

*На правах рукописи*

**МИНИБАЕВА ГУЗЕЛЬ МУДАРИСОВНА**

**КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АССОЦИАЦИИ И  
ПРЕДИКТОРЫ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА**

14.01.11 - нервные болезни

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Уфа – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Новикова Лилия Бареевна**

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, профессор

**Викторова Татьяна Викторовна**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук

**Виноградов Олег Иванович**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национального медико-хирургического центра имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра неврологии с курсом нейрохирургии Института усовершенствования врачей, заведующий кафедрой

доктор медицинских наук, профессор

**Котов Сергей Викторович**

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, кафедра неврологии факультета усовершенствования врачей заведующий.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «.....» \_\_\_\_\_ 2021 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.072.09 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, дом 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, дом 1 и на сайте [www.rsmu.ru](http://www.rsmu.ru).

Автореферат разослан «.....» \_\_\_\_\_ 202\_\_ года.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

 **Боголепова Анна Николаевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования**

Проблема сосудистых заболеваний мозга имеет исключительную медико-социальную значимость, которая определяется их значительной долей в структуре заболеваемости и смертности населения, высокими показателями временных трудовых потерь и первичной инвалидности во всем мире (Скворцова В.И. с соавт., 2017).

Основное место в структуре цереброваскулярных заболеваний занимают инсульты. Ежегодно во всем мире инсульт переносят более 20 млн человек, что обуславливает 5 млн. смертельных исходов и еще 5 млн. случаев утраты функциональной состоятельности (Green A.R., Shuaib A., 2006). Это вторая ведущая причина смерти в большинстве промышленно развитых стран (Muresanu D.F. et al., 2017; Murray C.J., Lopes A.D., 2013).

Важно и то, что в последние годы, имеется тенденция к «омоложению» инсульта и увеличение его распространенности и среди лиц трудоспособного возраста, как у мужчин, так и женщин (Стаховская Л.В., Котов С.В., 2018). Частота инсультов в Российской Федерации составляет, по разным источникам, 350-400 случаев на 100 тысяч населения (Гусев Е.И., Мартынов М.Ю., Камчатнов П.Р., 2013). Инсульт в 1,25 раза чаще развивается у мужчин. Хотя в связи с большей продолжительностью жизни женщин, суммарное число женщин, умерших от инсульта, оказывается большим (Кадыков А.С. с соавт., 2010).

Первичный выход на инвалидность среди выживших после инсульта пациентов достигает показателя 3,2 человека на 10 тысяч населения. Перенесенный инсульт является предиктором когнитивных нарушений (КН). Через 6 месяцев после инсульта у 44-74% отмечаются умеренные КН (Дамулин И.В. с соавт., 2002), а у половины пациентов с постинсультными КН через 5 лет развивается деменция (Одинак М.М., 2006).

Вероятность развития повторного острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) в первые 2 года после инсульта составляет 4-14%, при этом в течение 1-го месяца повторный ишемический инсульт (ИИ) развивается у 2-3% выживших, в первый год – у 10-16%, в последующем около 5% ежегодно, что в 15 раз превышает аналогичный показатель в общей популяции (Стаховская Л.В. с соавт., 2018).

Рост распространенности ИИ, высокая смертность и тяжелые последствия заболевания позволяют рассматривать проблему церебрального инсульта с позиции высокой социальной значимости (Парфенов В.А., 2012).

В последние годы усилилось внимание к изучению генетических маркеров инсульта. Так, исследовалась группа мРНК гена CD 46, с помощью которой можно классифицировать подтипы ИИ и ряд микроРНК, влияющих на экспрессию гена (Kaur P. et al., 2016). Однако, практически отсутствуют работы по изучению уровня экспрессии гена CD 46 и регулирующих его микроРНК

при ИИ, имеются единичные публикации в научных, преимущественно зарубежных журналах.

Таким образом, изучение роли генетических маркеров в развитии и течении ИИ представляет собой актуальную, малоизученную и до конца не решенную научную проблему, что и определило цель нашей работы.

**Цель исследования:** определить новые диагностические маркеры разных подтипов и тяжести течения ИИ на основе клинических показателей, уровня экспрессии гена CD46 и регулирующих его микроРНК.

**Задачи исследования:**

1. Изучить клиническую характеристику больных ИИ, определить основные факторы риска развития инсульта у этих больных.

2. Провести анализ результатов лабораторных, инструментальных и нейровизуализационных методов исследования у больных ИИ.

3. Определить уровень экспрессии гена CD46 и регулирующих его микроРНК у больных ИИ.

4. Изучить ассоциацию экспрессии микроРНК, оказывающую посттранскрипционное влияние на уровень экспрессии CD46 с клиническими подтипами ИИ.

5. Разработать модель прогнозирования степени тяжести ИИ.

**Научная новизна исследования**

Впервые изучен уровень экспрессии гена CD46 и регулирующих его микроРНК у больных с типами ОНМК и клиническими подтипами ИИ.

Впервые установлена взаимосвязь уровня экспрессии микроРНК с ТИА, АТИ и КЭИ.

Показаны половые различия экспрессии гена CD46 при различных подтипах ИИ.

Впервые показано, что у больных средней степени тяжести и тяжелым ИИ изменяется кратность экспрессии miRNA19a и miRNA20a.

Впервые проведен сравнительный анализ уровня экспрессии CD46 и регулирующих его микроРНК с тяжестью ИИ, когнитивными нарушениями и результатами КТ головного мозга.

Разработан способ прогнозирования степени тяжести ИИ на основе определения кратности экспрессии микроРНК-20a.

**Научно-практическая значимость.** Изучение уровня экспрессии гена CD46 и микроРНК, оказывающую посттранскрипционное влияние на его уровень, позволило выявить маркеры тяжести течения ИИ.

Практическое значение диссертационного исследования заключается в использовании данных экспрессии CD46 и регулирующих его микроРНК как диагностических и прогностических биомаркеров клинических подтипов ИИ.

Материалы работы могут быть использованы в учебном процессе на медицинских и биологических факультетах ВУЗов, а также на курсах последипломного образования врачей.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Основными факторами риска у пациентов с АТИ явились атеросклероз и курение. У больных с КЭИ - ишемическая болезнь сердца с наличием ФП, артериальная гипертензия и ожирение.
2. Количество С-реактивного белка в сыворотке крови было повышенным в группе больных с АТИ – 40,4 мг/л по сравнению с КЭИ – 21 мг/л,
3. Уровень экспрессии гена CD46, miRNA185, miRNA19a и miRNA20a ассоциирован с типами ОНМК и подтипами ИИ.
4. Кратность экспрессии miRNA20a является прогностическим признаком степени тяжести инсульта.

**Апробация работы**

Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на: 78-ой Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2013), Международном конгрессе «Нейрореабилитация-2013» (Москва, 2013), III Национальном конгрессе «Кардионеврология» (Москва, 2018).

Диссертация апробирована на проблемной комиссии совместно с кафедрой неврологии ИДПО БГМУ (протокол №2 от 15.06.2020).

**Личный вклад автора** в получении результатов, изложенных в диссертации, состоит в непосредственном участии во всех этапах процесса. Автором лично проведен углубленный анализ отечественной и зарубежной научной литературы, определены основные идеи и дизайн исследования. Проведены обследование пациентов, забор крови и генетическое исследование (выделение РНК, подбор праймеров и анализ экспрессии генов, микроРНК). Статистическая обработка и анализ полученных данных проведены автором самостоятельно. По итогам полученных результатов подготовлены достоверно обоснованные выводы и представлены практические рекомендации, основные публикации, получен патент на изобретение РФ.

**Внедрение результатов исследования**

Результаты исследования и практические рекомендации внедрены и используются в работе Частного учреждения здравоохранения «Клиническая больница «РЖД – Медицина» г.Уфа и Государственного бюджетного учреждения здравоохранения РБ «Городская клиническая больница №18» г.Уфы. Основные положения и выводы диссертации используются в клинической, научной и педагогической деятельности на кафедре неврологии Института дополнительного профессионального образования Башкирского государственного медицинского университета, а также на кафедре биологии Башкирского государственного медицинского университета при преподавании дисциплины «Геном человека».

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 4- в журналах из перечня ВАК Минобрнауки РФ и 1 статья в зарубежном журнале *ECronical Neurology*. Получен патент на изобретение

№2712105 от 24 января 2020г. «Способ диагностики степени тяжести ишемического инсульта».

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 111 страницах машинописного текста, иллюстрирована 13 таблицами, 26 рисунками. Состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Список литературы содержит 232 источника, из них отечественных 79 и иностранных 153 автора.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Объектом нашего исследования были 163 пациента, поступившие в стационар в первые 24 часа с момента первых признаков ОНМК.

Базами исследования клинической части выбраны ГБУЗ РБ Больницы скорой медицинской помощи г.Уфы, являющейся головным сосудистым центром РБ и ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД - Медицина» г.Уфы. Экспериментальная часть исследования выполнена на базе ФГОУ ВО БГМУ МЗ РФ, ЦНИЛ, лаборатории клеточных культур.

Из 163 пациентов было 90 (55%) мужчин и 73 (45%) женщины в возрасте от 36 до 89 лет. Пациенты, принимавшие участие в исследовании, а в случае ограничений в связи с тяжестью состояния их родственники, заполняли информированное согласие. После проведенного клинического, лабораторно-инструментального, нейровизуализационного методов исследования были сформированы 3 группы: I и II группы - больные с ОНМК, включающая ТИА и подтипы инсульта (Таблица 1) и III - контрольная группа, в которую вошли 20 человек в возрасте от 50 до 70 лет, (средний возраст  $66,8 \pm 1,4$ ), без признаков неврологической патологии и сердечно-сосудистых заболеваний. Обязательным условием включения в эту группу было отсутствие хронических соматических заболеваний, а также отсутствие острых заболеваний на протяжении последних 6 месяцев.

Таблица 1 – Группы больных с ТИА и подтипами ИИ

	Количество больных	Количество мужчин	Количество женщин	Средний возраст
I группа ТИА	52 (31,9%)	23(44%)	29 (56%)	66,1 $\pm$ 2,12
II группа ИИ	111 (68,1%)	-	-	-
- АТИ	51 (31,3%)	35 (69%)	16 (31%)	65,2 $\pm$ 3,13
- КЭИ	60 (36,8%)	32 (53%)	28 (47%)	70,3 $\pm$ 2,22

Диагноз инсульта устанавливался на основании общепринятых критериев в соответствии с Международной Классификацией Болезней и проблем, связанных со здоровьем (МКБ 10, введена в России в 1999г.).

Всем больным проводили сбор жалоб, анамнеза, клиническое и неврологическое исследование. Изучали амбулаторные карты больных. Степень выраженности неврологического дефицита, тяжесть состояния больных определяли по шкале комы Глазго, шкале NIHSS, модифицированной шкале Ашфорт, модифицированной шкале Рэнкина, индексу мобильности Ривермид. Проводили стандартизированное скрининговое тестирование функции глотания. Для оценки состояния когнитивных функций применяли Монреальскую Шкалу Оценки Когнитивных Функций (MoCA).

Всем пациентам проведены лабораторные методы исследования, включающие общие анализы крови и мочи, биохимический анализ крови, липидограмму. Определялись основные параметры коагулограммы: протромбиновое время (ПТ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), фибриноген, растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК), международное нормализованное отношение (МНО). В рамках нашего исследования определяли С-реактивный белок.

Всем пациентам в течение 40 минут от момента поступления в стационар выполнялась КТ головного мозга на рентгеновском компьютерном томографе со спиральным сканированием, использованием автоматического контроля поступления контрастного вещества. По показаниям – МРТ в режимах T1- и T2 – взвешенное изображение (ВИ), в диффузионно-взвешенном изображении, а также в режиме FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery). В 100% случаях было выполнено электрокардиография (ЭКГ) на аппарате SchillerAG, Швейцария, ультразвуковое дуплексное сканирование (УЗДС) магистральных артерий головного мозга и эхокардиография на аппаратах фирмы Siemens «ACUSON sequoia». При необходимости выполнялось холтеровское мониторирование ЭКГ.

Молекулярно-генетическое исследование проводилось с использованием образцов РНК 80 неродственных индивидов, проживающих на территории Республики Башкортостан, из которых 21 (26,2%) - больные ТИА, 21 (26,2%) – больные КЭИ, 20 (25%) – больные АТИ и 18 (22,6%) человек группы контроля. РНК выделяли из мононуклеаров периферической венозной крови с помощью Extract RNA (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Обратную транскрипцию (синтеза первой цепи кДНК) проводили с помощью реактивов ЗАО «Евроген» Россия. Анализ проводили методом ПЦР на термоциклере «RotorGeneQ» фирмы «QIAGEN» в режиме реального времени с использованием олигонуклеотидных специфичных праймеров фирмы «Евроген», содержащего интеркалирующий краситель SYBR Green.

Ген GAPDH был выбран в качестве контроля для анализа относительной представленности транскриптов гена CD46; для анализа относительной представленности транскриптов гена микроРНК использовалась miRNA191, поскольку их экспрессия является стабильной при ишемических инсультах в сыворотке крови.

Математическую обработку результатов исследования проводили с использованием статистической программы: IBM SPSS STATISTICA v.21, а также в программе Microsoft Excel. Полученные данные обрабатывались статистически с помощью биометрических методов анализа (Животовский Л., 1991). Проверку распределения на нормальность осуществляли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Среднее значение  $M$  и ошибку среднего значения  $m$  вычисляли в Microsoft Excel. Относительную экспрессию оценивали по методу, предложенному K.J. Livak и T.D. Schmittgen в 2001 году. Кратность изменения нормализованной экспрессии (FR) оценивалась исходя из показателей относительной экспрессии. Статистическую достоверность различий между группами оценивали с помощью Т-критерия Стьюдента, Фишера, однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) или Манна-Уитни. При проведении однофакторного дисперсионного анализа для множественных сравнений в случае равенства дисперсий применяли поправку Тьюки, при различии характеристик дисперсий применяли поправку Тамхейна. Дисперсии сравнивали с помощью статистики Ливиня.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

#### **Клиническая характеристика больных с ТИА и подтипами ИИ**

Из 163 пациентов наибольшая частота ТИА, АТИ и КЭИ выявлена у мужчин - 90 (55,2%), из них в возрасте 61-70 лет у 32 (35,5%) пациентов. Заболеваемость ТИА и подтипами ИИ среди мужчин в возрасте от 36-70 лет была в 1,5 раза выше, чем у женщин (Таблица 2).

Таблица 2 - Распределение больных по полу и возрасту

Пол	Возраст, лет					Всего
	36-50	51-60	61-70	71-80	Старше 80	
Мужчин	10(11,1%)	17(18,9%)	32(35,5%)	16(17,8%)	15 (16,7%)	90 (55,2%)
Женщин	1(1,4%)	13(17,8%)	22(30,1%)	29(39,7%)	8 (11%)	73 (44,8%)
Итого	11 (6,8%)	30(18,4%)	54(33,1%)	45(27,6%)	23 (14,1%)	163 (100%)

Основными сопутствующими заболеваниями и факторами риска при ТИА и подтипах ИИ у больных в исследовании являлись: АГ у 149 (91,4%) больных, АС у 120 (73,5%), ИБС у 99 (60,7%), из них с нарушением ритма по типу фибрилляции предсердий (ФП) у 46 (76,7%) больных, постинфарктный кардиосклероз (ПИКС) у 52 (31,9%), сахарный диабет (СД) у 41 (25,1%), хроническая сердечная недостаточность (ХСН) у 32 (19,6%) больных. Ожирением страдали 58 (35,6%) больных, курили 33%, злоупотребляли алкоголем 11% больных (Рисунок 1).





Рисунок 1 – Основные сопутствующие заболевания и факторы риска ТИА и различных подтипов ИИ

Повторное ОНМК перенесли 38 (34,2%) пациентов. Из них 16 (42,1%) больных с АТИ, у которых в анамнезе в 78,1% случаев наблюдались ТИА. Повторный КЭИ был у 22 (57,9%) пациентов, у которых ТИА наблюдались лишь в 27,3% случаев ( $X^2=9,648$ ;  $p=0,008$ ).

Злоупотребление алкоголя в анамнезе было выявлено у 18 (11%) больных ( $X^2=9,488$ ;  $p=0,009$ ) и курение у 53 (33%) больных ( $X^2=4,153$ ;  $p=0,125$ ). Наибольшее количество больных, злоупотребляющих алкоголь и курящих, было выявлено в группе АТИ - 10 (55,6%) и 21 (39,7%) соответственно. В группе КЭИ один больной регулярно употреблял алкоголь, 14 (26,4%) пациентов курили. В группе ТИА употребляли алкоголь 7 (38,9%) больных, курили 18 (33,9%).

Среди больных с различными подтипами ИИ были выделены три подгруппы в зависимости от степени тяжести инсульта (Таблица 3).

Таблица 3 - Распределение больных по степени тяжести инсульта

Подтипы ИИ (n=111)	Степень тяжести		
	Лёгкая 1 подгруппа	Средняя 2 подгруппа	Тяжёлая 3 подгруппа
АТИ	27(41,5%)	13 (52%)	11 (52,3%)
КЭИ	38 (58.4%)	12 (48%)	10 (7,7%)
Всего	65 (58,5%)	25 (22,5%)	21 (19%)

У больных 1 подгруппы (легкая степень тяжести ИИ): оценка по шкале инсульта NIHSS 1-8 баллов, по шкале Рэнкин до 2 баллов, индекс мобильности

Ривермид составлял 8 баллов и выше. В клинической картине у больных преобладали очаговые неврологические симптомы без расстройств сознания.

У больных 2 подгруппы (средняя степень тяжести ИИ): оценка по шкале инсульта NIHSS 9-12 баллов, по шкале Рэнкин 3 балла, индекса мобильности Ривермид составлял от 7 до 4 баллов. У всех пациентов этой подгруппы отмечалась грубая неврологическая симптоматика на фоне общемозговых расстройств, выраженность которых варьировала от легкого изменения сознания до оглушения.

У больных 3 подгруппы (тяжелый ИИ) оценка: по шкале инсульта NIHSS 13-15 баллов и выше, по шкале Рэнкин 4-5 баллов, индекс мобильности Ривермид составил от 3 до 0 баллов. На фоне грубой неврологической симптоматики у больных наблюдались нарушения сознания от глубокого оглушения до комы.

### **Неврологическая характеристика больных с транзиторной ишемической атакой**

В данной группе наблюдалось 52 (32%) больных. В зависимости от особенностей клинической симптоматики, у больных ТИА преходящее нарушение кровоснабжения в ВББ было у 27 (52%) пациентов, в правом каротидном бассейне у 13 (25%) и в левом каротидном бассейне у 12 (23%) пациентов.

Все больные с ТИА находились в ясном сознании, правильно ориентированы во времени, в пространстве и в собственной личности. О заинтересованном артериальном бассейне судили по неврологическому статусу.

У 21 (40,3%) выявлялись речевые нарушения с преобладанием дизартрии – 71,4% случаев, легкая афазия была у 28,6% больных. Нарушения глотания и артикуляции речи, гнусавый оттенок голоса были проявлением бульбарного синдрома у 15 (55,5%) больных. У 12 (44,4%) больных с диплопией выявлялся страбизм. Двигательные нарушения в виде легкого равномерного гемипареза были у 19 (36,5%), чувствительные расстройства (гемигипестезия) у 7 (13,5%) больных. Атактические нарушения выявлялись у 38 (73,1%) больных.

Неврологический дефицит у всех больных с ТИА регрессировал в течение суток.

### **Неврологическая характеристика больных с легкой степенью тяжести ишемического инсульта**

В данной подгруппе ИИ развился в левом каротидном бассейне у 18 (27%) больных, в правом у 20 (31%) и в ВББ у 27 (42%) больных.

Все больные находились в ясном сознании, правильно ориентированы во времени, пространстве и в собственной личности.

Речевые нарушения были у 38 (58,5%) больных, в основном по типу дизартрии – 55,3%. Выраженность нарушений речи варьировала от умеренных

до легких расстройств. Нарушения глотания, дисфония были проявлением бульбарного синдрома у 19 (29,2%) больных. Псевдобульбарный синдром наблюдался у 5 (7,7%) больных в виде оживления глоточного рефлекса, легких нарушений артикуляции речи. Рефлексы орального автоматизма определялись у 19 (29%) больных.

Двигательные нарушения наблюдались у 53 (81,5%) пациентов, в основном, в виде легкого, равномерного гемипареза - 34 (64,2%) больных. Неравномерный гемипарез, в основном в руке, наблюдался у 8 (15,1%) больных. Чувствительные расстройства (гемигипестезия) определялись у 19 (29,2%) пациентов. Вестибуло-атактические нарушения были выявлены у 32 (49,2%) больных.

### **Неврологическая характеристика больных со средней степенью тяжести ишемического инсульта**

В данной подгруппе ИИ в левом каротидном бассейне развился у 10 (40%), в правом – у 11(44%), в ВББ у 4(16%).

Симптомы угнетения сознания наблюдались у 6 (24%) пациентов в виде легкого оглушения. Снижение критики к собственному состоянию было у 5 (20%) пациентов. Анозогнозия выявлялась в 2 (8%) случаях.

Речевые расстройства наблюдались у 18 (72%) больных, из них по типу дизартрии у 8 (44,4%) больных, афазии у 10 (55,6%) больных, преимущественно по типу сенсо-моторной (70% больных). Нарушение полей зрения в виде гемианопсии было у 2 (8%) пациентов. Расходящийся страбизм с диплопией был у 3 (12%) больных. Бульбарные расстройства выявились лишь в 1 случае. У 32% больных определялся псевдобульбарный синдром. У большинства пациентов наблюдались рефлексы орального автоматизма.

У всех пациентов наблюдались двигательные нарушения, из них неравномерный гемипарез был у 12 (48%) пациентов, у 13 (52%) был равномерный гемипарез. Степень снижения силы мышц в пораженных конечностях у больных с гемипарезами варьировала от легкой до выраженной: у 7-х (28%) - 4 балла (легкий гемипарез); у 14 (56%) – 3 балла (умеренный гемипарез) и у 4-х (16%) – 2 балла (выраженный гемипарез).

Чувствительные расстройства (гемигипестезия) наблюдалась у 16 (64%) пациентов.

Выраженные вестибулярные нарушения (головокружение, рвота) были у всех больных с ИИ в ВББ.

### **Неврологическая характеристика больных с тяжелой степенью ишемического инсульта**

В данной подгруппе ИИ развился в правом каротидном бассейне у 12 (57,1%), в левом каротидном бассейне у 7 (33,3%), у 2 (9,5%) поражение обоих каротидных бассейнов.

Угнетение сознания было у 17 (81%) пациентов, из них оглушение у 58,8% больных, сопорозное и коматозное состояние у 41,2% пациентов.

Психомоторное возбуждение характеризовалось резким повышением двигательной активности и отмечалось у 3 (14%) больных.

Нарушения речи по типу дизартрии отмечались у 2 (9%) пациентов, сенсо-моторная афазия у 4 (19%) больных. У 5 (24%) больных наблюдался корковый парез взора.

Двигательные нарушения были представлены гемипарезом у 4 (19%) больных без нарушения сознания. Глубокий гемипарез был у большинства больных - 75% (сила мышц – 1-2 балла). Пирамидная симптоматика в виде спастичности, повышения мышечного тонуса, оживления рефлексов, наличия патологических рефлексов были у всех пациентов в состоянии сопора и комы. Гемигипестезия определялась у 6 (28,5%) больных.

Признаки отека головного мозга с дислокационным синдромом наблюдались у 6 (28,6%) больных, приведшие к летальному исходу.

### **Когнитивные нарушения у пациентов с ТИА и подтипами ИИ**

Нарушение когнитивных функций по результатам шкалы MoCA выявлялось у 42 (25,8%) больных с ИИ, среди них преобладали больные с КЭИ – 59,5% и 40,5% с АТИ. У больных с ТИА у 13 (8%). Не удалось провести тестирование у 30 (18,4%) больных из-за выраженных речевых нарушений или изменений сознания. Не имели КН 78 (47,8%) больных.

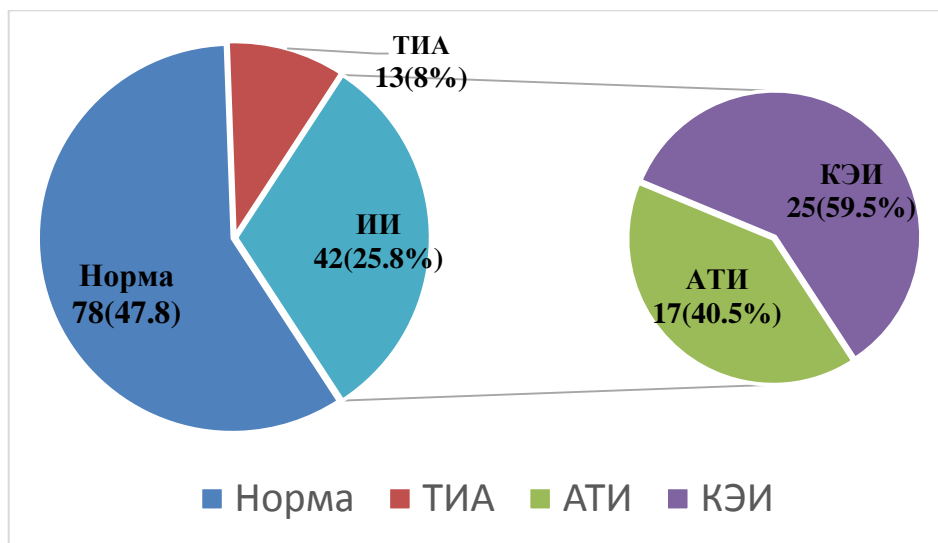


Рисунок 2 - Состояние когнитивных функций у больных ТИА и подтипов ИИ

### **Лабораторно-инструментальные методы исследования**

Липидограмма характеризовалась повышением уровня холестерина в крови у 28 (17,2%) пациентов с АТИ, у 19 (11,7%) больных с КЭИ, у 32 (19,6%) пациентов с ТИА. Показатели уровня холестерина у пациентов с АТИ были достоверно выше относительно пациентов с КЭИ ( $p=0,016$ ). Уровень триглицеридов, ЛПНП, ЛПВП, коэффициента атерогенности в группах не показал достоверной разницы.

Таблица 4 - Данные липидограммы

Подтипы ИИ и ТИА	Среднее значение показателей липидограммы (ммоль/л)				
	Холестерин	Триглицериды	ЛПНП	ЛПВП	Коэффициент атерогенности
АТИ (n=51)	5,95±1,65	1,76±1,12	3,48±1,46	1,33±0,37	3,38±1,22
КЭИ (n=60)	5,04±1,49	1,58±0,87	3,05±1,36	1,23±0,33	3,2±0,86
ТИА (n=52)	5,6±1,21	1,47±0,80	3,38±1,16	1,53±0,85	3,49±1,07

Показатели коагулограммы свидетельствовали о наличии коагулопатии у 42 (25,8%) пациентов. Отмечалось у 10 (23,8%) повышение ПТИ, у 9 (21,4%) – гиперфибриногенемия, у 4 (9,5%) повышение АЧТВ, у 17 (40,5%) повышение РФМК. Среднее значение показателя МНО у больных с АТИ составило  $1,09 \pm 0,032$ , у больных с КЭИ  $1,17 \pm 0,048$ .

В рамках нашего исследования проводился анализ содержания С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови, который вырабатывается в печени, является признаком острого воспалительного ответа и представляет собой широко изученный системный маркер воспаления. Наибольшее значение СРБ наблюдалось в группе с АТИ -  $40,42 \pm 7,69$  мг/л. Значение СРБ было достоверно ниже у больных с ТИА -  $22,80 \pm 4,17$  мг/л ( $p=0,035$ ) и КЭИ -  $21,00 \pm 3,00$  мг/л ( $p=0,030$ ). Это свидетельствует о роли воспаления в патогенезе АТИ, а повышение СРБ рассматривается как маркер ИИ. Наименьшее количество СРБ наблюдалось в контрольной группе -  $7,36 \pm 1,58$  мг/л (Рисунок 3).

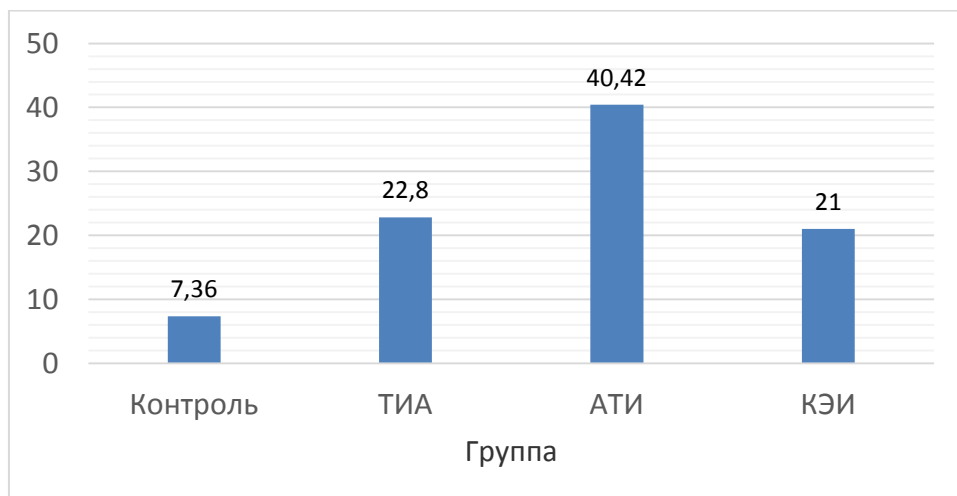


Рисунок 3 - Среднее количество СРБ у больных с ТИА и подтипами ИИ (мг/л).

По результатам электрокардиограммы гипертрофия миокарда левого желудочка (ЛЖ) была у 75% больных. Различные формы нарушения ритма сердца определялись у 41,7% больных. Всем больным выполнялась эхокардиография: гипертрофия левого предсердия наблюдалась у 72 (44%) пациентов, причем у большинства из них (68%) с фибрилляцией предсердий. Гипокинезия сегментов ЛЖ была у 42 (26%) больных, преимущественно в группе КЭИ - 67% случаев, гипертрофия миокарда ЛЖ наблюдалась у 123 (75%) больных. Патология клапанов сердца отмечалась у 11 (6,7%) больных (митрального клапана у 8, аортального клапана у 3 больных). Признаки дилатационной кардиомиопатии были у 3 (1,8%), уплотнение аорты у 86% больных, нарушения диастолической функции левого желудочка у 17% больных.

Всем больным проводилось дуплексное сканирование магистральных артерий головы (УДС). Клинически значимый ипсилатеральный стеноз артерий каротидного и вертебро-базиллярного бассейнов у больных с АТИ был у 37 (72,5%) больных и у 14 (27,5%) больных окклюзия магистральных артерий головы (внутренняя сонная, позвоночная, подключичная артерии). Клинически значимый стеноз на противоположной стороне очага ИИ был у 2 больных с КЭИ. У больных с ТИА клинически значимый стеноз ВСА определялся у 8 (15,4%) на стороне заинтересованного артериального бассейна. Клинически значимый стеноз у больных с КЭИ и ТИА наблюдался достоверно реже относительно больных с АТИ ( $X^2=80,47$ ;  $p=0,001$ ).

Всем больным выполнялась компьютерная томография головного мозга (КТ), в том числе перфузионная КТ. Определялась площадь пенумбры, инфаркта и области ишемии в целом, а также абсолютные и относительные количественные показатели мозгового кровотока в них.

У пациентов с ТИА (n=52) очагов на КТ не обнаружено.

У 68 (61,2%) больных с ИИ определялись очаги инфаркта, из них:

- при АТИ у 33 (65%) больных,
- при КЭИ у 35 (58%) больных.

У 43 (38,7%) пациентов на момент исследования очаговых изменений на КТ не выявлено, из них:

- с АТИ 18 (35%) больных,
- с КЭИ 25 (42%) больных.

Локализация очагов: у 31 (46%) правосторонние полушарные очаги инфаркта; у 21 (31%) больного левосторонние полушарные очаги; у 16 (23%) очаги в вертебробазиллярном бассейне. По локализации очага в головном мозге было выявлено: корково-подкорковые очаги встречались наиболее часто у 39 (57,3%) больных, подкорковые инфаркты мозга выявлены у 19 (27,9%) больных, корковые у 10 (14,7%) пациентов. Подкорковые инфаркты мозга характерны для пациентов с КЭИ, корковые очаги для пациентов с АТИ, корково-подкорковые очаги встречались в обеих группах.

По величине очаги инфарктов были распределены на обширные, большие и средние (Таблица 5).

Таблица 5– Распределение больных в зависимости от величины очага на КТ

Величина инфаркта	АТИ (n=33)	КЭИ (n=35)
Обширный	8 (24,3%)	3 (8,6%)
Большой	11 (33,3%)	7 (20%)
Средний	14 (42,4%)	25 (71,4%)

Величина средних очагов инфаркта у больных с лёгкой степенью тяжести ИИ не превышала 16-21мм. У 57,6% пациентов с АТИ преобладали обширные и большие инфаркты корковой и корково-подкорковой локализации. У больных с КЭИ - средние инфаркты, преимущественно подкорковой локализации. Обширные очаги инфаркта были выявлены у 11 (16,1%) пациентов, большой – у 18 (26,5%), средний – у 39 (57,4%) больных.

### **Результаты молекулярно-генетических исследований**

В патогенез ишемии головного мозга вовлечены различные молекулярно-генетические механизмы, которые обуславливают формирование различного типа заболевания (ТИА, АТИ и КЭИ). С целью изучения роли гена CD46 и микроРНК в развитии ИИ нами проведен молекулярно-генетический анализ экспрессии гена CD46 и регулирующих его экспрессию микроРНК (miRNA185, miRNA19a, miRNA20a).

При исследовании уровня экспрессии гена CD46 у пациентов с ТИА и в зависимости от подтипов ИИ статистически значимых различий в сравнении с контролем не выявлено.

Учитывая, различия в патогенетических механизмах развития ТИА и ИИ у мужчин и женщин, нами проведен анализ зависимости экспрессии гена CD46 и микроРНК (miRNA185, miRNA19a, miRNA20a) от половой принадлежности.

Установлено, что наблюдалась различная экспрессия гена CD46 в контрольной группе мужчин и женщин. Экспрессии гена у мужчин составила (-1,23), а у женщин показатель был выше 1,16, но разница оказалась не достоверной.

Уровень экспрессии гена CD46 у мужчин с ТИА был выше 0,19 группы контроля (-1,23) (U=12, p=0,094), а у женщин, напротив, ниже значения контрольной группы: (-0,75) и 1,16 соответственно (U=12, p=0,088). В обеих сравниваемых группах различия не достигли уровня статистической значимости.

При анализе экспрессии гена CD46 в группе больных с АТИ изменения оказались статистически достоверными: у мужчин наблюдалось значительное повышение экспрессии данного гена до 7,18, что достоверно выше

относительно группы контроля (-1,23) ( $U=33$ ,  $p=0,031$ ). Аналогично с группой ТИА у женщин экспрессия гена CD46 была достоверно ниже в сравнении с контрольной группой: (-2,11) и 1,16 соответственно ( $U=1$ ,  $p=0,019$ ). Полученные результаты могут объясняться различными патогенетическими механизмами развития ТИА и АТИ у мужчин и женщин. Уровень экспрессии гена CD46 у мужчин и женщин в группе больных КЭИ был статистически не значимым.

Анализ ассоциативных связей между уровнем экспрессии гена CD46 и наличием КН у мужчин и женщин показал достоверное повышение уровня экспрессии гена CD46 у лиц женского пола с наличием когнитивных расстройств (1,85) по сравнению с группой контроля (1,16)  $U=7$ ,  $p=0,042$ .

Уровень представленности транскриптов miRNA185 существенно различался при разных подтипах ИИ (Рисунок 4).

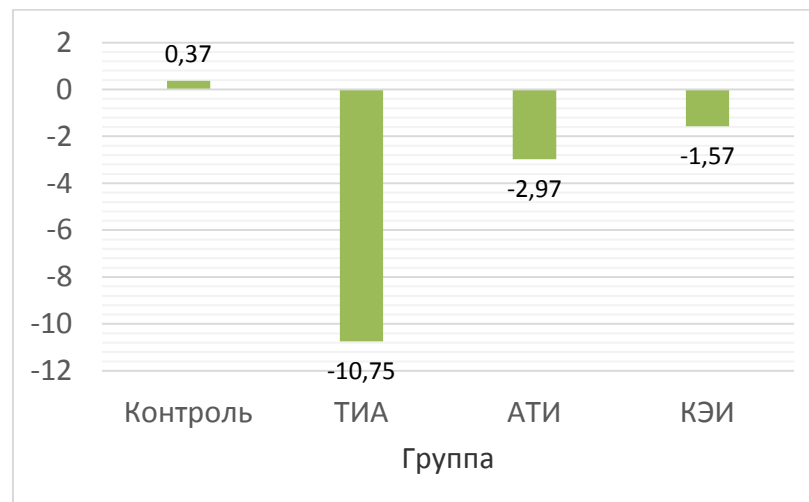


Рисунок 4 - Уровень представленности транскриптов miRNA185 у пациентов с ТИА и подтипами ИИ.

Таким образом, низкий уровень экспрессии miRNA185 наблюдался в группе больных ТИА (-10,75), промежуточное положение занимали больные с АТИ (-2,97) и наиболее высокие значения данного показателя наблюдались у больных с КЭИ (-1,57) ( $F=4,6$ ;  $p=0,004$ ).

Количество транскриптов miRNA185 у больных ИИ не было связано с полом.

Оценка зависимости экспрессии микроРНК185 от тяжести заболевания показала, что при легкой степени тяжести ИИ существенно снижается уровень транскриптов miRNA185 (-7,5), а при средней и тяжелой степени он повышался до 1,1 ( $t=-2,49$ ,  $p=0,007$ ).

Уровень представленности транскриптов miRNA19a существенно различался в группах больных. Наиболее низкий уровень экспрессии miRNA19a наблюдался в группе больных ТИА (-11,09), промежуточное положение занимали больные с АТИ (-4,26) и наиболее высокие значения были у больных с КЭИ (-1,49) ( $F=5,15$ ;  $p=0,003$ ) (Рисунок 5).



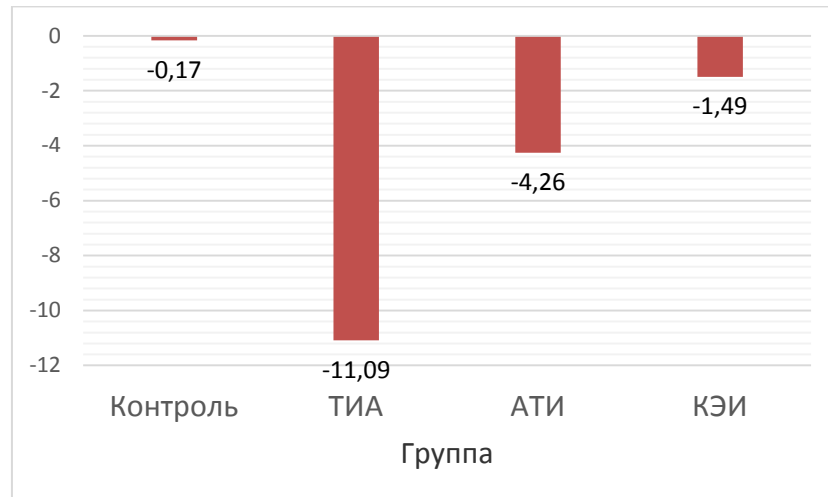


Рисунок 5 -Уровень представленности транскриптов miRNA19a у пациентов с ТИА и подтипами ИИ.

В зависимости от пола: уровень экспрессии miRNA19a изменился только у мужчин с АТИ (-5,39) – это ниже, чем, у женщин (-1,11), но различия статистически не достоверны ( $F=2,15$ ;  $p=0,12$ ). Статистически значимой была разница между уровнем экспрессии miRNA19a при легкой степени тяжести инсульта (-8,1) относительно с подгруппами средней и тяжелой степенью ИИ, где значения были выше (-0,9) ( $t=-3,10$ ,  $p=0,003$ ). Наблюдалась зависимость уровня представленности транскриптов miRNA19a от наличия КН без учета половой принадлежности. У больных без КН наблюдался сниженный уровень экспрессии miRNA19a (-10,38) относительно того же показателя у больных с КН (-2,12) ( $p=0,042$ ).

Уровень представленности транскриптов miRNA20a существенно различался при разных подтипах заболевания. Так, наиболее низкий уровень экспрессии miRNA20a наблюдался в группе больных ТИА (-8,32), промежуточное положение занимали больные с АТИ (-3,22) и наиболее высокое значение данного показателя наблюдалось у больных с КЭИ (-1,66) ( $F=3,55$ ;  $p=0,018$ ) (Рисунок 6).

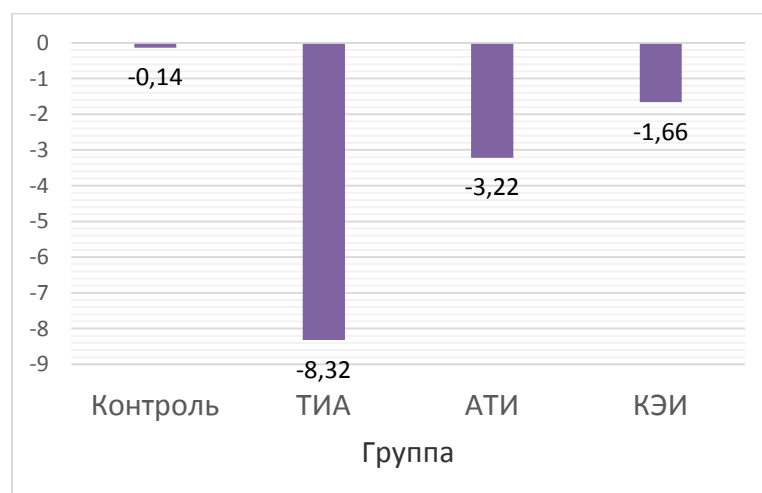


Рисунок 6 -Уровень представленности транскриптов miRNA20a у пациентов с ТИА и подтипами ИИ.

В зависимости от пола: изменения уровня экспрессии miRNA20a были только в группе с АТИ у мужчин (-4,39) – это ниже, чем, у женщин (-0,14), но различия статистически не достоверны ( $F=2,89$ ;  $p=0,09$ ).

Надо отметить, что одним из механизмов регуляции экспрессии гена CD46 является связывание его мРНК с miRNA20a, что приводит к снижению экспрессии гена CD46. Поскольку при АТИ воспалительные реакции играют одну из определяющих ролей, происходит снижение количества miRNA20a и, как следствие, экспрессия гена CD46 увеличивается.

Статистически значимой была разница между уровнем экспрессии miRNA20a при легкой степени тяжести инсульта (-6,9) и подгруппами средней степени тяжести (-1,6) и тяжелым ИИ, где значение уровня экспрессии miRNA20a было самым высоким 1,42 ( $F=4,05$ ,  $p=0,023$ ) (Рисунок 7).

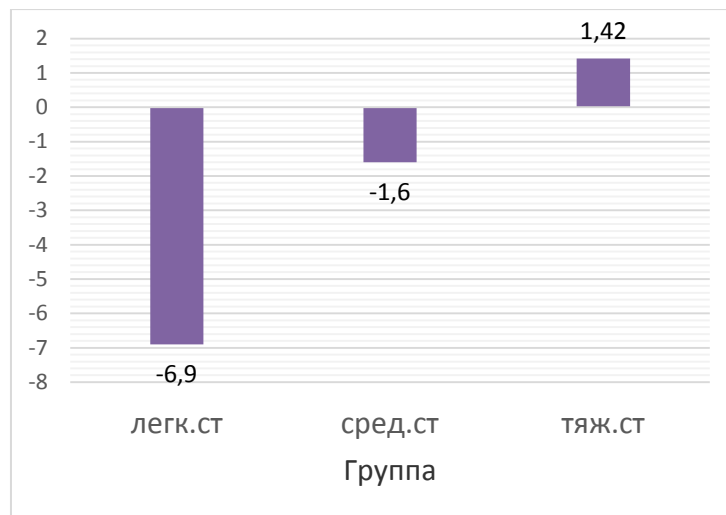


Рисунок 7 -Уровень представленности транскриптов miRNA20a в зависимости от тяжести заболевания.

Наблюдалась зависимость уровня представленности транскриптов miRNA20a от наличия КН. У больных с КН уровень экспрессии miRNA20a был выше (-1,5) относительно группы больных без КН (-7,5) ( $p=0,021$ ). Подобная картина наблюдалась при сравнении групп пациентов с нарушением глотания и без него. Так, у больных без нарушения функции глотания наблюдалась пониженная экспрессия miRNA20a, которая составляла (-5,9), тогда как в группе больных с нарушением глотания экспрессия miRNA20a составляла (-0,34) ( $p=0,04$ ).

Исследовалась зависимость уровня транскриптов miRNA20a от наличия очага инфаркта на КТ: при отсутствии очага кратность экспрессии miRNA20a была ниже (-8,6), при его наличии этот показатель повышался до(-0,5)  $t=-3,41$ ,

$p=0,002$ . Это может объясняться взаимодействием со второй цепью микроРНК20а - геном нейрогенина 1 (Ngn1). Продукт гена Ngn1 участвует в пластичности и регенерации при повреждениях головного мозга. В проведенных ранее исследованиях было показано, что экспрессия данной микроРНК значительно увеличивается при повреждении спинного мозга у мышей. Искусственное введение miRNA20а в неповрежденный спинной мозг вызывало гибель нервных клеток, похожую на эффект от травмы мозга. По-видимому, данные показатели связаны с подавлением экспрессии гена Ngn1 с помощью miRNA20а.

В нашем исследовании была показана статистически значимая связь транскриптов miRNA20а с локализацией очага ИИ. Так, у больных с нарушением кровообращения в вертебробазиллярном бассейне наблюдалась более низкая экспрессия данного гена по сравнению с ОНМК в каротидном бассейне ( $p=0,035$ )

При проведении корреляционного анализа Пирсона между уровнем экспрессии miRNA20а и тяжестью состояния по различным шкалам были показаны статистически значимые зависимости.

Так уровень представленности транскриптов miRNA20а коррелировал со степенью тяжести инсульта по шкале Рэнкин ( $r=0,311$ ,  $p=0,022$ ), индекса мобильности Ривермид ( $r=0,340$ ,  $p=0,012$ ). Уровень экспрессии повышался при более тяжелом течении заболевания. При сравнении тяжести по шкале Ашфорд также наблюдалась статистически значимая корреляция ( $r=0,270$ ,  $p=0,049$ ).

Прогнозирование степени тяжести ИИ основано на количественном анализе miRNA20а.

При кратности экспрессии miRNA20а относительно экспрессии GAPDH от (-25) до (-5,0) прогнозируют легкую степень тяжести инсульта, при уровне от (-5,0) до 0 – среднюю степень тяжести, при значениях выше от 0 до 25 прогнозируют тяжелую степень тяжести (Рисунок 8).



Рисунок 8 - Модель прогнозирования степени тяжести ИИ по кратности экспрессии miRNA20а относительно экспрессии GAPDH.

В результате молекулярно-генетических исследований различных форм ИИ и наличия осложнений на основе анализа экспрессии гена CD46 и

регулирующих его микроРНК (miR19a, 20a, 185) было показано активное участия данных механизмов в патогенезе ИИ. Количество мРНК CD46 и транскриптов изучаемых микроРНК зависело от вовлеченности воспаления эндотелия в процесс, наличия деструктивных повреждений в головном мозге и активации гена Ngn1. В целом было показано, что изученные молекулярно-генетические маркеры могут быть использованы в качестве биомаркеров дифференциальной диагностики различных подтипов ИИ.

## ВЫВОДЫ

1. Клинико-неврологическая картина больных с ИИ характеризовалась более тяжелым течением заболевания при АТ подтипе: средне – тяжелое и тяжелое течение ИИ у 52,1%. Среди больных с повторным ОНМК (n=38) – повторный АТИ был у 16 (42,1%) больных, из них в анамнезе в 78,1% случаев прослеживались ТИА.

У больных с КЭИ заболевание характеризовалось более легким течением (58,5%). Однако, в этой группе больных было больше случаев когнитивных нарушений – 59,5%.

Определены различия основных факторов риска ИИ: при АТ подтипе в 100% случаев выявлялся атеросклероз и в 39,7% - курение; у пациентов с КЭИ основными факторами являлись АГ (90%), ИБС с нарушением ритма по типу ФП (76,7%) и ожирение (39,7%).

2. Лабораторные, инструментальные и нейровизуализационные методы исследования у пациентов с АТИ характеризовались гиперхолестеринемией, клинически значимым стенозом МАГ, преобладанием обширных и больших очагов инфаркта на КТ, с локализацией в корково-подкорковых и в корковых структурах головного мозга.

У пациентов с КЭИ в основном нормальные значения холестерина, нарушение ритма сердца по ЭКГ и холтеровскому исследованию, преобладание ишемического очага на КТ среднего объема, а по локализации в подкорковых структурах головного мозга.

Установлено достоверное преобладание количества С-реактивного белка в сыворотке крови больных с АТ подтипом ИИ - 40,4 мг/л по сравнению с КЭИ – 21 мг/л и ТИА – 22,8 мг/л, что свидетельствует о роли воспаления в патогенезе ИИ, а наличие СРБ рассматривается как маркер ИИ.

3. Определение уровня экспрессии гена CD46 установило его существенное снижение у лиц женского пола и повышение у лиц мужского пола при АТИ.

4. Установлена ассоциация количества транскриптов miRNA185, miRNA19a и miRNA20a. Так, в группе больных ТИА наблюдалось снижение данных показателей. Промежуточное положение занимали больные с АТ подтипом ИИ. Наиболее выраженная экспрессия miRNA185, miRNA19a и miRNA20a наблюдалась у больных с КЭ подтипом ИИ.

5. Определено, что кратность экспрессии miRNA19a и miRNA20a оказалась существенно выше при средней и тяжелой степени тяжести инсульта, особенно, при наличии когнитивных расстройств, что позволило разработать модель прогнозирования.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Наряду с клинико-лабораторными показателями у больных с ИИ необходимо проводить определение уровня С-реактивного белка в сыворотке крови, как маркера ИИ, а его повышение может свидетельствовать о большей вероятности АТ подтипа ИИ.

2. Анализ экспрессии транскриптов miRNA185, miRNA19a и miRNA20a рекомендуется использовать для дифференциации подтипов ИИ: повышение экспрессии будет характерно для больных с КЭ подтипом ИИ, а сниженное для АТ подтипа ИИ.

3. Анализ экспрессии miRNA19a и miRNA20a рекомендуется использовать для прогнозирования степени тяжести ИИ и для выявления наличия когнитивных нарушений.

### **СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Минибаева. Г.М. «Реабилитация двигательных функций у больных перенесших церебральный инсульт, с использованием роботизированного комплекса ЛОКОМАТ». / Г.М. Минибаева, Л.Б. Новикова, А.П. Акопян, К.М. Шарапова. // **Физиотерапия, бальнеология, реабилитация**. 2013. - №5- С.50-51.
2. Минибаева. Г.М. «Роль микроРНК в патогенезе ишемического инсульта». /Л.Б.Новикова, Г.М.Минибаева. // **Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова**. 2018. -Т. 118. -№3-2. -С. 43-47.
3. Минибаева. Г.М. «Реабилитация больных перенесших церебральный инсульт» /Л.Б.Новикова, А.П.Акопян, Г.М.Минибаева. //электронный вариант Вестник БГМУ №1 (приложение). 2013г. –С. 1211-1216.
4. Минибаева. Г.М.«Реабилитация двигательных функций у больных перенесших церебральный инсульт, с использованием роботизированного комплекса ЛОКОМАТ». /Г.М. Л.Б.Новикова, А.П.Акопян, К.М. Шарапова, Г.М.Минибаева. //В сборнике: Материалы международного конгресса «Нейрореабилитация-2013» М. 2013.-С. 195-196.
5. Минибаева. Г.М. «Роль микроРНК в развитии ишемического инсульта». /Л.Б.Новикова, Г.М.Минибаева. //В сборнике: Материалы III Национального конгресса «Кардионеврология» 2018. -С. 148.

6. Минибаева. Г.М. «Генетические биомаркеры различных подтипов ишемического инсульта». /Г.М. Минибаева, Л.Б. Новикова, Т.В. Викторова. // **Фарматека**. 2020.-Т. 27(3).-С. 96–99.
7. Минибаева. Г.М. «Роль длинных некодирующих РНК в ишемическом инсульте». /Л.Б.Новикова, И.Ф.Гареев, А.А.Раскуражев, О.А.Бейлерли, Г.М.Минибаева. // **Анналы клинической и экспериментальной неврологии**. 2020.-Т.14 (1).- С.70–77.
8. G.M.Minibaeva “A Role of MicroRNA in the Pathogenesis of Ischemic Stroke”. /L.B. Novikova G.M.Minibaeva. // **ECNeurology** 11.12 (2019).- P.01- 07.

#### **Патент РФ на изобретение:**

1. Минибаева Г.М. Способ диагностики степени тяжести ишемического инсульта./ Л.Б. Новикова, Г.М.Минибаева, К.В.Данилко. // Патент РФ на изобретение №2712105; МПК G01N 33/50 (2006.01) от 24.01.2020, Бюл. №3.

#### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- АГ – артериальная гипертензия
- ИИ – ишемический инсульт
- КТ – компьютерная томография
- ЛКБ – левый каротидный бассейн
- ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения
- ПКБ – правый каротидный бассейн
- п.н. – пар нуклеотидов
- ПЦР – полимеразная цепная реакция синтеза ДНК
- ФП – фибрилляция предсердий
- ЭКГ – электрокардиография
- ЭхоКГ – эхокардиография
- FR - кратность изменения нормализованной экспрессии