульту

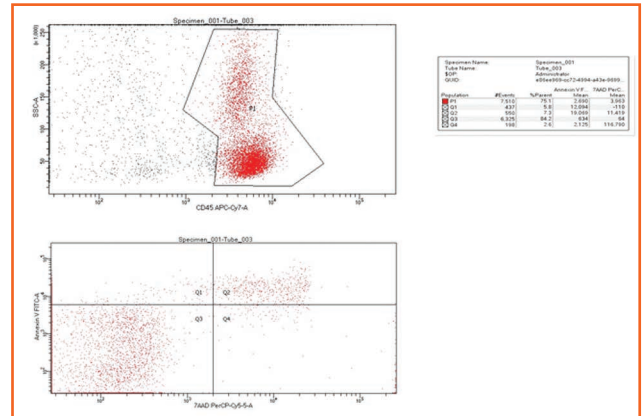


Рисунок 2. Персоніфікована цитограма з візуалізацією життєздатних клітин та видів клітинної загибелі лейкоцитів крові пацієнта з тяжким перебігом гострого ішемічного інсульту

Визначення відсотка життєздатних, ранньо-, пізноапоптотичних та некротичних клітин у крові здорових осіб та пацієнтів з ГП залежно від тяжкості захворювання за шкалою NIHSS представлено в табл. 1.

У всіх обстежених хворих на ГП залежно від тяжкості захворювання за шкалою NIHSS порівняно з відповідними показниками у здорових осіб відбувається вірогідне зниження відсотка життєздатних лейкоцитів, який поступово знижувався залежно від тяжкості перебігу ГП. У зразках суспензій лейкоцитів периферичної крові пацієнтів з легким перебігом гострого ішемічного інсульту відсоток життєздатних клітин знижувався на 5 %, у пацієнтів з перебігом середньої тяжкості — на 9 %, а у пацієнтів з балами від 14 до 20 за шкалою NIHSS — на 16,78 % порівняно зі показниками крові у здорових осіб (рис. 1). На рис. 1 наведено типову цитограму з візуалізацією життєздатних клітин крові та ранньо-, пізноапоптотичних та некротичних лейкоцитів крові пацієнта з легким перебігом гострого ішемічного інсульту.

Найменше значення відсотка життєздатних лейкоцитів крові спостерігалось у пацієнтів з тяжким перебігом хвороби. Також визначалося зниження життєздатних лейкоцитів на 4,0 % у пацієнтів з перебігом середньої тяжкості порівняно з показниками крові пацієнтів з легким перебігом хвороби (рис. 2).

На рис. 2 наведено типову цитограму з візуалізацією життєздатних клітин крові та ранньо-, пізноапоптотичних та некротичних лейкоцитів крові пацієнта з тяжким перебігом гострого ішемічного інсульту.

Відсоток життєздатних лейкоцитів (CD45+) у крові пацієнтів, оцінених за тяжкістю ГП за балами шкали NIHSS 14–20 балів, знижувався на 11,75 % порівняно з відповідними показниками у пацієнтів з легким перебігом та на 7,76 % порівняно з показниками крові у пацієнтів з балами за шкалою NIHSS 6–13 (рис. 2).

При аналізі відсотка лейкоцитів у стадії раннього апоптозу порівняно з показниками у здорових осіб спостерігали поступове збільшення відсотка ранньоапоптотичних лейкоцитів: у пацієнтів з перебігом середньої тяжкості — у 3,76 раза. Найбільше значення відсотка ранньоапоптотичних лейкоцитів визначали у пацієнтів

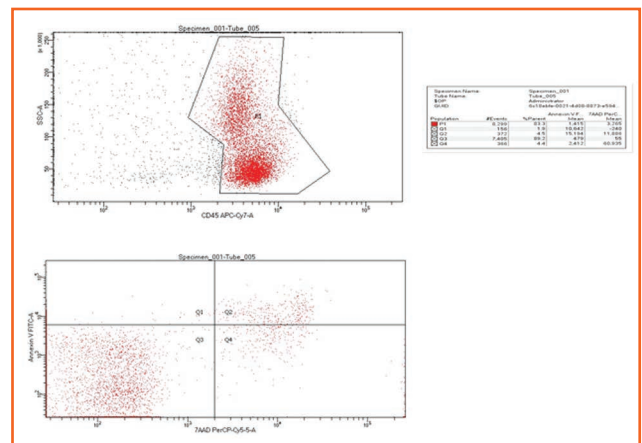


Рисунок 3. Персоніфікована цитограма з візуалізацією життєздатних клітин крові та видів клітинної загибелі лейкоцитів крові пацієнта з перебігом хвороби середньої тяжкості

з балами 14–20 за шкалою NIHSS, а саме підвищення практично в 5,05 раза порівняно зі здоровими особами (рис. 3).

На рис. 3 наведено типову цитограму з візуалізацією життєздатних клітин крові та ранньо-, пізноапоптотичних та некротичних лейкоцитів крові пацієнта з перебігом гострого ішемічного інсульту середньої тяжкості.

У лейкоцитах периферичної крові, що перебувають на стадії раннього апоптозу, відбувається переміщення фосфатидилсерину з внутрішнього до зовнішнього бішару цитоплазматичної мембрани клітини.

Також спостерігається незначне підвищення відсотка клітин у стадії пізнього апоптозу порівняно з показниками у здорових осіб. Так, у пацієнтів з легким перебігом хвороби відбувалося збільшення на 2,17 %, у пацієнтів з перебігом середньої тяжкості — на 2,73 %. Найбільш високі значення відсотка пізноапоптотичних лейкоцитів визначалися у пацієнтів з тяжким перебігом — у 7,65 раза вище від показників у здорових осіб. Відсоток некротичних клітин у пацієнтів з легким перебігом статистично не змінювався порівняно зі здоровими особами.

У крові пацієнтів з перебігом середньої тяжкості та тяжким перебігом спостерігали збільшення відсотка некротичних клітин крові в 3,77 та 8,14 раза порівняно зі здоровими особами відповідно. Також визначали різницю між відсотком некротичних клітин у пацієнтів з тяжким перебігом і відсотком некротичних клітин у пацієнтів з легким перебігом.

Аналізуючи отримані результати, можна припустити, що виникнення ішемічного стану головного мозку сприяє інтенсифікації генерації активних форм кисню та нітрогену клітинами. За умов дії АФК та активних форм нітрогену пошкоджуються органічні компоненти клітин: ліпіди, протеїни, нуклеїнові кислоти. Розгортання оксидативного стресу на тлі зниження активності ензимів антиоксидантної системи сприяє загибелі клітин, зокрема лейкоцитів, нейронів, порушує гематоенцефалічний бар'єр. Апоптоз, що виникає в клітинах під час ГП, може сприяти значній загибелі нейронів під час виникнення ГП, але патофізіологічні механізми, що лежать в основі цього процесу, досі не з'ясовані. Відомо, що апоптоз в ішемічній півтині може виникати через кілька годин або днів, тоді як некроз клітин може спостерігатися вже в перші години виникнення захворювання. Основними патогенетичними механізмами є синтез вільних радикалів, збільшення вмісту кальцію та ексайтотоксичність [15]. Визначені фактори можуть сприяти виникненню клітинної загибелі.

За умов дії АФК виникає порушення функціонування протеїнового комплексу, що впливає на структурно-функціональні властивості мітохондріальних мембран. На нашу думку, однією з причин порушення роботи комплексу є дисбаланс про- та антиапоптотичних білків, зокрема Bcl 2 та Вах. Роль визначених протеїнів у патогенезі ГП відображено в наукових роботах Lorente L. [17]. Авторами доведено зв'язок між високим вмістом Bcl 2 у крові хворих на гострий ішемічний інсульт та смертністю.

Таким чином, проведене нами дослідження виявило, що за умов гострого ішемічного інсульту у всіх пацієнтів спостерігається інтенсифікація процесів апоптозу лейкоцитів периферичної крові. Цей процес може бути пов'язаний з розвитком оксидативного стресу за умов активації АФК-залежних шляхів клітинної загибелі. Відомо, що ключовими джерелами АФК у лейкоцитах є NADPH-залежна оксидаза та функціонування дихального ланцюга, де здійснюється транспорт електронів. З огляду на запальну теорію розвитку ГП, можна запропонувати, що прозапальні інтерлейкіни, зокрема ФНП- α та ІЛ-1 β , сприяють надмірній стимуляції NADPH-оксидази. Прозапальні цитокіни активують апоптоз за внутрішнім шляхом за впливом ФНП- α та FasL-індукування апоптозу [18]. З іншого боку, АФК індукують апоптоз як сигнальні молекули через ASK1.

Висновки

У пацієнтів з гострим ішемічним інсультом відбувається зниження відсотка життєздатних лейкоцитів периферичної крові залежно від тяжкості захворювання

за шкалою NIHSS. Що тяжче перебіг захворювання, то нижчий відсоток життєздатних клітин. Спостерігається підвищення відсотка ранньо- та пізноапоптотичних клітин крові у пацієнтів з гострим ішемічним інсультом, також спостерігається кореляція показників з тяжкістю захворювання. Активація апоптозу лейкоцитів периферичної крові відбувається за умов генерації АФК та залучення АФК-залежних патофізіологічних механізмів загибелі клітин.

До перспективних досліджень — визначення за допомогою флуоресцентних зондів змін фізико-хімічних властивостей мембрани лейкоцитів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів та власної фінансової зацікавленості при написанні даної статті.

Вдячність. Автори висловлюють вдячність за проведення дослідження за допомогою проточної цитометрії в.о. директора Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини д.біол.н. В.Ю. Прокіюку.

Список літератури

1. Salaudeen MA, Bello N, Danraka RN, Ammani ML. Understanding the Pathophysiology of Ischemic Stroke: The Basis of Current Therapies and Opportunity for New Ones. *Biomolecules*. 2024;14:305.
2. Gusev EI, Martynov MY. Stroke: Current State of the Problem. *Neurosci Behav Physi*. 2025;55:582-592. doi: <https://doi.org/10.1007/s11055-025-01804-0>.
3. Radenovic L. Exploring therapeutic targets and innovative treatments for ischemic stroke: a comprehensive review. *Explor Neurol Ther*. 2024;4:459-84. doi: <https://doi.org/10.37349/ent.2024.00094>.
4. Palachai N, Supawat A, Kongsui R, Klimaschewski L, Jittiwat J. Galangin's Neuroprotective Role: Targeting Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in Ischemic Stroke in a Rat Model of Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025;26(5):1847. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms26051847>.
5. Sharma R, Lee K. Advances in treatments for acute ischemic stroke. *BMJ* 2025;389:e076161. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj-2023-076161>.
6. Golenia A, Olejnik P. The Role of Oxidative Stress in Ischemic Stroke and the Influence of Gut Microbiota. *Antioxidants*. 2025;14:542. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox14050542>.
7. Pawluk H, Tafelska-Kaczmarek A, Sopońska M, Porzych M, Modrzejewska M, Pawluk M, et al. The Influence of Oxidative Stress Markers in Patients with Ischemic Stroke. *Biomolecules*. 2024 Sep 6;14(9):1130. doi: [10.3390/biom14091130](https://doi.org/10.3390/biom14091130).
8. Ji W, Ren Y, Wei X, et al. Ischemic stroke protected by ISO-1 inhibition of apoptosis via mitochondrial pathway. *Sci Rep*. 2023;13:2788. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29907-z>.
9. Li M, Lin C, Ge P, Li L, Song S, Zhang H, et al. A deep learning model for detection of leukocytes under various interference factors. *Sci Rep*. 2023 Feb 7;13(1):2160. doi: [10.1038/s41598-023-29331-3](https://doi.org/10.1038/s41598-023-29331-3). PMID: 36750590; PMCID: PMC9905612.
10. Великий В.Ю., Вознесенська Т.Ю. Види клітинної загибелі, що реалізуються через вплив активних форм кисню і пошкодження ДНК. *Фізіологічний журнал*. 2023;69(4):115-125.

11. Mustafa M, Ahmad R, Tantry IQ, Ahmad W, Siddiqui S, Alam M, et al. Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications. *Cells*. 2024 Nov 6;13(22):1838. doi: 10.3390/cells13221838. PMID: 39594587; PMCID: PMC11592877.
12. Pogozhykh D, Posokhov Y, Myasoedov V, Gubina-Vakulyck G, Chumachenko T, et al. Experimental Evaluation of Food-Grade Semi-Refined Carrageenan Toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(20):11178. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms222011178>.
13. Alshehade SA, Almoustafa HA, Alshawsh MA, Chik Z. Flow cytometry-based quantitative analysis of cellular protein expression in apoptosis subpopulations: A protocol. *Heliyon*. 2024 Jun 25;10(13):e33665. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e33665. PMID: 39040270; PMCID: PMC11260931.
14. Mao R, Zong N, Hu Y, Chen Y, Xu Y. Neuronal Death Mechanisms and Therapeutic Strategy in Ischemic Stroke. *Neurosci Bull*. 2022 Oct;38(10):1229-1247. doi: 10.1007/s12264-022-00859-0. Epub 2022 May 5. PMID: 35513682; PMCID: PMC9554175.
15. Radak D, Katsiki N, Resanovic I, Jovanovic A, Sudar-Milovanovic E, Zafirovic S, Mousad SA, Isenovic ER. Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke. *Curr Vasc Pharmacol*. 2017;15(2):115-122. doi: 10.2174/1570161115666161104095522. PMID: 27823556.
16. Li P, Dong XR, Zhang B, Zhang XT, Liu JZ, Ma DS, Ma L. Molecular mechanism and therapeutic targeting of necrosis, apoptosis, pyroptosis, and autophagy in cardiovascular disease. *Chin Med J (Engl)*. 2021 Oct 4;134(22):2647-2655. doi: 10.1097/CM9.0000000000001772. PMID: 34608069; PMCID: PMC8631411.
17. Lorente L, Martín MM, González-Rivero AF, Pérez-Cejas A, Abreu-González P, Ramos L, et al. DNA and RNA oxidative damage are associated to mortality in patients with cerebral infarction. *Med Intensiva (Engl Ed)*. 2021 Jan-Feb;45(1):35-41. English, Spanish. doi: 10.1016/j.medin.2019.07.008. Epub 2019 Sep 3. PMID: 31492477.
18. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*. 2002 May 31;296(5573):1635-6. doi: 10.1126/science.1071553. PMID: 12040174.

Отримано/Received 17.09.2025

Рецензовано/Revised 30.10.2025

Прийнято до друку/Accepted 04.11.2025

Information about authors

Pavlo Lebedynets, PhD student and assistant professor, Department of Neurology with a course in neurosurgery, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine
 Olena Tovazhnyanska, MD, DSc, PhD, Professor, Head of the Department of Neurocognitive and Vascular Diseases of the Brain at the D.F. Chebotarev Institute of Gerontology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine; Professor of the Department of Neurology with a course in neurosurgery at Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine
 Oksana Nakonechna, MD, DSc, PhD, Professor, vice-rector for research work of Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

Conflicts of interests. Authors declare the absence of any conflicts of interests and own financial interest that might be construed to influence the results or interpretation of the manuscript.

P.V. Lebedynets¹, O.L. Tovazhnyanska^{1,2}, O.A. Nakonechna¹

¹Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

²D.F. Chebotarev Institute of Gerontology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The viability and types of leukocyte cell death in patients with acute ischemic stroke depending on the severity of the disease

Abstract. Background. Stroke remains the second leading cause of death worldwide, and its prevalence is rapidly increasing among the young working-age population. Acute ischemic stroke accounts for over 80 % of all stroke cases, it has a high mortality rate and leads to disability. The main pathological processes that accompany ischemic stroke include oxidative stress, excitotoxicity, and inflammation. Studying the types of cell death, particularly apoptosis and necrosis, in the body under the influence of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen is important for understanding ischemic stroke. Objective: to determine the percentage of viable, early apoptotic, late apoptotic, and necrotic leukocytes in the peripheral blood of patients with acute ischemic stroke depending on disease severity according to the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS). **Materials and methods.** Patients with acute ischemic stroke were divided into three groups depending on the severity of the disease according to the NIHSS. The first group included 30 patients with scores from 1 to 5, the second group consisted of 32 participants with scores from 6 to 13, and the third group included 23 people with disease severity scores from 14 to 20. Whole venous blood was collected in a hospital setting within 4.5 hours after the onset of the disease. A leukocyte suspension was prepared according

to the protocol. The percentage of viable, early apoptotic, late apoptotic, and necrotic leukocytes in the peripheral blood of patients was determined by flow cytometry using a BD FACSCanto™ II system.

Results. In patients with acute ischemic stroke, there is a decrease in the percentage of viable leukocytes depending on the severity of the disease according to the NIHSS compared to healthy individuals. The percentage of early and late apoptotic leukocytes gradually increased depending on the severity of the disease. The percentage of necrotic cells in patients of group I did not change statistically. In the blood of patients from groups II and III, an increase in the percentage was observed by 3.77 and 8.14 times compared to the corresponding indicators in healthy individuals. **Conclusions.** In patients with acute ischemic stroke, there is a decrease in the percentage of viable cells against the background of an increase in the percentage of early apoptotic, late apoptotic, and necrotic leukocytes, and a correlation between these indicators and the severity of the disease. In our opinion, the activation of blood leukocyte cell death processes occurs under increased ROS generation involving ROS-dependent mechanisms.

Keywords: viability; apoptosis; leukocyte necrosis; acute ischemic stroke; National Institutes of Health Stroke Scale; flow cytometry