

Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака

На правах рукописи

ФИЛИМОНОВ ДМИТРИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ

УДК 616.441-008+616.831:616.13/.14]-612.6.05-001.8

**ВЛИЯНИЕ ТИРЕОИДНОГО ГОМЕОСТАЗА НА ТЕЧЕНИЕ И ИСХОД
ОСТРОЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИИ: КЛИНИКО-
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И АНАЛИЗ
ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОРРЕЛЯЦИЙ**

14.01.11 – Нервные болезни

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Экземпляр идентичен всем
существующим у ученого
секретаря Диссовета Д 01.026.06

Научный консультант:
доктор медицинских наук, профессор,
Евтушенко Станислав Константинович

Ученый секретарь Коценко Ю.И.

Донецк – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	21
1.1. Эпидемиологические сведения о цереброваскулярной патологии и современные подходы к ее лечению	21
1.2. Основные процессы-мишени для потенциальных нейропротекторов при церебральной ишемии	24
1.2.1. Окислительный стресс.....	24
1.2.2. Процессы клеточной гибели, индуцированные ишемией	27
1.2.3. Воспалительные процессы в ЦНС.....	29
1.3. Биологические эффекты тиреоидных гормонов, обосновывающие возможность их применения с целью нейропротекции	31
1.3.1. Роль тиреоидных гормонов в развитии головного мозга	32
1.3.2. Принципы обмена йодотиронинов.....	35
1.3.3. Транспорт тиреоидных гормонов в центральную нервную систему	39
1.3.4. Основные механизмы действия тиреоидных гормонов в центральной нервной системе	40
1.3.5. Нейропротекторное действие йодтиронинов.....	44
1.3.5.1. Влияние йодотиронинов на окислительный стресс	44
1.3.5.2. Влияние йодотиронинов на процессы апоптоза и нейропластичность.....	48
1.3.5.3. Влияние йодотиронинов на ангиогенез и тромбоцитарный гемостаз.....	52
1.3.5.4. Влияние йодотиронинов на процессы воспаления в ЦНС	54
1.3.6. Молекулярные механизмы действия тиронаминов.....	55
1.3.7. Влияние тиронаминов на ЦНС	58

1.4. Клинические исследования нейропротекторных эффектов йодотиронинов...	60
1.5. Значение полногеномного поиска ассоциаций в области цереброваскулярной патологии	62
1.6. Менделевская рандомизация как метод поиска новых факторов, влияющих на риск и исход цереброваскулярной патологии	67
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	76
2.1. Объем и методы клинического этапа исследования	76
2.1.1. Общая характеристика изучаемого контингента пациентов	76
2.1.2. Клинические методы исследования	78
2.1.3. Инструментальные методы исследования.....	82
2.1.4. Лабораторные методы исследования	83
2.1.5. Методы статистической обработки данных	85
2.2. Методы экспериментального этапа исследования	89
2.2.1. Методика синтеза и характеристики 4-[4-(2-аминоэтокси)бензил]анилина (CA-T0AM).....	90
2.2.2. Экспериментальное моделирование острой полушарной ишемии головного мозга	93
2.2.3. Способы оценки поведенческих нарушений и неврологического дефицита в экспериментальной модели инсульта	94
2.3. Общая характеристика методов мета-анализа генетических корреляций	100
ГЛАВА 3. КЛИНИКО-НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОСТРОГО ПЕРИОДА ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА У ИССЛЕДУЕМОГО КОНТИНГЕНТА ПАЦИЕНТОВ	102
3.1. Общие клиничко-неврологические характеристики исследуемого контингента пациентов	102

3.2. Характеристики ишемического инсульта в зависимости от тиреоидного профиля (дисперсионный анализ)	110
---	-----

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ТИРЕИОДНЫХ ГОРМОНОВ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ, ТЯЖЕСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ИСХОД ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

117

4.1. Неврологические и инструментальные характеристики пациентов с острым ишемическим инсультом в зависимости от уровня свободного трийодтиронина	117
---	-----

4.2. Выбор ведущих показателей тиреоидного статуса и других факторов, влияющих на тяжесть и функциональный исход ишемического инсульта (корреляционный и унивариантный анализ)	120
--	-----

4.3. Влияние маркеров тиреоидного статуса на тяжесть неврологического дефицита в остром периоде ишемического инсульта в многофакторной модели	125
---	-----

4.4. Влияние тиреоидных гормонов на функциональный исход ишемического инсульта в многофакторной модели	128
--	-----

4.5. Разработка прогностической модели влияния тиреоидных гормонов на функциональный исход ишемического инсульта с применением машинного обучения	136
---	-----

ГЛАВА 5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА ТИРОНАМИНА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА.....

141

5.1. Определение оптимальной однократной дозы синтетического аналога тиронамина.....	141
--	-----

5.2. Анализ гипотермических эффектов синтетического аналога тиронамина на фоне действия других индукторов гипотермии.....	144
---	-----

5.3. Анализ воздействия синтетического аналога тиронамина на поведенческие функции и неврологический дефицит в модели ишемического инсульта.....	147
5.4. Анализ активности антиоксидантных систем в ткани головного мозга в модели ишемического инсульта	161
5.5. Разработка водорастворимых форм синтетических аналогов тиронамина ...	165
ГЛАВА 6. МЕТА-АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОРРЕЛЯЦИЙ МЕЖДУ ТИРЕОИДНЫМ СТАТУСОМ, РИСКОМ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ ИСХОДОМ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	171
6.1. Анализ причинно-следственной связи между уровнем свободного трийодтиронина и риском неблагоприятного исхода инсульта.....	171
6.2. Анализ взаимосвязи промежуточных фенотипов, ассоциированных с апоптозом, с тиреоидным статусом и функциональным исходом ишемического инсульта.....	178
6.3. Взаимосвязь генетически прогнозируемого уровня селена и риска неблагоприятного исхода ишемического инсульта.....	183
6.4. Анализ влияния экспрессии генов дейодиназ (DIO2) и рецепторов тиреоидных гормонов В (ThRB) на фенотипы, ассоциированные с апоптозом, риском и исходами ишемического инсульта.....	191
6.5. Идентификация генов, регулируемых тиреоидными гормонами и влияющих на функциональных исход инсульта.....	194
6.6. Анализ профиля циркулирующих мРНК, ассоциированных с генами, контролируемые тиреоидными гормонами у пациентов с ишемическим инсультом.....	200

6.7. Анализ экспрессии в плюрипотентных стволовых клетках T3-регулируемых генов, ответственных за нейрогенез, в условиях гипоксии и нормоксии	208
6.8. Анализ генетических корреляций между тиреоидным статусом и нарушениями мозгового кровообращения по геморрагическому типу	215
ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	220
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	249
ВЫВОДЫ	251
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	255
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	256
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	258
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	260
ПРИЛОЖЕНИЕ	310

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность научного исследования

Согласно данным многочисленных клинических исследований, наиболее эффективным методом лечения острого ишемического инсульта является восстановление церебрального кровотока методом системного тромболизиса [197]. Однако проведение тромболитической терапии возможно только в пределах узкого (3-3,5 часа) терапевтического окна, кроме того, данный метод лечения сопряжен с относительно высоким риском геморрагических осложнений [218]. В случаях, когда тромболизис не показан или отсутствуют возможности для его проведения, современные подходы к ведению пациента в острейший период инсульта включают как вторичную профилактику цереброваскулярной патологии, так и попытку уменьшить выраженность неврологического дефицита путем терапевтического воздействия на ишемизированную (но потенциально жизнеспособную) ткань мозга в зоне пенумбры [91]. Тем не менее, несмотря на многообразие нейропротекторных препаратов, различных по механизму действия и эффективных в доклинических исследованиях, ни один из них не обладает достаточной клинической эффективностью. В связи с этим, поиск новых подходов к нейропротекции остается важнейшей задачей современной нейрофармакологии [313].

Выживаемость ткани мозга в условиях ишемии напрямую зависит от интенсивности метаболизма в ней, потребности в кислороде, а также в способности сохранять окислительно-восстановительный потенциал и поддерживать синтез макроэргических соединений. Механизм действия большинства нейропротекторов имеет в своей основе воздействие на данные процессы [23; 253; 294].

В течение последних десятилетий особое внимание уделяется нейропротекторным свойствам эндогенных молекул, таких как VEGF, эритропоэтин, мозговой нейротрофический фактор и др. [88; 201; 290]. Известно,

что особое значение в регуляции интенсивности метаболических процессов в большинстве органов и тканей, в том числе и в ЦНС, имеет система тиреоидного гомеостаза [7; 321; 425].

Тиреоидный гомеостаз – это сложная нейроэндокринная и эпигенетическая система, обладающая многоуровневой ауторегуляцией, которая включает гипоталамо-гипофизарно-тиреоидную ось, процессы контроля транспорта тиреоидных гормонов в ткани-мишени, их внутриклеточную биотрансформацию, активацию внутриклеточных и мембранных рецепторов, модуляцию широкого спектра сигнальных путей и влияние на экспрессию множества генов [246]. Высокоселективное воздействие на компоненты данной системы в различные фазы острой церебральной ишемии представляется эффективным инструментом для осуществления нейропротекции, стимуляции нейропластичности и нейрореинтеграции, а также для улучшения функциональных исходов острых нарушений мозгового кровообращения [13].

Трийодтиронин, как активная форма гормона щитовидной железы – тироксина, способен разобщать тканевое дыхание и окислительное фосфорилирование. Данный процесс приводит к нарушению функционирования цикла Кребса, снижению выработки АТФ, гипертермии и имеет потенциально негативный эффект при острой церебральной ишемии [284]. С другой стороны, известно, что трийодтиронин обладает рядом нейропротекторных эффектов – он способствует захвату астроцитами нейротоксичного глутамата, стимуляции работы Na^+/K^+ мембранных каналов в нейронах, восстановлению внутриклеточного рН [3; 8; 87]. Селективное терапевтическое воздействие на тиреоидный обмен (стимуляция или ингибирование функции тиреоидных гормонов) является перспективной потенциальной мишенью для новых подходов в лечении инсульта.

Степень разработанности темы исследования

Согласно данным экспериментальных исследований, ТГ ассоциированы с более благоприятным функциональным восстановлением при введении до или в течение первых часов после экспериментальной ишемии или черепно-мозговой травмы [133; 395]. Доказаны краткосрочные эффекты тиреоидных гормонов при острой церебральной ишемии, направленные на подавление глутамат-ассоциированной эксайтотоксичности [8; 321]. Однако долгосрочные эффекты ТГ во время фазы восстановления после инсульта остаются в значительной степени неизвестными. Предполагается, что тироксин и 3-трийодтиронин могут активно участвовать в процессах восстановления после инсульта, поскольку они играют важную роль в механизмах развития мозга, обеспечивая пролиферацию, миграцию и дифференцировку нейронов, рост нейритов, синаптическую пластичность, ветвление дендритов и контроль над процессами миелинизации [321; 410]. Также ТГ важны для нормального функционирования головного мозга у взрослого человека, поскольку нейрональная пластичность и нейрогенез в значительной степени зависят от уровня Т3 [46, 73].

Дейодированные метаболиты тиреоидных гормонов – тиронамины Т0АМ и Т1АМ, способны проникать через ГЭБ, что открывает доступ к головному и спинному мозгу их синтетическим аналогам, вводимым в системный кровоток. Исследователями было показано протекторное воздействие Т1АМ при повреждении различных органов и тканей, в частности, миокарда и головного мозга. Механизмы, посредством которых Т0АМ и Т1АМ реализуют свои эффекты, до конца неясны. Они не взаимодействуют с рецепторами к ТГ, но обладают высокой аффинностью к рецептору, ассоциированному со следовыми аминами-1 (TAAR1), расположенному на поверхности клеточной мембраны. В ответ на введение грызунам Т1АМ у них развивается существенное снижение температуры – эффект, наблюдаемый даже у линий мышей с нокаутированным геном рецептора TAAR1 и опосредуемый, по всей вероятности, через

ингибирование митохондриальных функций [81]. Выраженное гипотермическое действие биогенных аминов, реализуемое на центральном уровне, в сочетании с низким риском развития осложнений делает их перспективными кандидатами на роль новых эффективных нейропротекторов [300].

В течение последних лет в литературе появляется все больше публикаций о возможном влиянии тиреоидного обмена на риск развития, течение и исход острого ишемического инсульта. Тем не менее, результаты опубликованных работ достаточно противоречивы [383]. Окончательно не известен характер влияния гипер- или гипотиреоза на течение и функциональный исход инсульта, что и послужило основанием для проведения настоящего исследования.

Цель исследования

Определить характер и направленность влияния тиреоидных гормонов, клеточных сигнальных систем, генетических и других механизмов, формирующих тиреоидный гомеостаз, на тяжесть неврологического дефицита в острый период цереброваскулярной патологии, ее функциональный исход, а также идентифицировать возможные молекулярные мишени для воздействия на них с целью улучшения исходов цереброваскулярной патологии.

Задачи исследования

1. Изучить особенности тиреоидного статуса у пациентов с острым гетерогенным ишемическим инсультом во взаимосвязи с его факторами риска и клинико-неврологическими характеристиками.

2. Определить характер влияния маркеров, отражающих тиреоидный статус, на тяжесть неврологического дефицита в остром периоде ишемического инсульта и его функциональный исход. Разработать алгоритм прогнозирования функциональных исходов острого ишемического инсульта на основании клинико-

неврологических показателей и лабораторных маркеров, отражающих тиреоидный статус.

3. Изучить биологические эффекты синтетического аналога дейодированного метаболита тиреоидных гормонов (тиронамина T0AM) у лабораторных животных.

4. В экспериментальной модели ишемического инсульта определить влияние синтетического аналога дейодированного метаболита тиреоидных гормонов (тиронамина T0AM) на выраженность неврологического дефицита, поведенческие и когнитивные функции, маркеры активности окислительного стресса в ишемизированном полушарии у лабораторных животных.

5. В ходе менделевского рандомизационного исследования на основании анализа корреляций между генетическими предикторами, ассоциированными с маркерами тиреоидного статуса и цереброваскулярными фенотипами, определить причинно-следственное влияние тиреоидного статуса на риск развития и исход цереброваскулярных заболеваний.

6. При помощи метода менделевской рандомизации исследовать промежуточные фенотипы для идентификации клеточных и генетических механизмов влияния тиреоидного гомеостаза на риск развития и исход цереброваскулярных заболеваний.

7. Разработать рекомендации по коррекции нарушений тиреоидного статуса у пациентов с острым ишемическим инсультом с акцентом на улучшение функциональных исходов инсульта.

Научная новизна работы

В ходе клинической части исследования впервые продемонстрировано независимое влияние уровня свободного трийодтиронина на тяжесть

неврологического дефицита в остром периоде гетерогенного ишемического инсульта.

Впервые установлено, что высокие уровни трийодтиронина, в том числе выше верхней границы референтного интервала, ассоциированы с менее тяжелым течением и более благоприятным функциональным исходом ишемического инсульта. Установлено, что уровень трийодтиронина является независимым фактором, влияющим на функциональный исход ишемического инсульта, в том числе по всему спектру модифицированной шкалы Рэнкина. При этом уровень тироксина не оказывает независимого влияния на тяжесть и функциональный исход ишемического инсульта, а является кофактором, модулирующим влияние уровня свободного трийодтиронина.

В ходе экспериментальной части исследования впервые установлено, что дейодированный метаболит тиреоидных гормонов (тиронамин Т0АМ) обладает широким спектром биологических и нейропротекторных эффектов.

Впервые установлено, что введение синтетического аналога тиронамина Т0АМ лабораторным животным в модели ишемического инсульта препятствует снижению уровня супероксиддисмутазы (SOD) и повышению продуктов перекисного окисления липидов в ткани ишемизированного полушария по сравнению с интактным. Впервые установлено, что путь ТААР-сигналирования, инициируемый не только Т1АМ, но и Т0АМ, запускает эндогенные антиоксидантные механизмы в условиях острой церебральной ишемии.

Впервые установлено, что введение тиронамина в условиях острой церебральной ишемии приводит к нормализации поведенческих показателей, отвечающих за уровень тревожности у лабораторных животных, улучшению показателей рабочей памяти и обучаемости по сравнению с контрольными животными, что отражает влияние процессов, активируемых ТААР-рецепторами, на механизмы постишемического нейровосстановления.

Впервые установлено, что введение синтетического аналога тиронамина приводит к различным биологическим эффектам в разные стадии острой церебральной ишемии. В острейший период (первые сутки) введение тиронамина

сопровождается седативным действием, а к концу седьмых суток ассоциируется с более выраженным восстановлением неврологических функций и активацией когнитивных способностей.

В ходе впервые проведенного анализа корреляций между генетическими предикторами, ассоциированными с маркерами тиреоидного статуса и цереброваскулярными фенотипами, выявленными в крупных когортах пациентов, установлено причинно-следственное влияние уровня свободного трийодтиронина на функциональный исход ишемического инсульта, реализуемое через генетические механизмы.

Впервые в ходе менделевского рандомизационного исследования установлен ряд механизмов влияния гипотиреоза на функциональный исход инсульта, включая повышение уровней индуцирующего апоптоз митохондриального фактора-1 и апоптогенных белков семейства BCL-2. Установлено, что эти же факторы ассоциированы с неблагоприятным функциональным исходом ишемического инсульта. Впервые в ходе анализа генетических корреляций установлено, что экспрессия гена ядерного рецептора тиреоидных гормонов В влияет на активность антиапоптогенных факторов BCL-2 и MAPK2, имеющих большое значение в выживаемости нейронов.

Впервые установлено влияние уровня селена, как фактора, необходимого для поддержания тиреоидного гомеостаза, на функциональный исход острого ишемического инсульта.

Впервые идентифицирован ряд генов, экспрессия которых контролируется тиреоидными гормонами и влияет на функциональный исход ишемического инсульта.

В ходе менделевского исследования впервые выявлены генетические ассоциации между повышением уровней трийодтиронина, тироксина и снижением риска обнаружения церебральных микрогеморрагий, интракраниальных аневризм и развития субарахноидальных кровоизлияний.

Теоретическая и практическая значимость

В ходе проведенного комплексного клинико-экспериментального исследования и анализа генетических корреляций установлено, что тиреоидные гормоны, прежде всего, трийодтиронин и его de-novo метаболит тиронамин, обладают широким спектром нейропротекторных эффектов при острой ишемии головного мозга.

Идентифицированы новые многоуровневые механизмы воздействия тиреоидных гормонов на функциональный исход инсульта, в том числе при помощи анализа промежуточных фенотипов методом менделевской рандомизации определены молекулярные механизмы, такие как подавление экспрессии проапоптогенных протеинов (AIF-1) и активация антиапоптогенных сигнальных путей, зависящих от BCL-2 и MAPK. Определена роль рецепторов тиреоидных гормонов В (ThRB) в инициации антиапоптогенных механизмов.

Установлено, что дейодированные формы тиреоидных гормонов, такие как тиронамины, представляют собой новый класс нейропротекторов, дифференцировано воздействующих на механизмы ишемического повреждения в разные фазы острой ишемии головного мозга, начиная от седативного эффекта и подавления окислительного стресса в острейшую фазу, и закачивая стимуляцией когнитивных функций и процессов регресса неврологического дефицита.

В ходе исследования предложен алгоритм прогнозирования функционального исхода ишемического инсульта для внедрения в клиническую практику, разработанный на основе технологии машинного обучения. На основании результатов исследования влияния уровня селена на функциональный исход инсульта предложен метод коррекции нарушений тиреоидного статуса у пациентов в остром периоде ишемического инсульта.

Методология и методы исследования

Методология научного исследования основана на анализе значительного объема научных трудов отечественных и зарубежных авторов в области нейропротекции, молекулярных факторов, влияющих на течение цереброваскулярных заболеваний, а также в области аналитических генетических исследований.

Методы исследования:

1. Клинический: сбор жалоб, анамнеза жизни и заболевания, наследственного анамнеза, клинико-неврологический осмотр с использованием неврологических шкал (Скандинавская шкала инсульта, модифицированная шкала Рэнкина).
2. Клинико-иммунологический:
 - а. определение уровней ТТГ, свободного тироксина, свободного трийодтиронина методом твердофазного иммуноферментный анализа;
3. Инструментальный: триплексное сканирование церебральных и прецеребральных сосудов с определением толщины комплекса интима-медиа в автоматическом режиме (аппарат «Toshiba Aplio 500»), магнито-резонансная томография головного мозга с МР-ангиографией (аппарат Амико МРF3000).
4. Экспериментальный:
 - а. Моделирование экспериментального ишемического инсульта у лабораторных животных (крысы) путем окклюзии внутренней сонной артерии;
 - б. Анализ неврологического дефицита и поведенческих реакций, показателей окислительного стресса в модели острой церебральной ишемии в контроле и на фоне введения синтетического аналога тиронамина.

5. Анализ ассоциаций между генетическими предикторами и фенотипами с использованием метода менделевской рандомизации и данных, представленных в международных генетических базах; анализ дифференциальной экспрессии генов с использованием баз данных генной антологии и анализа функционального обогащения набора генов.

Положения, выносимые на защиту

1. Воздействие тиреоидного гомеостаза на тяжесть и исходы острой цереброваскулярной патологии является многоуровневым и многокомпонентным. На гуморальном уровне регуляции наиболее значимым фактором, отражающим тиреоидный статус, является содержание свободного трийодтиронина, как независимого предиктора, влияющего на тяжесть неврологического дефицита и исход ишемического инсульта. Уровень тироксина является кофактором и имеет противоположное воздействие – его высокий уровень ассоциирован с более тяжелым течением ишемического инсульта.

2. Проведенное менделевское рандомизационное исследование на большой выборке пациентов подтверждает причинно-следственное влияние уровня свободного трийодтиронина на функциональный исход ишемического инсульта, реализуемое через генетические механизмы.

3. На клеточном уровне эффекты трийодтиронина реализуются через ряд молекулярных механизмов, один из которых связан с активацией TAAR-рецепторов. Синтетический аналог дейодированных метаболитов тиреоидных гормонов (тироамин T0AM), активирующий TAAR-рецепторы, обладает рядом уникальных нейропротекторных эффектов. Механизм нейропротекторного действия тироамина заключается в способности индуцировать гипотермию без нежелательных системных эффектов и нивелировать явления окислительного стресса, препятствуя снижению уровня супероксиддисмутазы (SOD) и повышению продуктов перекисного окисления липидов в ишемизированной ткани головного

мозга. Путь TAAR-сигналирования, инициируемый метаболитами трийодтиронина, запускает эндогенные антиоксидантные механизмы в условиях острой церебральной ишемии.

4. Активация TAAR-рецепторов дейодированными метаболитами тиреоидных гормонов приводит к различным биологическим эффектам в разные стадии острой церебральной ишемии. В острейший период (первые сутки) введение лигандов TAAR-рецепторов сопровождается седативным действием, а к концу седьмых суток ассоциируется с более выраженным восстановлением неврологических функций и активацией когнитивных способностей. В сочетании с гипотермическим и антиоксидантными эффектами, селективные лиганды TAAR-рецепторов на примере разработанного синтетического аналога тиронамина представляются перспективными нейропротекторами, дифференцированно воздействующими на процессы, которые происходят на разных стадиях церебральной ишемии.

5. Одним из механизмов влияния гипотиреоза на функциональный исход инсульта выступает активация проапоптогенных сигнальных путей, а именно, повышение уровней индуцирующего апоптоз митохондриального фактора-1 и апоптогенных белков семейства BCL-2. При этом экспрессия гена ядерного рецептора тиреоидных гормонов В влияет на активность антиапоптогенных факторов BCL-2 и MAPK2, имеющих большое значение в выживаемости нейронов.

6. Тиреоидные гормоны, прежде всего – трийодтиронин и его de-novo метаболит тиронамин, представляются перспективными нейропротекторами. Необходимы доклинические и пилотные клинические исследования, направленные на изучение возможности применения тиреоидных гормонов и их метаболитов с целью улучшения функциональных исходов инсульта.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Степень достоверности результатов проведенного исследования определяется репрезентативным объемом выборки с расчетом ее оптимального размера, применением валидированных оценочных шкал, современными методами исследования, а также обработкой полученных данных методами математической статистики и машинного обучения.

В диссертационном исследовании использован метод менделевской рандомизации для выявления причинно-следственной связи между предикторами и исходами сосудистых неврологических заболеваний. Инструментальные переменные, использованные при исследовании, извлечены из обширных международных баз данных, включающих результаты анализа миллионов генетических вариаций у тысяч индивидуумов из различных когорт.

В ходе экспериментальной части исследования были изучены биологические свойства синтетического аналога тиронамина, синтезированного в Институте физико-органической химии и углехимии им. Л.М. Литвиненко. Чистота полученной субстанции была валидирована неоднократным анализом ЯМР-спектра и спектра УФ-поглощения. При разработке субстанции были применены современные методы квантовой оптимизации геометрии молекулы.

Работа является оригинальным научным трудом.

Материалы диссертации были представлены и обсуждены II Конгрессе Европейской организации по борьбе с инсультом (European Stroke Organization Congress, Испания, 2016), XIII Всемирном конгрессе по контраверсиям в неврологии (CONY, Греция, 2017), XXIII Всемирном неврологическом конгрессе (World Neurology Congress, Япония, 2017), III Национальном конгрессе «Кардионеврология» (Москва, РАМН, 2018), Первом совместном конгрессе Европейской и Всемирной Организаций по борьбе с инсультом (The Joint European Stroke Organisation and World Stroke Organization Conference ESO-WSO 2020, Австрия, 2020), XIII Всемирном инсультном конгрессе (13th World Stroke Congress,

США-Голландия, 2021), XVI Всемирном конгрессе по контраверсиям в неврологии (CONY, Великобритания, 2022), VIII Конгрессе Европейской организации по борьбе с инсультом (European Stroke Organization Congress, Франция, 2022), XIV Всемирном инсультном конгрессе (14th World Stroke Congress, Сингапур, 2022), XXIII научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы клинической, экспериментальной неврологии, нейрохирургии, нейрофизиологии» (Казахстан, 2022), I, II, III, IV и V Международном медицинском форуме Донбасса «Наука побеждать... болезнь» (Донецк, 2017-2021); II Международной научно-практической online-конференции, посвященной 90-летию ГОО ВПО ДОННМУ ИМ М. ГОРЬКОГО «Инновационные перспективы медицины Донбасса» (Донецк, 2020).

Апробация диссертационного исследования проведена на апробационном семинаре, созданном при защитном совете Д 01.026.06 ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького» Министерства здравоохранения Донецкой Народной Республики от 30.06.2022 года (Протокол № 1).

Внедрение полученных результатов

Результаты работы внедрены и используются в отделении ангионеврологии «ИНВХ им. В.К. Гусака», неврологическом отделении Городской клинической больницы №6 г. Донецке, неврологическом отделении Дорожной клинической больницы на ст. Донецк, неврологическом отделении центральной городской больницы №17 г. Донецка, городской больницы №7 г. Макеевки, лаборатории клеточного и тканевого культивирования ИНВХ им. В.К. Гусака. Теоретические и практические материалы исследования включены в учебный процесс кафедры детской и общей неврологии факультета интернатуры и последипломного образования ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО, кафедры неврологии и медицинской генетики ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 34 печатные работ, из них в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК при Министерстве образования и науки Донецкой Народной Республики – 8, ВАК Российской Федерации – 1, ВАК Украины – 2.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автором подготовлен дизайн и комплексная программа диссертационного исследования. Самостоятельно выполнен аналитический обзор отечественной и иностранной литературы по тематике проводимого исследования. Автор принимал непосредственное участие в обследовании участников исследования, в организации и проведении инструментального, экспериментального, молекулярно-генетического исследований. Автором проведена оценка полученных данных и результатов. Автор самостоятельно провел статистическую обработку полученных данных, выполнил анализ и дал научную интерпретацию полученных результатов с формулировкой выводов и практических рекомендаций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 314 страницах машинописного текста и содержит введение, обзор литературы, 5 глав собственных исследований, обсуждение полученных результатов, выводы, практические рекомендации, указатель литературы, приложения.

Библиографический указатель включает 445 источников литературы, из них 36 – отечественных. Работа проиллюстрирована 46 таблицами и 52 рисунками.

ГЛАВА 1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Эпидемиологические сведения о цереброваскулярной патологии и современные подходы к ее лечению

Цереброваскулярная патология – гетерогенная полиэтиологичная группа заболеваний, поражающих сосуды, отвечающие за кровоснабжение головного мозга. Базисными клиническими проявлениями цереброваскулярной патологии являются острые нарушения мозгового кровообращения. Согласно общепринятой в настоящее время Международной классификации болезней 10-го пересмотра цереброваскулярные болезни включают в себя различные варианты ишемического и геморрагического инсульта, стенозирующие поражения экстра- и интракраниальных сосудов, диссекции сосудов, различные по этиологии церебральные артериопатии (болезнь Бинсвангера, амилоидная артериопатия, болезнь моямая и др.). В отдельную рубрику вынесены транзиторные ишемические атаки и лакунарные синдромы.

Инсульт и его последствия представляют собой глобальную медицинскую, социальную и экономическую проблему. Согласно опубликованным эпидемиологическим исследованиям, каждый четвертый человек в мире перенес или перенесет инсульт [190]. Показатель преждевременно утраченных лет полноценной жизни (Disability-Adjusted Life Years) вследствие инсульта по данным 2013 г. в мировом масштабе составил 113 млн лет [191]. В 2017 г. в 32 Европейских странах прямые экономические потери, связанные с инсультом, составили 60 миллиардов евро [134]. В Российской Федерации отмечается снижение заболеваемости инсультом с 2008 по 2016 г. на 45% [18], однако, суммарный экономический ущерб от болезней системы кровообращения по-прежнему велик и в 2017 г. составил около 1 трлн руб. (3% от ВВП) [20]. Несмотря на определенную

стабилизацию заболеваемости инсультом в странах с высоким уровнем доходов, абсолютная заболеваемость в мире продолжает увеличиваться.

Последние десятилетия знаменуются существенным прорывом в развитии реперфузионных методов лечения острого ишемического инсульта. Результаты большого числа рандомизированных клинических исследований и их метаанализов последовательно демонстрируют четкую картину эффективности системного тромболизиса, проведенного в течение первых 3-х часов от развития симптомов ишемического инсульта при приемлемых рисках геморрагических осложнений [83; 364]. Тем не менее, за пределами терапевтического «окна» в 4,5 часа эффективность системного тромболизиса резко снижается. Исследования с применением мультимодальных КТ и МРТ-методик для определения потенциально жизнеспособной ткани мозга в зоне пенумбры во временной интервал от 3-х до 9-часов демонстрируют обнадеживающие результаты [111]. Тем не менее, до сих пор недостаточно систематических данных для рекомендаций по расширению терапевтического «окна» основываясь на нейровизуализационных технологиях [401]. Механическая тромбэктомия позволяет преодолеть временные ограничения системного тромболизиса и добиться успешной реперфузии в пределах 6-24 часов от дебюта ишемического инсульта. Однако сравнительные исследования, такие как DIFFUSE-MT, SKIP, изучающие влияние тромбэктомии без системного тромболизиса на долгосрочные исходы инсульта по сравнению с комбинированным подходом демонстрируют противоречивые результаты [83; 86].

В целом, применение реперфузионных технологий по-прежнему сопряжено с техническими, организационными сложностями и рядом противопоказаний. В исследовании, изучавшем возможность проведения реперфузионной терапии у 2704 пациентов, поступивших в крупный инсультный центр, лишь 10,5% больных могли быть отобраны для проведения эндоваскулярной терапии согласно рекомендациям АНА/ASA, и 36,2% больных являлись кандидатами на проведение внутривенного тромболизиса [147]. В этой связи использование нейротекции для улучшения исходов острого ишемического инсульта вызывает долгосрочный интерес. Только с 2002 по 2008 годы было проведено более 1000

экспериментальных и более 400 клинических исследований, посвященных нейропротекции [309]. Однако, несмотря на многообразие предложенных фармакологических и нефармакологических (таких как терапевтическая гипотермия) методик нейропротекции, эффективность ни одной из них не была подтверждена в крупных рандомизированных исследованиях. Неудачи в попытках клинического применения нейропротекторов для улучшения исхода инсульта объясняются трансляционными ограничениями при переходе от животной модели к реальной клинической практике, высокой коморбидностью пациентов, поздним назначением нейропротекторов, сложностями в выборе конечных точек при клинических исследованиях и другими факторами [33]. Негативные результаты многочисленных исследований, изучающих возможность клинического применения нейропротекторов, нашли свое отражение в рекомендациях по лечению острого ишемического инсульта, опубликованных Американской кардиологической ассоциацией (AHA) и Европейской инсультной организацией (ESO).

И все же, принцип нейропротекции в настоящее время проходит новый этап в своем развитии [25; 291]. Все более возрастающая роль эндоваскулярных реперфузионных методик, внедрение мультимодальных методов нейровизуализации ставят перед нейропротекцией новые задачи – ограничение распространения ядра ишемии и зоны пенумбры перед проведением реперфузионной терапии для улучшения ее эффективности и расширения терапевтического окна, а также уменьшение реперфузионного повреждения после успешной реперфузии [34]. Кроме того, в течение последних лет отмечается рост заболеваемости инсультом у лиц молодого возраста в развивающихся странах, где доступность реперфузионных методов ограничена, и нейропротекция является практически единственным методом лечения инсульта в острейшую фазу [292].

В течение последних 5 лет было инициировано более 18 крупных исследований фазы II/III, посвященных нейропротекции. В одном из исследований изучались эффекты человеческой каллидиногеназы (HUK, human urinary kallidinogenase) – тканевого калликреина, полученного из мочи [209]. Данный

гликопротеин обладает способностью расщеплять низкомолекулярный белок кининоген, что приводит к образованию мощного вазодилататора – кинина, инициирующего ряд биологических эффектов. Нейропротекторные эффекты НУК реализуются через вазодилатирующие, антиоксидантные механизмы, а также путем подавления провоспалительных сигнальных путей, ассоциированных с толл-подобным рецептором 4 и ядерным фактором каппа-В (TLR4/NF-каппаВ). НУК был одобрен в КНР для лечения инсульта легкой и умеренной степени тяжести. Еще одним перспективным нейропротектором является 3К3А-активируемый протеин С – аналог эндогенной сывороточной протеазы АРС, в которой 3 остатка лизина заменены на 3 остатка аланина. Нейропротекторные механизмы 3К3А-АРС изучены недостаточно и, по-видимому, связаны с подавлением NMDAR-ассоциированной эксайтотоксичности и противовоспалительным действием [320].

1.2. Основные процессы-мишени для потенциальных нейропротекторов при церебральной ишемии

1.2.1. Окислительный стресс

Окислительный стресс представляет собой нарушение баланса между окислительно-восстановительными процессами со сдвигом в сторону окисления [374]. Данный процесс является одним из наиболее изученных патофизиологических механизмов, имеющих место при острой церебральной ишемии [19; 54]. Ввиду значительной концентрации липидов, подверженных перекисидации, высоком потреблении кислорода и высоком содержании железа, выступающего как прооксидантный фактор, головной мозг является особо чувствительным к окислительному стрессу органом [352]. Способность таких молекул, как пероксинитрит, супероксид, гидроксил-радикал повреждать внутриклеточные структуры головного мозга была неоднократно продемонстрирована в различных исследованиях. Помимо антиоксидантных

механизмов, в ответ на острую ишемию в головном мозге активируются и прооксидантные сигнальные пути. Так, избыточная активация нейрональной (nNOS) и индуцибельной (iNOS) NO-синтетазы приводит к гиперпродукции оксида азота – антиишемической (при нормальных условиях) сигнальной молекулы, но в больших концентрациях приводящей к образованию пероксинитрита и подавлению антиоксидантных сигнальных путей [262]. Кроме того, многие антиоксидантные молекулы, например, аскорбиновая кислота, одновременно обладают и прооксидантным действием.

В настоящий момент описаны четыре основных механизма против окислительного повреждения: 1) удаление ионов металлов переменной валентности; 2) поглощение реактивных форм кислорода и азота; 3) остановка цепных реакций, инициированных свободными радикалами; 4) восстановление молекул, поврежденных радикалами [210].

Значительное количество экзогенных субстанций, обладающих антиоксидантными эффектами, продемонстрировали желаемые эффекты в моделях на животных, однако, до стадии клинических исследований были допущены лишь 4 из них: NXY-059, эбселен, тирилазад и эдаравон, при этом лишь эдаравон был одобрен регулирующими органами для практического применения при ишемическом инсульте в ряде стран. Столь ограниченные успехи в попытках широкого применения антиоксидантов при лечении ишемического инсульта объясняются рядом факторов, в том числе чрезмерно оптимистичными предположениями о потенциале малых молекул в борьбе с окислительным стрессом. Большинство крупномолекулярных антиоксидантов протеиновой природы реагируют с оксидантами в тысячи и миллионы раз быстрее, чем небольшие молекулы, и обеспечивают преобладающую антиоксидантную защиту. Кроме того, чтобы быть эффективным в отношении нейтрализации свободных радикалов хотя бы на 50%, любое соединение должно присутствовать в равной или большей концентрации, чем эндогенные молекулы [169]. Таким образом, единственная эффективная стратегия предотвращения повреждения свободными радикалами — это подавление их образования. Несколько подходов в рамках

данной стратегии разрабатываются в настоящее время. К ним относятся инактивация супероксидного анион-радикала, чтобы препятствовать генерации пероксинитрита; разложение перекиси водорода без выделения гидроксильного или гидропероксильного радикалов; увеличение уровня восстановленного глутатиона путем использования его предшественников, увеличение синтеза антиоксидантных ферментов за счет активации NRF2; ингибирование НАДФН-оксидазы; активация митохондриальной антиоксидантной защиты; блокирование нарушенных окислительно-восстановительных сигнальных систем [229].

Одним из перспективных направлений в борьбе с окислительным стрессом является активация NRF2-сигналирования. Транскрипционный фактор NRF2 (фактор, связанный с ядерным фактором E2) играет основную роль в регуляции экспрессии генов, связанных с антиоксидантной защитой [263]. Изменения в NRF2-сигналировании показаны при кардиоваскулярных, онкологических и нейродегенеративных заболеваниях [171; 206; 233]. Эффективность многих из активаторов NRF2 в индукции антиоксидантных ферментов и в уменьшении окислительного повреждения была подтверждена в исследованиях на животных, также были достигнуты значительные успехи в разработке лекарств, основанных на механизме активации NRF2 и индукции антиоксидантов. В настоящее время проводятся исследования фазы I/II по применению в лечении неврологических заболеваний следующих активаторов NRF2: ресвератрол (хорея Гентингтона, эндотелиальная дисфункция), куркумин (болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, цереброваскулярные заболевания), омавелоксолон (митохондриальные заболевания, атаксия Фридрейха), диметил фурамат (рассеянный склероз), андрографолид [169].

Другими перспективными мишенями для подавления окислительного стресса являются молекулы, имитирующие СОД и каталазу, ингибиторы НАДФН-оксидазы (эбселен, CYR5099, апоцинин и GKT137831).

1.2.2. Процессы клеточной гибели, индуцированные ишемией

Экспериментальные модели инсульта демонстрируют, что большинство клеток в ранних периодах формирования пенумбры сохраняют свою жизнеспособность и могут выжить при своевременном восстановлении кровотока [349]. При критической кумуляции внутриклеточных повреждений клетки в зоне пенумбры вступают на путь запрограммированной (апоптоз) или незапрограммированной (некроз) клеточной смерти. Новейшие достижения в молекулярной биологии позволили идентифицировать иные механизмы, определяющие судьбу клетки – некроптоз и ферроптоз, кроме того, каждый из механизмов способен активировать иные. Процессы некроза обусловлены абсолютным истощением АТФ, деполяризацией клеточной мембраны, внутриклеточным накоплением осмотически активных ионов, повреждением митохондрий, цитотоксическим отеком – данные механизмы до недавнего времени считались практически неконтролируемыми [164]. Однако процессы апоптоза зависят от равновесия между про- и антиапоптогенными сигнальными путями и, по-видимому, могут быть искусственно модулированы.

Согласно классическим представлениям, процессы апоптоза и аутофагии при ишемическом инсульте активируются внутренним и внешним путями, что имеет место и при других заболеваниях ЦНС [26]. Внутренний путь апоптоза не связан с активацией проапоптогенных мембранных рецепторов и опосредован через повреждение митохондрий. Резкое повышение внутриклеточного уровня Ca^{2+} , обусловленное лактат-ацидозом и эксайтотоксичностью, приводит к активации кальпаинов и, как следствие, к превращению агониста домена смерти, взаимодействующего с ВНЗ (ВІD) в его усеченную активную форму (tВІD) [6; 280]. Проапоптогенный белок tВІD транслоцируется на мембраны митохондрий, где активирует другие проапоптогенные белки системы BCL-2, что приводит к повышению проницаемости митохондрий, выбросу цитохрома-С, активации апоптосом, белков-каспаз и необратимой деградации ДНК.

Внешний путь апоптоза инициируется в ответ на внеклеточные апоптогенные сигнальные молекулы, такие как фактор некроза опухоли-альфа, апоптоз-индуцирующий лиганд, ассоциированный с фактором некроза опухоли (TRAIL), первый апоптоз-сигналирующий лиганд (FasL). Активация рецепторов, ассоциированных с данными лигандами, приводит к накоплению в цитоплазме апоптогенных белков, таких как домен смерти, ассоциированный с рецептором к фактору некроза опухоли (TRADD) и FAS-ассоциированный белок домена смерти (FADD). Соединение FADD с прокаспазой-8 приводит к образованию смерть-индуцирующего сигнального комплекса (DISC), что в свою очередь активирует каспазу-8 и нисходящий каскад апоптоза [100].

Отдельного внимания при ишемическом инсульте заслуживает p53-опосредованный путь апоптоза. Белок p53 обладает мощным антионкогенным эффектом и участвует в поддержании целостности генетического материала, в малом количестве он экспрессируется в нейронах [79; 150; 302]. В ответ на внешние или внутренние стимулы, такие как гипоксия, оксидантный стресс, NMDA-эксайтотоксичность, p53 подвергается убиквитированию и активации. Активированный p53 запускает экспрессию проапоптогенных генов, таких как PUMA, BAX и NOXA, а также, транслоцируясь на внешнюю мембрану митохондрий, запускает внутренний путь апоптоза. Ряд сигнальных путей способен активировать p53, среди них: путь внеклеточных сигнал-регулируемых киназ, путь C-Jun-N-терминальных киназ, пути p38 и NOTCH, путь смерть-ассоциированной протеин-киназы (DAPK) [408].

В течение многих лет процесс некроза считался пассивным и неконтролируемым, в отличие от апоптоза. Однако в 2003г. на основании накопленных фундаментальных данных Chan et al. предложили термин «программированный некроз» [49]. В 2005 году Degterev et al. обнаружили, что некростатин-1 (Nec-1) может ингибировать некротическую гибель клеток головного мозга, уменьшая активность белка RIP1 рецептора-1 фактора некроза опухоли (TNFR1) и FasL [97]. Данные факты привели к введению в 2014 г. такого

термина, как «некроптоз» – механизм клеточной смерти, занимающий промежуточное положение между некрозом и апоптозом [251].

Другим недавно описанным механизмом является ферроптоз [163]. В нейрональных клетках восстановленный глутатион входит в один из важнейших механизмов нейропротекции, направленных против окислительного стресса. Механизм переноса глутамата и цистеина по принципу антипорта существует в нейронах и микроглии. Внеклеточный цистеин обменивается с внутриклеточным глутаматом, и затем превращается в белковый цистеин в реакции переноса серы. Этот цистеин работает в составе восстановленного глутатиона в качестве кофактора селено-содержащего изофермента ГПО-4, окисление селено-цистеина происходит по двум путям: 1) восстановление гидроперекисей липидов, образовавшихся при превращении перекиси водорода в молекулу воды в реакции Фентона; 2) образование окисленного глутатиона, который потом опять может быть восстановлен глутатионредуктазой. Снижение активности обоих вышеописанных ферментов повышает частоту протекания реакции Фентона, способствует накоплению избытка ионов железа, и, в конечном итоге, гибели клеток по механизму ферроптоза.

1.2.3. Воспалительные процессы в ЦНС

В нормальных условиях клетки микроглии – основные иммунокомпетентные клетки головного мозга – осуществляют контроль гомеостаза и «мониторинг» состояния паренхимы мозга [328]. В острой фазе инсульта клетки микроглии в центре поражения распознают молекулы DAMP и HMGB1 благодаря наличию Toll-подобных рецепторов (TLR). Эта связь лиганд-рецептор приводит к интернализации ядерного фактора энхенсера гена легкой цепи каппа-полипептида комплекса-ингибитора В-клеток (IкВ) в ядро и последующую активацию пути ядерного фактора энхенсера легкой каппа-цепи активированных В-клеток (NF-кВ) и, таким образом, к активации клеток микроглии [63]. В ответ на церебральную

ишемию активированные клетки микроглии продуцируют большое количество провоспалительных цитокинов, таких IL-1, IL-6, ФНО-альфа, хемокины CCL2 и CXCL10. Рост уровня цитокинов приводит к миграции циркулирующих иммунных клеток в поврежденную ткань мозга. Синтез клетками микроглии ферментов-протеаз, таких как ММП-9 и ММП-3, способствует разрушению гематоэнцефалического барьера и ассоциированного соединительнотканного матрикса, что ведет к геморрагической трансформации зоны инфаркта, а также к активации периваскулярных астроцитов. Периваскулярные астроциты экспрессируют большое количество аквапорина-4 (AQP-4), что приводит к развитию вазогенного отека. С другой стороны, гибель астроцитов ведет к уменьшению экспрессии белков «тесного контакта», что способствует расширению пространства между эндотелиоцитами и усугубляет вазогенный отек.

В течение последних лет был предложен ряд подходов к модуляции иммунного ответа при ишемическом инсульте. Одним из способов является блокирование траффика иммунокомпетентных клеток. Финголимод, входящий в группу препаратов, изменяющих течение рассеянного склероза (ПИТРС), является модулятором рецептора сфингозин-1-фосфата. Механизм действия финголимода основан на блокировании способности лимфоцитов покидать лимфоузлы, что приводит к уменьшению воспалительной инфильтрации в ЦНС. В проспективном рандомизированном клиническом исследовании, проведенном De-Cai Tian et al., продемонстрирована способность финголимода потенцировать эффективность системного тромболизиса, выполненного вне терапевтического окна [165]. Другой стратегией является блокирование активации микроглии. Миноциклин, антибиотик тетрациклинового ряда, является липофильным и хорошо проникает через ГЭБ. Миноциклин способен ингибировать микроглиальную активацию, миграцию Т-клеток, воздействовать на нейрональный апоптоз. В двух из трех проведенных пилотных исследованиях была показана безопасность и потенциальная эффективность миноциклина [224; 277; 278].

Перспективным считается применение различных аналогов эндогенных субстанций, обладающих противовоспалительным действием, таких как

интерфероны-бета и липоксины [151]. Липоксин-А4 (LXA4) — эндогенный противовоспалительный липидный медиатор, образующийся из арахидоновой кислоты в результате окисления липоксигеназой. LXA4 связывается с рецептором ALX, связанным с G-белком (FPRL1-FPR2). Рецепторы ALX обнаруживаются во многих тканях и клетках, включая нейтрофилы, моноциты, макрофаги, эндотелиальные клетки, микроглию и нейрональные стволовые клетки. Экспериментальные исследования показывают, что введение метилового эфира LXA4 (LXA4ME) снижает количество провоспалительных цитокинов, фактора некроза опухоли- α (TNF- α), интерлейкина- 1β (IL- 1β) и повышает уровень противовоспалительных цитокинов: IL-10 и трансформирующего фактора роста- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) после церебральной ишемии [252; 295]. Лечение LXA4ME после экспериментальной церебральной ишемии значительно уменьшало неврологический дефицит, размер зоны некроза, а также подавляло процессы апоптоза нейронов, вызванные ишемическим повреждением [362].

1.3. Биологические эффекты тиреоидных гормонов, обосновывающие возможность их применения с целью нейропротекции

При анализе основных векторов развития фармакологической нейропротекции в течение последних 15 лет, отмечается смещение акцента в сторону различных эндогенных субстанций и их синтетических аналогов, в том числе и структурно модифицированных. Головной мозг является особо чувствительным к ишемии органом, и многочисленные эндогенные противоишемические механизмы были сформированы в ходе филогенеза. Несмотря на то, что большинство данных механизмов активируются при инсульте естественным путем, их активность, вероятно, возможно потенцировать искусственно.

1.3.1. Роль тиреоидных гормонов в развитии головного мозга

Ключевая роль тиреоидных гормонов в развитии и функционировании центральной нервной системы была продемонстрирована в ходе многочисленных исследований [66]. При изучении пациентов с врожденным гипотиреозом и далее в ходе экспериментальных работ была показана особая чувствительность фетальной нервной системы к тиреоидным гормонам [321]. Данный факт обуславливает долгосрочный интерес к изучению потенциальных нейротропных эффектов тиреоидных гормонов. Во время формирования головного мозга гормоны щитовидной железы влияют на широкий спектр процессов развития, таких как миелинизация, дифференцировка, миграция нейронов и глиальных клеток. Было установлено, что гены, участвующие в этих процессах, регулируются гормонами щитовидной железы.

Большинство данных о роли тиреоидных гормонов в развитии головного мозга получены, преимущественно, в ходе исследования мозга грызунов. Несмотря на то, что процессы нейрогенеза у человека существенно отличаются от таковых у других биологических видов, базисные механизмы являются общими и позволяют экстраполировать полученные данные на человека. Очевидно, что материнские тиреоидные гормоны имеют решающее значение для раннего коркового нейрогенеза, миграции и созревания нейронов в течение первого триместра беременности, когда происходит развитие мозга плода. Йодотиронины обнаруживаются в эмбрионе головного мозга человека еще до формирования щитовидной железы плода, которое происходит на 11-12-й неделе беременности и сопровождается началом секреции тироксина на 16-й неделе [22]. Экспериментальный материнский гипотиреоз у крыс приводит к нарушению созревания у эмбрионов коры головного мозга, гиппокампа, преимущественно за счет снижения экспрессии транскрипционных факторов Pax6, Tbr2, при этом данные процессы происходят еще до начала функционирования собственной щитовидной железы эмбриона [266]. Эксперименты на амфибиях показывают, что

локально введенный трийодтиронин регулирует нейрогенез на стадиях развития, имеющих отношение к формированию нервных цепей, влияя на пролиферацию и дифференцировку клеток, а также воздействуя на нейроны, стимулируя развитие дендритов [379].

Тиреоидные гормоны влияют на нейрогенез преимущественно через взаимосвязь с ядерными рецепторами тиреоидных гормонов (TR), регулирующих экспрессию генов. Экспрессия данных рецепторов отличается в различные гестационные периоды. Рецепторы TR-альфа (TR α) экспрессируются практически в 80% ткани фетального головного мозга начиная в периоды от 8-й до 10-й недели гестационного развития, однако, в дальнейшем экспрессия снижается на более поздних стадиях развития мозга. Исследования крыс на моделях с исключением экспрессии гена TR α 1 демонстрируют нарушение роста дендритов и развития аксонов в ГАМК-ергических интернейронах, имеющих ключевое значение для ранней организации нейронных цепей [384]. TR β 1 экспрессируется в более поздние периоды гестационного развития, при этом экспрессия остается стабильной [84]. Нарушение фоллиации и ламинарной организации мозжечка, задержка дифференцировки клеток Пуркинью и гранулярных клеток, аномальный дендритогенез и сниженная экспрессия генов мозжечка были описаны у мышей с мутациями TR β [166].

Совершенствование диагностических подходов привело к увеличению выявляемости врожденного гипотиреоза до 1 случая на 2000 новорожденных в течение последних десятилетий [16; 426]. Однако, несмотря на раннее и адекватное лечение, у пациентов с тяжелой формой врожденного гипотиреоза все еще могут наблюдаться когнитивные и моторные нарушения. Трансплацентарное поступление материнского T4 может защитить мозг плода от тяжелых неврологических нарушений, вместе с тем, его количество может быть недостаточным. У детей с врожденным гипотиреозом отмечается уменьшенный объем гиппокампа и нарушение морфологии коры различных областей мозга (истончение или утолщение), что может объяснить специфические нарушения памяти, речи, сенсомоторной и зрительно-пространственной функции [106].

Несмотря на раннюю и адекватную заместительную терапию L-тироксином, легкие и субклинические нарушения слуха регистрируются примерно у 20–25% подростков с врожденным гипотиреозом, при этом риск умеренного нарушения слуха в 3 раза выше, чем в общей популяции [158]. В большинстве случаев врожденный гипотиреоз вызывается дефектами самой щитовидной железы (первичный гипотиреоз). Причины первичного врожденного гипотиреоза можно классифицировать как дисгенезию щитовидной железы или неспособность структурно нормальной щитовидной железы вырабатывать необходимое количество тиреоидных гормонов (дисгормоногенез) [99]. Генетически обусловленные варианты врожденного гипотиреоза, ассоциированные с неврологическими синдромами, представлены в таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Клинико-генетические ассоциации, сопровождающиеся неврологическими проявлениями при различных типах врожденного гипотиреоза [106; 321; 426]

Тип гипотиреоза	Мутация гена	Неврологические проявления
Первичный врожденный гипотиреоз	NKX2–1	Хорея, мышечная гипотония
	GLIS3	Задержка психомоторного развития
	SLC26A4	Сенсо-невральная тугоухость
	TBL1X	Нарушения слуха
Центральный врожденный гипотиреоз	HESX1	Гипоплазия зрительного нерва
	LHX3	Сенсо-невральная тугоухость, аномалии позвоночника
	LHX4	Аномалии развития мозжечка
	OTX2	Микро- или анофтальмия, судороги
Тиреоидный дисгормоногенез	Pendrin	Нарушения слуха, увеличенный вестибулярный акведук (EVA)
	NIS	Задержка психомоторного развития
	IYD	Задержка психомоторного развития

1.3.2. Принципы обмена йодотиронинов

В ответ на нейрогуморальные стимулы щитовидная железа секретирует в кровь тироксин, который по своей химической природе является тетраiodтиронином (T_4) [244]. Далее происходит превращение тироксина в активную форму – свободный трийодтиронин (T_3) под действием дейодиназ двух типов: Д1 и Д2, которые замещают атом йода во внешнем кольце. Замещение йода может происходить и во внутреннем кольце T_4 , под действием дейодиназ Д1 и Д3, в результате чего образуется реверсивный T_3 (rT_3) [32].

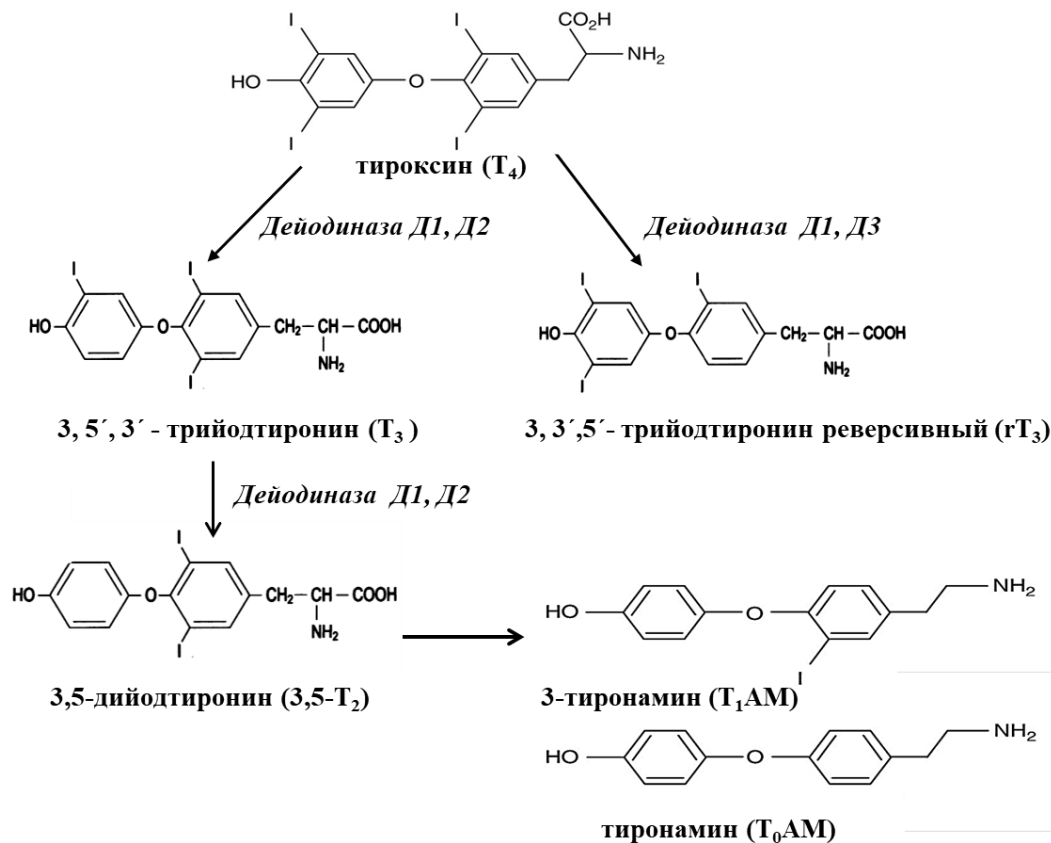


Рисунок 1.1 – Схема метаболизма тироксина

Дейодиназа Д1 имеет низкое сродство к субстрату, экспрессируется в печени, почках и щитовидной железе. Доказано, что циркулирующий в крови T_3 образуется главным образом под ее действием [422].

Дейодиназа Д2 имеет высокое сродство к T_4 (в 100 раз выше, чем у Д1) и считается ключевым ферментом в метаболизме йодтиронинов [239]. Ген Д2

экспрессируется в многих тканях, в частности в нервной и костной, а также в скелетной мышце. Изучена роль Д2 в гипофизе и в гипоталамусе в процессах нейроэндокринной регуляции по принципу обратной связи. Репрессия транскрипции гена β -цепи ТТГ происходит после связывания T_3 с тиреоидными рецепторами (ТР) в ядре клеток гипофиза. Доказано, что большая часть молекул T_3 образуется непосредственно внутри гипофизарных клеток из T_4 под действием дейодиназы Д2 [415]. Хотя трийодтиронин из кровяного русла также может связываться с ТР гипофиза, но его вклад в процессы регуляции транскрипции ТТГ значительно меньше. Так, в экспериментах на мышах введение свободного T_3 подавляло синтез ТТГ только у тех животных, у которых отсутствовал ген Д2, при этом введение T_4 данным животным не оказывало никакого влияния на гипофиз [361]. Следовательно, можно утверждать о существовании прямой корреляции между уровнем T_4 и активностью Д2 и обратной корреляции по отношению к концентрации ТТГ.

Нормальный физиологический уровень T_3 внутри клеток поддерживается согласованной работой двух дейодиназ: Д2 и Д3. И если Д2 отвечает за образование T_3 из T_4 , то дейодиназа Д3 отщепляет атом йода с внутреннего кольца T_3 , и таким образом его инактивирует [423]. Исследована важнейшая роль Д3 в плаценте, матке, развивающемся эмбрионе. Данная дейодиназа присутствует на поверхности практически каждого человеческого плода, где происходит соприкосновение с амниотической жидкостью. Таким образом, обеспечивается автономия процессов дифференцировки тканей плода от влияния материнских гормонов. В эксперименте на мышах с отсутствующим геном фермента Д3 свободный доступ материнских йодтиронинов во время эмбрионального развития приводил к полной разбалансировке нейроэндокринной регуляции в постнатальном периоде [416].

Важной особенностью всех трех дейодиназ является то, что они относятся к селенопротеинам. Обнаружено, что при состояниях селенодефицита у экспериментальных животных происходит перераспределение селена в мозг и эндокринные железы из других органов и половых желез, при этом активность дейодиназ Д2 и Д3 остается на нормальном уровне [238].

Еще в 50-х годах прошлого века предсказывалось существование метаболитов йодтиронинов – тиронаминов, которые образуются в результате реакций дейодирования и декарбоксилирования гормонов, однако, серьезные исследования этих производных начались только в 2010-х годах [398]. Группой ученых были синтезированы методами органического синтеза L-тиронамин и его моно-, ди-, три- и тетраiod-производные, после чего была изучена способность данных веществ связываться с ассоциированными с G-белком рецепторами (GPCR) и стимулировать накопление цАМФ в культуре человеческих эмбриональных клеток почки (НЕК) [40]. Таким образом был открыт 3-йодотиронамин (T_1AM). Расчет среднеэффективной концентрации (ED_{50}) обнаружил самую высокую аффинность именно для этого вещества, определенная активность регистрировалась и у L-тиронамина (T_0AM), но величина ED_{50} при его взаимодействии с рецепторами была на порядок ниже. При изучении избирательности связывания с рецепторами была выявлена селективность взаимодействия данных веществ исключительно с рецепторами следовых аминов (TAAR1). Сейчас роль TAAR1 в биологическом действии T_1AM и T_0AM считается доказанной, тогда как данные о влиянии тиронаминов на клетки путем связывания с α_{2A} -адренергическими рецепторами и участие G_i-белков еще предстоит исследовать [324]. Также дальнейшего исследования требует вопрос идентификации трансмембранных переносчиков тиронаминов в клетки, поскольку пока они остаются неизвестными [318].

Присутствие T_1AM в ткани мозга крыс было зафиксировано методом жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии [404]. К преимуществам метода масс-спектрометрии относится высокая разрешающая способность, позволяющая точно идентифицировать структуру молекулы, поэтому использование данного метода исчерпывающе подтверждало факт эндогенного происхождения молекул именно T_1AM в мозге животных [404]. Однако дальнейшее использование масс-спектрометрии для количественного определения T_1AM в других тканях животных и в сыворотке крови человека выявило значительные сложности, связанные с невозможностью полной экстракции из

тканей молекул T_1AM , связанных с белками [343]. Было опубликовано несколько работ, в которых T_1AM в сыворотке крови человека определялся методом масс-спектрометрии в пиколярных концентрациях [29], или вообще не определялся [58].

Настоящим прорывом для дальнейшего изучения роли тиронаминов стало внедрение иммунологического метода количественного определения T_1AM с использованием принципов хемилюминесцентного иммуноферментного анализа при помощи мышинных моноклональных антител [154]. В результате были получены данные о наномолярных концентрациях T_1AM в сыворотке крови человека. Доказано, что в сыворотке крови людей свободный T_1AM практически не обнаруживается, поскольку транспортируется в комплексе с АпоВ-100 белком [340].

Еще одним дискуссионным вопросом остается реакция декарбоксилирования йодтиронинов. Первое предположение об участии декарбоксилазы ароматических L-аминокислот в данном процессе в дальнейших исследованиях не нашло подтверждения [130]. В 2015 году Hoefig C.S. et al. было опубликовано исследование, в котором были представлены доказательства возможности декарбоксилирования T_4 и 3,5-дийодтиронина ($3,5-T_2$) под действием орнитиндекарбоксилазы в слизистой кишечника мышей [82]. Авторы работы исходили из факта, что препараты T_4 назначаются перорально, соответственно их эффективность может быть связана с процессами метаболизма в кишечнике. Под действием дейодиназ Д1 и Д2 тироксин последовательно превращается в $3,5-T_2$, который затем вступает в реакцию декарбоксилирования при участии орнитиндекарбоксилазы, в результате чего образуется 3,5-дийодтиронамин ($3,5-T_2AM$). Далее дейодиназы Д1 и Д3 участвуют в превращении $3,5-T_2AM$ в T_1AM . Однако орнитиндекарбоксилаза может напрямую взаимодействовать с T_4 с образованием тетраiodтиронамина (T_4AM), поэтому для окончательного выяснения пути метаболизма T_4 в кишечнике необходимы дальнейшие исследования.

Открытым остается вопрос образования тиронаминов в других органах и тканях, например в щитовидной железе и головном мозге. Высказывалось предположение о возможном участии гистидиндекарбоксилазы нейронов в реакции декарбоксилирования йодтиронинов, но пока никаких подтверждений не получено [219].

1.3.3. Транспорт тиреоидных гормонов в центральную нервную систему

Биодоступность тиреоидных гормонов для головного мозга зависит от ряда факторов, таких как, регуляция их фракций, связанных с белками плазмы, активность переносчиков тиреоидных гормонов через гематомозговую и гематоликворный барьеры, активность специфических мембранных переносчиков в нейронах и нейроглии, активность процессов внутриклеточной дейодинации [139; 345]. Концентрация тиреоидных гормонов в центральной нервной системе составляет лишь 20% от концентрации в сыворотке, что в большей степени обусловлено ограничением прохождения тиреоидных гормонов через гематоэнцефалический барьер [132]. Транспорт тиреоидных гормонов через гематоэнцефалический и гематоликворный барьеры регулируется рядом белков, наибольшее значение из которых имеют монокарбоксилатные транспортеры 8 и 10 (MCT-8, MCT-10), а также белки семейства органических анион-транспортирующих пептидов, преимущественно – OATP1A2 и OATP1C1 [249]. Белки OATP1A2 и OATP1C1 экспрессируется, в основном, в мозговых капиллярных эндотелиоцитах, кроме того, OATP1C1 также экспрессируется в различных отделах головного мозга. Все эти транспортеры имеют значительно более высокую аффинность к T4 по сравнению с T3. Вместе с тем, данные ряда исследований демонстрируют, что экспрессия OATP1C1 у человека значительно ниже, чем предполагалось ранее на основании данных, полученных на грызунах, и, по-видимому, MCT-8 играет основную роль в транспорте тиреоидных гормонов [125]. Мутации гена MCT-8 проявляются мышечной гипотонией, нистагмом,

нарушением слуха, а также задержкой психомоторного развития (синдром Аллана-Герндона-Дадли).

Учитывая, что в структурной основе йодотиронинов лежит тирозин, предполагается также возможность переноса йодотиронинов пермеазами – ион-независимыми переносчиками крупных нейтральных аминокислот. Белок LAT1 системы L1 (System L1, в первую очередь, переносящая лейцин) является одним из главных транспортеров аминокислот через ГЭБ, высоко экспрессирующийся в астроцитах. Кроме того, белки системы T (System T, в первую очередь, переносящая триптофан) также могут участвовать в переносе йодотиронинов. Вероятно, обе системы обладают большей аффинностью к T3 по сравнению с T4 [249; 363].

1.3.4. Основные механизмы действия тиреоидных гормонов в центральной нервной системе

Согласно современным представлениям, основные эффекторные механизмы тиреоидных гормонов реализуются через активацию ядерных рецепторов тиреоидных гормонов (nuclear thyroid receptor, nTR), подобно действию стероидных гормонов. Гены THRA и THRB кодируют альфа и бета изоформы ЯРТГ, в результате альтернативного сплайсинга формируется ряд изоформ ЯРТГ, из которых $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 3$ функционально активны в отношении тиреоидных гормонов как лигандов [31].

Действие ЯРТГ обусловлено их связью с элементами отклика гормона – специальными последовательностями в ДНК, которые присутствуют в большинстве регуляторных генов и состоят из двух полусайтов, каждый из которых сформирован консенсусным мотивом AGGTCA. Большинство элементов отклика тиреоидных гормонов являются прямыми повторами этой консенсусной последовательности [80]. В основном, элементы отклика тиреоидных гормонов являются «положительными» регуляторами, в которых транскрипция активируется

ЯРТГ, соединенными с ТЗ, и подавляется рецепторами, свободными от ТЗ. Транскрипционная активность ЯРТГ также регулируется коактиваторами и корепрессорами. Большинство коактиваторов способны соединяться не только с различными ядерными рецепторами, но и с другими транскрипционными факторами, что вызывает большое разнообразие биологических эффектов, зачастую противоположной направленности. Не активированные ЯРТГ, связанные с «положительными» элементами отклика, входят в состав белковых комплексов, включающих корепрессоры, такие как ядерный корепрессор (NCoR) и сайленсинг-медиатор (SMRT). Репрессия ядерных рецепторов данными медиаторами является критически важной для эмбрионального развития головного мозга [104].

В 2015г. F. Chantonnet et al. на основании метаанализа большого количества экспериментальных исследований разработали обширный компендиум генов, включающий 734 гена в головном мозге, регулируемых тиреоидными гормонами [94]. Согласно другому исследованию, из 15000 генов, экспрессируемых в кортикоцеребральных клетках мышей, тиреоидные гормоны регулируют экспрессию 1145 генов. Основные гены в нейронах головного мозга, регулируемые тиреоидными гормонами, представлены в таблице 1.2. Анализ онтологии идентифицированных генов показал, что ТЗ увеличивает экспрессию генов, участвующих в мембранных процессах, таких как активность G-протеинов, передача сигналов нейротрансмиттеров и модуляция рецепторов эфрина. Таким образом, ТЗ регулирует процессы, связанные с клеточной дифференцировкой, миграцией и коммуникацией, тогда как негативная регуляция связана с ядерными процессами, вовлеченными в митоз и конденсацию хромосом [76].

Таблица 1.2 – Гены и соответствующие биологические процессы в клетках головного мозга, регулируемые тиреоидными гормонами [60; 395]

Биологические процессы	Гены (номенклатура HUGO)
Активность транскрипционных факторов	RORa, Krox-24, hairless, THRP, Oct-1, TR-b, bZIP, GR, VTEB, c-myc
Внутриклеточные сигнальные молекулы	CaMKIV, RC3, Rhes

Внеклеточные молекулы	сигнальные	Antiotensinogen, VIP, galanin, enkephalin, dynorphin, oxytocin
Синтез нейротрофинов и экспрессия рецепторов нейротрофинам	и к	BDNF, NT-3, NGF, p75NGFR, trk C
Синтез нейротрансмиттеров		ChAT, GS, prostaglandin D synthase, Na, K-ATPase, Srgl
Процессы миелинизации		MBP, PLP, MAG, CNP, MAL
Процессы в митохондриях		ND3, ND4, COXI, COXII, cytochrome oxidase subunits IV and VIc, KIAAO179, 125 and 165 rRNA, apocytochrome b
Синтез белков аксонов и дендритов	и	GAP-43, actin, tubulin, tau, neurofilaments, NACM, tenscin-C, laminin, reelin, dab1
Выживание нейронов, нейрогенез		BCL-2
Ангиогенез		VEGF
Синаптическая пластичность		Neurogranin
Процессы в клетках Пуркинье		PCP-2, calbindin, IP3 receptor
Другие гены		Creatine kinase B, protein disulfide isomerase, NAT-1, GLUT-1, type 2 deiodinase

Транскрипционные (геномные) механизмы действия тиреоидных гормонов являются значительно более изученными, однако, негеномные механизмы также имеют важнейшее биологическое значение. Эффекты тиреоидных гормонов, не затрагивающие клеточное ядро, транскрипцию и трансляцию генов, реализуются в течение нескольких минут после активации рецепторов, расположенных на клеточной мембране, в цитоплазме или в митохондриях [35]. Данные рецепторы могут иметь гомологичное сходство с ЯРТГ или существенно отличаться, например, как интергин $\alpha\beta3$. Регулируемые геномными и негеномными эффектами тиреоидных гормонов биологические процессы могут совпадать, в частности, активация рецепторов интегрин $\alpha\beta3$ ассоциирована с увеличением экспрессии генов, ответственных за клеточную пролиферацию и ангиогенез. Рецептор интегрин $\alpha\beta3$ состоит из 2-х доменов: S1 домен связывается исключительно с T3 и активирует сигнальный путь фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), тогда как S2 домен связывается как с T3, так и с T4 (с большей

аффинностью), и активирует сигнальный путь митоген-ассоциированной протеинкиназы (МАРК). Данные домены регулируют активность важнейших белков, таких как натрий-водородный антипортер I (регулятор внутриклеточного рН), Ca^{2+} -АТФ-азу, Na, K-АТФ-азу. В нейронах трансмембранный ток натрия регулируется данными механизмами [439].

Большинство транскрипционных эффектов тиреоидных гормонов реализуются через Т3, транскрипция лишь небольшого количества генов регулируется Т4. Негеномные механизмы активируются как Т3, так и Т4, а также другими формами тиреоидных гормонов. В отличие от Т3, реверсивный Т3 и Т4 обладают способностью модулировать такие процессы, как полимеризация актина и внеклеточное расположение ламинина – белка внеклеточного матрикса, играющего основную роль в миграции нервных клеток [116].

В экспериментальных исследованиях Martin et al. показали, что Т3 обладает способностью напрямую связываться с ионотропными GABA-рецепторами, обеспечивая бифазную модуляцию тока хлоридов в синаптонейросомах. Локальное введение Т4 приводило к ингибированию возбуждающих потенциалов в зубчатой извилине и активации перфорантного пути – одного из важнейших компонентов формирования долгосрочной памяти. Кроме того, в 2011 г. Сао et al. продемонстрировали быстрый электрофизиологический ответ пирамидных нейронов на действие Т3 [241]. Гормоны щитовидной железы также модулируют активность AMPA-рецепторов, каинатных рецепторов глутамата, а также ионотропных рецепторов ГАМК – основного тормозного нейротрансмиттера ЦНС. Данная модуляция осуществляется разными механизмами, в частности, через регуляцию уровня глутамата, активности процессов синтеза и деградации ГАМК, а также через ее высвобождение и обратный захват нейронами [85].

1.3.5. Нейропротекторное действие йодтиронинов

Первые сообщения о выраженном падении уровня общего и свободного T_3 в сыворотке крови при критических состояниях у пациентов, ранее не страдавших заболеваниями щитовидной железы, стали появляться несколько десятилетий назад. При этом концентрация T_4 и ТТГ оставалась в пределах нормы или изменялась незначительно. Для выявленного нейроэндокринного нарушения было предложено несколько терминов, наиболее точным из которых считается «синдром нетиреоидных заболеваний» (СНТЗ) [59; 423]. В ходе экспериментальных исследований описана связь исходов церебральной ишемии с морфологическими характеристиками щитовидной железы, а также структурные изменения вещества головного мозга при гипотиреозе [14; 30; 36]. В течение последующих лет было опубликовано большое количество фундаментальных исследований, поддерживающих теорию регуляции йодотиронами ионных каналов на плазматической мембране клеток большинства тканей. Накопленные данные свидетельствуют о наличии у тиреоидных гормонов эффектов, значительную часть из которых можно интерпретировать как нейропротекторные [285].

1.3.5.1. Влияние йодотиронинов на окислительный стресс

Одним из главных эффектов тиреоидных гормонов является относительное ускорение основного обмена, что приводит к интенсификации как анаболических, так и катаболических реакций. Данный процесс сопровождается увеличением продукции активных форм кислорода, однако, эта взаимосвязь имеет нелинейный и органоспецифический характер. С одной стороны, стимуляция ТТГ способствует возрастанию коэффициента фосфорилирования за счет увеличения расщепления АТФ различными энергозатратами, при этом увеличивается доступность АДФ и снижается продукция активных форм кислорода. В то же время, ТТГ стимулируют синтез компонентов дыхательной цепи, что усиливает редокс-потенциал и увеличивает продукцию активных форм кислорода. Кроме того, повышение уровня

ТГ модифицирует состав мембранных фосфолипидов, увеличивая степень ненасыщенности, особенно в митохондриальных мембранах, что делает их более восприимчивыми к атаке свободных радикалов [35].

Разнонаправленное действие тиреоидных гормонов на оксидантный стресс нашло свое отражение в результатах экспериментальных исследований [3]. В литературе имеются данные, что гипотиреоз способствует как увеличению окислительного повреждения кислород-чувствительных клеток [212], так и защите от окислительного стресса [3; 10; 35; 385]. В целом, несмотря на ряд контраверсий, считается, что гипертиреоз приводит к увеличению продукции активных форм кислорода, а гипотиреоз – к уменьшению их продукции, но вместе с тем и к снижению антиоксидантной активности [419].

Многие механизмы поражения тканей-мишеней при тиреотоксикозе связывают с окислительным стрессом. Гормоны щитовидной железы, являясь окислителями благодаря наличию фенольной группы, могут непосредственно вызывать повреждение ДНК [129]. Кроме того, гормоны щитовидной железы повышают экспрессию гена NO-синтетазы, что вызывает увеличение синтеза оксида азота и провоспалительных цитокинов, способствуя окислительному стрессу [418]. С другой стороны, механизмы, управляемые тиреоидными гормонами, осуществляют регуляцию окислительного статуса посредством обратной связи [3]. Среди данных механизмов подчеркивается роль разобщающих белков 2 и 3 (IUC-2 и UCP-3), обладающих антиоксидантными свойствами. Однако, по-видимому, только Т3 обладает способностью регулировать активность UCP [391]. Кроме того, Т3 участвует в элиминации митохондрий, поврежденных окислительным стрессом, через воздействие на коактиватор гамма-1 рецептора пероксисом [138].

Головной мозг имеет высокую дыхательную активность, в разы превышающую другие метаболически активные органы, такие как печень. Исследования показывают, что индукция гипотиреоза оказывает депрессивное влияние на различные аспекты метаболизма головного мозга. У крыс со сниженной активностью щитовидной железы наблюдается снижение утилизации глюкозы и

активности Na^+/K^+ -АТФазы в различных областях мозга [419]. В то же время большое количество исследований демонстрируют влияние гипотиреоза на активность антиоксидантных систем в головном мозге. В научном анализе экспериментальных исследований по данному вопросу, проведенном I. Villanueva et al., показано снижение уровня супероксиддисмутазы, каталазы, а также повышение ТБК-активных продуктов в митохондриях, коре, стволе головного мозга и в мозжечке в экспериментальной модели гипотиреоза у новорожденных и взрослых особей крыс [419].

Церебральные митохондрии являются одной из мишеней для тиреоидных гормонов. Данные экспериментальных исследований демонстрируют, что достаточные уровни ТГ поддерживают митохондриальную целостность. Известно, что при гипотиреозе изменяется морфология митохондрий, происходит их увеличение, повышение вакуолизации, уменьшение количества крист и потеря трансмембранного потенциала [350]. В то же время в течение последних лет появляется все больше данных о существовании различных фракций митохондрий в головном мозге, обладающих разной чувствительностью к триггерам. Полученные данные позволяют четко дифференцировать две фракции митохондрий: в телах нейрональных и глиальных клеток, и в синапсах. По данным E. Zhuravliova et al., при гипотиреозе в митохондриях тел нейронов и глии усиливался аэробный гликолиз, связанный с активностью гексокиназы, при этом адаптивная активация распада глюкозы не наблюдалась в синаптических митохондриях [360]. Трийодтиронин может противодействовать неблагоприятным изменениям, наблюдаемым в гипотиреоидных митохондриях головного мозга, путем нормализации дыхательных процессов и регуляции транскрипции митохондриальных генов (ND4, 12S рРНК, 16S рРНК и Cox III) [386]. Однако, в отличие от других органов, лишь высокие, супрафизиологические дозы трийодтиронина приводили к возвращению показателей к близким к контрольным уровням в модели гипотиреоза [346]. Ряд исследований также демонстрирует, что при гипотиреозе происходит накопление полипептидных предшественников цитохромоксидазы митохондрий, в то время, как ТГ регулируют синтез и сборку

субъединиц для создания функциональных дыхательных комплексов в митохондриях [232; 430].

Кроме влияния на митохондриальные процессы дыхания, доказанной считается ключевая роль йодтиронинов в экспрессии синтеза и стимуляции работы ионно-обменных насосов. Так, T_3 активирует экспрессию гена натрий/водородного обменника, который в свою очередь отвечает за выведение избытка протонов и нормализацию внутриклеточного рН. Под действием T_3 увеличивается количество интегрированных в мембраны Na/K-АТФаз, усиливается функционирование Ca^{2+} -АТФазы, что в итоге способствует нормализации ионного баланса нейронов [285].

Нормальная работа ионных насосов невозможна в условиях истощения пула АТФ в клетках в условиях ишемии. При изучении действия T_3 на культуры астроцитов было зарегистрировано возрастание экспрессии ферментов бета-окисления пальмитата в митохондриях: бета-оксиацил-КоА-дегидрогеназы, бета-тиолазы и эноил-КоА-гидратазы [354]. Данные процессы приводили к увеличению в астроцитах количества АТФ. Поскольку защитная роль астроцитов при инсульте считается доказанной, то авторы исследования пришли к выводу, что именно нормализация энергообмена под действием трийодтиронина в астроцитах способствовала достоверному уменьшению зоны поражения в экспериментальных моделях транзиторной церебральной ишемии и инсульта.

Сравнение двух экспериментальных моделей ишемического инсульта – транзиторной и с постоянной окклюзией, выявило еще одну важную особенность нейропротекторного действия T_3 – угнетение синтеза белка аквапорина-4 при преходящей окклюзии [62]. В результате лечения экспериментальных животных препаратами трийодтиронина наблюдалось выраженное уменьшение отека и зоны поражения головного мозга, увеличивалась вероятность благоприятного исхода, но только в модели транзиторной ишемии.

1.3.5.2. Влияние йодотиронинов на процессы апоптоза и нейропластичность

В первые часы после нарушения мозгового кровотока в нейронах в зоне поражения наблюдается истощение пула АТФ, ингибирование синтеза белков и смещение внутриклеточного рН в кислую сторону. Избыточное высвобождение возбуждающих и тормозных нейромедиаторов, особенно – глутамата, приводит к развитию процесса эксайтотоксичности [6]. Активация ионотропных и метаболотропных рецепторов к глутамату способствует повышению цитозольного уровня ионов кальция. В свою очередь, избыток ионов кальция нарушает работу ионных насосов и одновременно активирует множество катаболических ферментов, в результате чего происходит деполяризация и дезинтеграция наружных и внутриклеточных мембран. Разрушение митохондриальных мембран включает процессы апоптоза путем высвобождения проапоптотических белков.

В ходе проведенных экспериментов было обнаружено, что после добавления препаратов T_3 в культуре астроцитов *in vivo* увеличивалось количество белков-переносчиков глутамата GLT-1 и GLAST. Активация поглощения глутамата астроцитами достоверно снижала «глиотоксичный» эффект данного нейромедиатора для нейронов [387]. В другом эксперименте было выявлено, что трийодтиронин снижал активность NMDA-рецепторов в нейронах гиппокампа, что, по мнению авторов, предотвращало глутамат-индуцированную гибель клеток [254].

Известно, что йодтиронины регулируют процессы метаболизма путем связывания не только с ядерными рецепторами (классический геномный механизм), но и с мембранными рецепторами, локализованными на белке интегрине $\alpha V\beta 3$ (негеномный механизм). После связывания гормона с рецептором на поверхности интегрин сигнал передается на фермент из семейства митоген-активируемых протеинкиназ – МАП-киназу ERK2 (extracellular signal-regulated kinase). Далее происходит активация ряда белков, в том числе секреция основного фактора роста фибробластов bFGF [115]. Изучение функции bFGF при

моделировании транзиторной глобальной ишемии головного мозга обнаружило значительный нейропротекторный эффект [79]. Инъекции основного фактора роста фибробластов подавляли процессы аутофагии нейронов и снижали скорость апоптоза путем ингибирования транслокации в митохондриях белка p53, в результате чего повышалось число выживших нейронов гиппокампа. Следовательно, активация трийодтиронином секреции bFGF через рецепторы интегрин $\alpha V\beta 3$, которые расположены в головном мозге и эндотелии церебральных сосудов, также должна иметь нейропротекторное действие [431].

Несмотря на то, что влияние ТГ на процессы клеточного апоптоза изучается в течение достаточно длительного времени, опубликовано лишь небольшое число исследований, посвященных исследованию данного вопроса при неврологических заболеваниях и в их экспериментальных моделях. Genovese T. et al. в модели ишемического инсульта путем окклюзии среднемозговой артерии продемонстрировали, что внутрибрюшинное введение Т4 (11 мкг/кг, через 1 ч после ишемии и через 6 ч после реперфузии) ассоциировано с уменьшением объема инфаркта коры и полосатого тела через 24 часа после инсульта. Кроме того, введение Т4 приводило к снижению экспрессии проапоптотического гена Bax и повышению уровня антиапоптотического белка Bcl-2. Тироксин подавлял активацию астроцитов и микроглии, увеличивал экспрессию нейротрофических факторов (BDNF, GDNF). Более того, Т4 подавлял фосфорилирование белка p38 и предотвращал индуцированное повреждением увеличение уровня δ -изоформы протеинкиназы C (PKC- δ). Полученные результаты демонстрируют, что нейропротекторное действие Т4, вероятно, опосредовано через воздействие на апоптогенные сигнальные пути p38 MAPK и PKC- δ [319]. Введение левотироксина (25 мкг/кг внутрибрюшинно) через 1 ч после экспериментальной черепно-мозговой травмы стимулировало в коре головного мозга экспрессию мРНК генов, связанных с выживанием нейронов и нейрогенезом, а именно Bcl2, фактора роста эндотелия сосудов A (VEGFA), Sox2 и нейротрофина (Ntf). В in-vitro части этого же исследования продемонстрировано, что экспрессия протекторных генов, индуцированная гипоксией (VEGF, Enolase, HIF2 α , c-Jun), достигала пика по

крайней мере на 8 часов раньше под воздействием T3 по сравнению с клетками, инкубированными без T3 [390].

В экспериментальной модели черепно-мозговой травмы введение T3 повышало в молекулах ДНК уровень 5-гидроксиметилирования цитидиновых нуклеотидов и снижало в них степень метилирования, вызванного локальной гипоксией. В присутствии T3 экспрессия мРНК генов семейства Tet увеличивалась, а ДНК-метилтрансферазы (Dnmt) 3a и Dnmt3b подавлялась. Эти изменения, вызванные введением T3, препятствовали индуцированному гипоксией метилированию ДНК *de novo*, что уменьшало повреждение нейронов и апоптоз. Метод РНК-секвенирования показал, что введение T3 в условиях гипоксии приводило к значительной активации Krüppel-подобного фактора 9 (KLF9) – многофункционального фактора транскрипции, играющего ключевую роль в развитии центральной нервной системы. Выключение гена KLF9 приводило к раннему апоптозу и нивелировало полезные эффекты T3 для выживания нейронов [207].

Несмотря на малое количество проведенных исследований, все они указывают на участие T3 в сигнальных путях, способствующих защите и восстановлению нейронов посредством геномных или негеномных механизмов.

Процессы восстановления интегративных нейрональных связей, происходящие после очагового повреждения ЦНС имеют ряд сходств с процессами во время развития головного мозга. Потеря актинового цитоскелета в конусе роста нейронов непосредственно влияет на их миграцию. Нормальное развитие мозга требует, чтобы развивающийся нейрон мигрировал на большие расстояния и проецировал аксоны по определенным путям к клеткам-мишеням. Взаимодействие между актиновым цитоскелетом и интегринами, расположенными в конусе роста, существенны для интерпретации нейронами внеклеточных сигналов управления [98]. Экспериментальные исследования, проведенные на эксплантатах мозжечка, показали, что зависимые от гормонов щитовидной железы изменения актинового цитоскелета модулируют формирование нейронных отростков. Данные процессы зависят от уровней T4 и rT3, однако, по-видимому, не контролируются

трийодтиронином [333]. Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что прямая T4-зависимая регуляция актинового цитоскелета в астроцитах и нейронах, вероятно, модулирует распознавание внеклеточных управляющих сигналов, необходимых для формирования новых синаптических связей. Ранее в ряде исследований была продемонстрирована роль реорганизации актинового цитоскелета в восстановлении нейронов после ишемии, а также в развитии нейродегенеративных заболеваний [293; 303; 329]. Влияние на подобные процессы представляет собой перспективный подход для стимуляции постинсультной нейропластичности и улучшения функциональных исходов инсульта.

В 2019 г. D. Talhada et al. в ходе комплексного исследования влияния T3 на целый ряд биохимических и патоморфологических показателей в модели фототромбоза продемонстрировали, что T3 модулирует несколько механизмов пластичности, которые могут действовать в различных временных и пространственных масштабах как компенсаторные механизмы для обеспечения соответствующей синаптической нейротрансмиссии [410]. Длительное введение T3 после церебральной ишемии, вызванной фототромбозом, значительно улучшало утраченные сенсомоторные функции, приводило к увеличению уровней синаптотагминов-1,2 и постсинаптической субъединицы GluR2 в AMPA рецепторах в перинфарктной области, увеличивало плотность дендритных спинов в перинфарктной и контралатеральной области и уменьшало тоническую ГАМКергическую активность в перинфарктной области за счет уменьшения количества парвальбумин+/c-fos+ нейронов и уровня декарбоксилазы глутаминовой кислоты 65/67. В условиях нехватки кислорода и глюкозы, трийодтиронин, напротив, снижал уровень синаптотагмина. Белок синаптотагмин является кальциевым сенсором, который участвует в последних стадиях выброса нейромедиатора в синаптическую щель. Он связывается с нейрексином и SNAP-25, осуществляя удержание секреторной везикулы у пресинаптической мембраны, и участвует в выбросе нейромедиатора за счёт регуляции SNARE комплекса при увеличении содержания кальция [118]. Полученные данные свидетельствуют о том, что T3 обладает способностью модулировать оптимальную активность

нейротрансмиссии в зависимости от фазы ишемии и степени вовлеченности ткани в ишемический процесс.

1.3.5.3. Влияние йодотиронинов на ангиогенез и тромбоцитарный гемостаз

Целый ряд экспериментальных исследований демонстрирует способность йодотиронинов стимулировать ангиогенез. Несмотря на то, что в большей части из них изучалось влияние йодотиронинов на процессы ангиогенеза в сердце и других органах, имеются и работы, подтверждающие способность йодотиронинов влиять на ангиогенез в головном мозге. В 2009 г. Zhang et al. показали, что у крыс, получавших после рождения пропилтиоурацил – обратимый блокатор синтеза Т3, наблюдался измененный церебральный ангиогенез в виде снижения плотности и нарушения целостности микрососудов. Эти процессы сопровождались измененной экспрессией фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) и основного фактора роста фибробластов (FGF-2). В *in-vitro* исследовании на культуре эндотелиальных клеток головного мозга крыс (RBE4) авторы показали, что физиологические концентрации Т3 и Т4 стимулировали пролиферацию эндотелия и тубулогенез. Уровни белка и мРНК VEGF-A и FGF-2 повышались после стимуляции клеток RBE4 трийодтиронином. Гормоны щитовидной железы ингибировали апоптоз в клетках RBE4 и изменяли уровни мРНК генов, связанных с апоптозом, в частности, Bcl2 и Bad [355].

Davis et al. продемонстрировали ангиогенную активность гормонов щитовидной железы в дермальных микроваскулярных эндотелиальных клетках (HDMEC) человека и в эндотелии системы хориоаллантаисной мембраны цыплят (CAM) [323]. В ходе исследования дейодирование Т4 в Т3 было блокировано с использованием пропилтиоурацила. Важность этой манипуляции заключается в том, что она предоставляет доказательства проангиогенной активности Т4 и опровергает мнение, что Т4 является исключительно прогормоном для Т3. Исследование показало, что проангиогенные эффекты Т4 инициируются на

рецепторе плазматической мембраны. Ангиогенный ответ зависит от активации MAPK (ERK1/2) комплексом гормон-интегрин. Кроме того, воздействие гормона щитовидной железы на клетки приводит к высвобождению основного фактора роста фибробластов bFGF, что, по-видимому, аутокринным образом способствует пролиферации эндотелиальных клеток. Добавление антитела к bFGF в исследуемой модели блокировало ангиогенный ответ на гормон. Таким образом, по крайней мере, частично, ангиогенный ответ на воздействие тироксина опосредуется высвобождением одного или нескольких факторов роста сосудов.

Другие исследования демонстрируют, что помимо bFGF и VEGF, терапия Т3 значительно повышала уровни белка бета-рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR- β) в миокарде лабораторных мышей в модели гипотиреоза [388]. Тромбоцитарный фактор роста-BB (PDGF-BB) является мощным митогеном для клеток мезенхимального происхождения, включая фибробласты, гладкомышечные клетки и глиальные клетки, а также одним из наиболее активных ангиогенных факторов. Ангиопротекторная роль PDGF-BB продемонстрирована в клинических исследованиях у пациентов, перенесших инсульт [146].

Существенные клинические данные указывают на то, что гипертиреоз усиливает коагуляцию и увеличивает риск тромбоза. Результаты *in vitro* и клинических исследований указывают на несколько механизмов реализации этого риска. Физиологические концентрации L-тироксина (Т4) активируют тромбоциты, что приводит к высвобождению (дегрануляции) аденозинтрифосфата и агрегации. Гормональное действие инициируется негеномными механизмами через интегрин $\alpha v \beta 3$ – структурный белок, экспрессируемый тромбоцитами, который содержит рецептор гормона щитовидной железы. При этом Т3 не активирует тромбоциты. Данные наблюдения свидетельствуют, что высокие уровни циркулирующего Т4 могут поддерживать патологическую агрегацию тромбоцитов и способствовать повышенному риску коагуляции, обусловленному клиническим гипертиреозом [117].

Engelmann et al. и Pietzner et al. представили данные об активности факторов свертывания крови у 16 изначально здоровых мужчин с индуцированным

гипертиреозом путем перорального приема Т4 в течение 8 недель. Факторы свертывания с наибольшим повышением концентрации под воздействием Т4 и выраженной корреляцией с уровнем Т4 включали фактор XIII, субъединицу В, фактор IX, ингибитор активированного протеина С, SERPIN A5 и α 2-антиплазмин. При этом наблюдалась отрицательная корреляция с уровнем плазминогена, предшественника фибринолиза, что соответствует тромбогенному и гипофибринолитическому состоянию [136; 317]. Роль тиреоидных гормонов в развитии тромбозов мозговых сосудов в настоящий момент не установлена. Однако некоторые виды опухолей мозга, такие как мультиформная глиобластома, экспрессируют большое количество тропного к Т4 интегрина α v β 3 и в то же время особо склонны к тромбообразованию, что косвенно может свидетельствовать о способности тироксина поддерживать в головном мозге гиперкоагуляционное состояние [117].

1.3.5.4. Влияние йодотиронинов на процессы воспаления в ЦНС

Данные о роли тиреоидных гормонов совместно с цитокинами в обеспечении взаимодействия между иммунной и эндокринной систем получены в ходе целого ряда экспериментальных и клинических исследований [368; 376; 396]. Центральная роль тиреоидных гормонов в модуляции иммунной системы подтверждается доказанным влиянием Т3 и Т4 на процесс фосфорилирования белка-преобразователя сигнала и активатора транскрипции 1 α (STAT1 α), что приводит к активации MAPK и потенцированию синтеза и высвобождения цитокинов [127].

Нарушение секреции ТТГ, гипертиреоз, аутоиммунный тиреоидит и гипотиреоз могут влиять на иммунологические функции [8]. Установлено, что выраженность тиреотоксикоза коррелирует с усилением гуморального и клеточного иммунного ответа, в то время как при гипотиреозе были обнаружены противоположные эффекты [393]. Трийодтиронин увеличивает количество IL-17-экспрессирующих Т-лимфоцитов путем активации дендритных клеток *in-vitro*

[122]. Кроме того, Т- и В-лимфоциты способны самостоятельно синтезировать и высвободить ТТГ. Данный негипофизарный источник ТТГ может также иметь важное значение для влияния на иммунный ответ при хроническом воспалении [235].

Тем не менее, в течение последних лет получены многочисленные данные, подтверждающие противовоспалительное действие тиреоидных гормонов. В клиническом исследовании, включавшем 17 пациентов с гипотиреозом вследствие болезни Хашимото, показано, что назначение L-тироксина ассоциировано со снижением провоспалительных факторов, таких как интерферон-гамма, IL-1, IL-6, и ФНО- α , а также с повышением уровня противовоспалительного цитокина IL-10 [217]. В ходе проведенного в 2014 г. Billon et al. экспериментального исследования на трансгенных линиях мышей с дефицитом гена апобелка E (ApoE $^{-/-}$ TR α 0/0) установлено, что делеция гена, кодирующего рецептор к тиреоидным гормонам- α , ассоциирована с ускоренным атеросклерозом, повышением уровня цитокина IL-1-бета и активацией провоспалительного сигнального пути АКТ/Nf- κ B [412]. Кроме того, в модели ишемии миокарда также показана способность тироксина уменьшать активность сигнального пути TLR4/Nf- κ B [394]. В модели травматического поражения головного мозга трийодтиронин действовал аналогичным образом [157]. Рецепторы TLR4/Nf- κ B экспрессируются в большинстве нейронов головного мозга, подавление их активности считается перспективной мишенью при лечении ишемического инсульта [135].

1.3.6. Молекулярные механизмы действия тиронаминов

Новый биогенный амин – 3-йодтиронамин (T₁AM) был открыт в 2004 году [343]. Он присутствует во многих органах и тканях и при повышенном содержании оказывает эффект, противоположный наблюдаемому при избытке T₃, что позволяет рассматривать тиронамины и, в частности, T₁AM, как новое и недооцененное звено эндокринной регуляции тиреоидных гормонов. Предполагается, что T₁AM, как и

трийодтиронин, способен проникать через гематоэнцефалический барьер. Исследователями было показано протекторное воздействие T₁AM при повреждении различных органов и тканей, в частности, миокарда и головного мозга [90; 240]. Однако механизмы, посредством которых T₁AM реализует свои эффекты, до сих пор неясны. Согласно данным Cöster M. et al. [156], T₁ не взаимодействует с рецепторами к тиреоидным гормонам, но обладает высокой аффинностью к рецептору, ассоциированному со следовыми аминами-1 (TAAR1). TAAR1 расположен на поверхности клеточной мембраны и относится к группе рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR).

Рецептор TAAR1, открытый в 2001 году, относится к мембранным рецепторам 7-TMC типа и характеризуется высокой аффинностью к следовым аминам – β-фенилэтиламину, пара-тирамину, триптамину, октопамину. К настоящему моменту описано девять подтипов TAAR-рецепторов, все из которых широко представлены в различных тканях. Наибольшее внимание исследователей привлекают эффекты TAAR1 в ЦНС, поскольку данный рецептор рассматривают как физиологический регулятор моноаминергической нейротрансмиссии. TAAR1 экспрессируются в различных участках мозга, в частности, в лимбической системе и ядрах, содержащих моноаминергические клетки. По данным ряда авторов, этот рецептор является мишенью для амфетамина, метамфетамина, 3,4-метилендиоксиметамфетамина и диэтиламида d-лизергиновой кислоты, что указывает на его важную роль в патофизиологии нейропсихиатрических нарушений [57]. Интересно, что у человека гены, кодирующие TAAR1, располагаются кластером на длинном плече хромосомы 6, в области, ассоциированной с шизофренией и биполярным аффективным расстройством. Кроме того, есть данные о тесной взаимосвязи рецепторов TAAR1 и D2R (главной мишени ряда антипсихотических препаратов, например, галоперидола), что позволяет рассматривать TAAR1 также как терапевтическую мишень при некоторых дофамин-зависимых нарушениях [444].

В культуре ткани головного мозга Scanlan et al. (2004) [40] была показана активация рецептора TAAR1 в ответ на стимуляцию T₁AM, причем T₁AM оказался

наиболее эффективным среди всех следовых аминов, использованных в эксперименте. Также наблюдалось взаимодействие T_1AM с $TAAR5$ и $TAAR8$. J. Lov et al. [39] изучали влияние T_1AM на апоптоз при спинномозговой травме у крыс. Поскольку при спинномозговой травме гибель нейронов является преимущественно следствием апоптоза, то именно на борьбу с ним авторы решили в первую очередь нацелить лечение. Они вводили одной группе животных внутривенно T_1AM , другой – T_1AM и его антагонист EPPTB (N-(3-этоксифенил)-4-пирролидин-1-ил-3-трифлуорометилбензамид); контрольная группа не получала лечения. Как результат, моторные функции по шкале BBB значительно лучше восстанавливались только в группе животных, получавших T_1AM . Гистологически у них было выявлено большее число выживших нейронов, чем в двух других исследуемых группах. Уровень апоптоза также в этой группе был ниже, что дает авторам основание предполагать, что нейропротекторный эффект, оказываемый T_1AM на нейроны спинного мозга, опосредован через $TAAR1$.

В течение последних лет были начаты исследования различных аналогов тиронаминов в качестве агонистов $TAAR1$, а химики корпорации Hoffmann-La Roche разработали серию производных имидазола, также обладающих свойствами полных и частичных агонистов данного рецептора.

Тем не менее, $TAAR1$, вероятно, не является единственным рецептором, с которым взаимодействуют тиронамины. Во-первых, роль этих рецепторов в ответ на стимуляцию T_1AM является неоднозначной, и пути реализации физиологического ответа до конца не изучены. Во-вторых, Chiellini et al. (2012) [128] выявили несоответствие между концентрацией T_1AM в тканях и уровнем экспрессии $TAAR1$. Скорее всего, существуют еще рецепторы, являющиеся мишенями для тиронаминов. Например, другие рецепторы 7-TMC типа также связываются с T_1AM , хотя и с меньшей аффинностью, чем $TAAR1$. Плазменный белок apoB-100 (компонент липопротеинов низкой и очень низкой плотности) также захватывает молекулы T_1AM , с чем отчасти связаны сложности выделения тиронаминов из образцов крови. Физиологический смысл такого взаимодействия

неясен, поскольку каких-либо модификаций липопротеинов, связавшихся с T₁AM, пока не обнаружено. Еще одна молекулярная мишень для T₁AM находится в митохондриях. Cuneo et al. (2012) [281] сообщают, что тиронамин модулирует активность субмитохондриальных частиц и растворимой субъединицы F₁ АТФазы, снижая потребление кислорода и усиливая продукцию перекиси водорода митохондриями клеток печени крыс [142]. Также есть данные, что в микромолярных концентрациях T₁AM взаимодействует с белками-переносчиками других моноаминов, а также с везикулярным переносчиком моноаминов, приводя к ингибированию обратного захвата и транспортировки норэпинефрина и дофамина в синаптические пузырьки. В этих низких концентрациях T₁ также способен замещать T₃ и T₄ в их мембранных белках-переносчиках – транспортёре монокарбоксилата 8 (MCT8) и транспортёрах органических анионов 1A2 и 1C1 (OATP1A2 и OATP1C1) [242].

1.3.7. Влияние тиронаминов на ЦНС

Специфический рецептор к T₁AM – TAAR1 – предположительно взаимодействует с адренергической системой. Кроме него, также другие мишени T₁AM могут быть вовлечены в нейромодуляцию. Во фракции синаптосом T₁AM ингибирует транспортеры дофамина и норэпинефрина, ответственные за обратный захват этих нейромедиаторов в пресинаптическое окончание. Как следствие, происходит, во-первых, накопление внеклеточных моноаминов, а затем – истощение запасов нейротрансмиттеров и угнетение нейронной передачи. Везикулярный моноаминный переносчик 2 (VMAT2) при этом также ингибируется. Этот транспортер перемещает нейротрансмиттеры (дофамин, норэпинефрин, серотонин, гистамин и др.) из цитозоля в синаптические пузырьки, и таким образом T₁AM истощает запасы нейротрансмиттеров, доступных для синаптической передачи, хотя данная гипотеза еще нуждается в экспериментальном подтверждении [400]. Электрофизиологические исследования

показывают, что T₁AM влияет на ответ клеток на катехоламины и другие нейротрансмиттеры, действуя как специфический ингибитор обратного захвата дофамина и норадреналина и доставки моноаминов в синаптические пузырьки. Таким образом, некоторые авторы предлагают рассматривать T₁AM как нейромодулятор [27; 311].

Другой потенциальной мишенью тиронаминов является α_{2A} -адренергический рецептор, играющий особую роль в центральной нейротрансмиссии. Наряду с α_{2D} , он экспрессируется как ингибирующий ауторецептор в норадренергических пресинаптических окончаниях и как модулирующий гетерорецептор в серотонин-, дофамин- и глутаматергических нейронах [188]. Другим следствием стимуляции α_{2A} -адренергического рецептора может быть активация коры головного мозга – рецептор α_{2A} экспрессируется в тормозящих интернейронах коры, и его стимуляция приводит к растормаживанию коры [61].

M.E. Manni et al. [38] предполагают, что эффекты тиронаминов зависят не столько от дозы, сколько от вида экспериментальных животных и способа введения препарата в организм. Так, внутримозговые инъекции приводят к быстрому снижению температуры организма и к развитию гипергликемии. Системное введение T₁AM стимулирует синтез жирных кислот из глюкозы, усиление кетогенеза, повышение содержания глюкозы в крови. В культуре клеток печени введение T₁AM стимулирует глюконеогенез и кетогенез. В ЦНС 3-йодтиронамин ведет себя как нейромодулятор адренергических и/или гистаминергических нейронов. Кроме того, внутримозговые инъекции T₁AM улучшают память и обучение, изменяют режим сна и пищевое поведение, понижают болевой порог, стимулируют секрецию глюкагона на фоне снижения секреции инсулина. Это позволяет рассматривать T₁AM как сигнальную молекулу, взаимодействующую с различными рецепторами, что в итоге приводит к значительным физиологическим эффектам [63, 88].

При интрацеребровентрикулярном введении у мышей (3,3-10,2 нмоль/кг) T₁ индуцирует антиамнестический эффект и стимулирует процессы, связанные с обучением [311]. Исследование Musilli et al. [204] показало, что основной продукт

окисления T_1AM – 3-йодтироуксусная кислота (TA_1) также может играть роль в процессах запоминания, возможно, за счет активации гистаминергической системы [444]. При интрацеребровентрикулярном введении T_1AM (0,4 мкг/кг) мышам у них наблюдалось снижение болевого порога, причем этот эффект полностью устранялся при совместном введении T_1AM и антагонистов гистаминовых рецепторов.

1.4. Клинические исследования нейропротекторных эффектов йодотиронинов

Гипотиреоз и синдром нетиреоидных заболеваний известны как предикторы краткосрочной летальности у пациентов реанимационного профиля. Тем не менее, в клинических исследованиях, изучавших влияние тиреоидного профиля на тяжесть и исход ишемического инсульта, получены противоречивые данные. В 2006 г. М. Avelizaki et al. в ходе ретроспективного исследования данных 744 пациентов с ишемическим инсультом показали, что гипотиреоз (определяемый как повышение ТТГ выше 10 мкМЕ/мл) ассоциирован с менее тяжелым неврологическим дефицитом (45-58 баллов по Скандинавской шкале), более высоким уровнем сознания (14-15 баллов по шкале Глазго) и более благоприятным исходом инсульта [211]. Однако группа пациентов с гипотиреозом включала всего лишь 13 больных. Авторы исследования выдвинули гипотезу, что более благоприятное течение ишемического инсульта может быть обусловлено эндогенным прекондиционированием, тем более что в гипотиреоидной группе чаще отмечались транзиторные ишемические атаки в анамнезе. Аналогичные данные были получены Oshinaike et al. и Akhoundi et al.: значительно большее число пациентов в группе с субклиническим гипотиреозом имели при поступлении в неврологический стационар легкий неврологический дефицит по сравнению с группой с нормальной функцией щитовидной железы [137; 160]. В исследовании 756 случаев ишемического инсульта, проведенного Baek et al., благоприятный функциональный исход определялся как 0-1 балл по шкале mRs (при базисных

баллах NIHSS 8-14) или 0-2 балла по шкале mRs (при базисных баллах NIHSS более 14). В качестве критерия гипотиреоза использовался уровень ТТГ более 5 мкМЕ/мл. В группе пациентов с гипотиреозом отмечена большая доля больных с исходом в 0-1 балл по шкале mRs на 30-й день и с исходом в 0-2 балла на 30-й и 90-й дни [161]. По данным недавно опубликованного исследования, включавшего 158 пациентов с ишемическим и геморрагическим инсультом, субклинический гипертиреоз и наличие антител к тиреопероксидазе являлись статистически значимыми факторами риска неблагоприятного исхода инсульта, однако, анализ влияния данных факторов на исходы в подгруппах по типам инсульта не проводился [358].

Значительно большее число исследований демонстрируют связь между низким уровнем тиреоидных гормонов и неблагоприятным исходом инсульта. В 2011 г. Ambrosius et al. представили результаты исследования 387 пациентов с ишемическим инсультом [256]. У пациентов с уровнем св. Т3 ниже 1-го тертиля отмечались более высокие баллы по шкале NIHSS. Также в этой группе чаще встречалась компрессия желудочковой системы по данным компьютерной томографии, был выше риск смерти в течение года. Согласно данным, опубликованным O'Keefe et al. в 2015, низкий уровень ТТГ и св. Т3 ассоциировался с неблагоприятным исходом инсульта через 3 месяца и с более высоким уровнем внутрибольничной смертности [392]. Однако данная ассоциация не подтвердилась после поправки на другие известные предикторы исхода инсульта, такие как тяжесть по шкале NIHSS. Вероятно, это связано с относительно небольшим размером выборки исследования, а также с тем, что большинство пациентов были эутиреоидными. Вместе с тем, в 2017 г. были опубликованы результаты сразу двух мета-анализов, включающих 3936 и 5218 пациентов с ишемическим инсультом [226; 326]. Оба исследования демонстрируют ассоциацию между низким уровнем св. Т3 и неблагоприятным функциональным исходом ишемического инсульта, при этом по данным Dhital et al. [226] гипотиреоз, определяемый как повышение ТТГ, может быть связан с более благоприятным функциональным исходом.

Несмотря на данные экспериментальных и клинических исследований о влиянии тиреоидных гормонов на исход ишемического инсульта, клинические исследования эффективности применения синтетических аналогов тиреоидных гормонов для улучшения функциональных исходов инсульта не проводились. Тем не менее, в последние годы опубликованы исследования фазы I/II применения синтетического аналога Т3 (лиотиронина) при других заболеваниях. В ходе исследования ThyRepair показана возможность использования лиотиронина для улучшения кардиальных исходов у пациентов с инфарктом миокарда, перенесшим ангиопластику [141]. Кроме того, в 2020 г. опубликованы результаты исследования фазы I, подтверждающие безопасность применения лиотиронина у пациентов с рассеянным склерозом с целью стимуляции ремиелинизации зрительных трактов [314]. В целом, учитывая высокий профиль безопасности, синтетические аналоги трийодтиронина можно рассматривать как потенциально эффективный нейропротектор при ишемическом инсульте, что требует подтверждения в клинических исследованиях.

1.5. Значение полногеномного поиска ассоциаций в области цереброваскулярной патологии

Полногеномный поиск ассоциаций (genome-wide association studies, GWAS) – метод выявления генетических локусов, связанных с определенными заболеваниями или фенотипическими признаками [183]. Эти исследования особенно актуальны для поиска генетических вариаций, ассоциированных с развитием социально значимых заболеваний, таких как новообразования, сахарный диабет, сердечно-сосудистая патология и психические нарушения. Активное распространение подобных исследований в последние 10 лет можно объяснить рядом факторов. Внедрение новых лабораторных технологий, основанных на ДНК-микрочипах (DNA-microarray), привело к увеличению популярности, доступности и снижению стоимости полногеномного секвенирования, представляющего собой

исследование всей последовательности ДНК человека, включая белок-кодирующие и некодирующие области генома [29]

. Активно идет процесс разработки статистических методов анализа результатов проведенных ранее GWAS-исследований. Бурное развитие этого направления привело к созданию больших хранилищ генетических вариаций человека (баз данных GWAS), что открыло широкие возможности для их дальнейшего анализа. После завершения проекта «Геном человека» в 2003 году и международного проекта HapMap Project в 2005 году появился набор исследовательских инструментов, позволяющих определить генетический вклад в развитие ряда заболеваний. Инструменты включают компьютерные базы данных, которые содержат эталонную последовательность генома человека, карту генетических вариаций и набор новых технологий, которые могут быстро и точно анализировать образцы полного генома на предмет наличия генетических вариаций, способствующих возникновению болезни. В настоящее время с помощью GWAS-исследований обнаружен широкий спектр генетических вариаций, ассоциированных с риском развития диабета 2 типа, болезни Паркинсона, инфаркта миокарда, дистрофии сетчатки, ожирения, болезни Крона, рака простаты и молочной железы [177; 179; 186; 427].

GWAS включает в себя анализ сотен тысяч геномных вариантов в больших когортах людей. Для проведения GWAS чаще всего используются две группы участников: пациенты с изучаемым заболеванием и индивидуумы, не страдающие этим заболеванием. Генетические вариации, ассоциированные с исследуемыми фенотипами, классифицируются как однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), если их частота в популяции более 1%, или однонуклеотидные варианты (SNV), если их частота составляет менее 1%. Согласно международным рекомендациям, SNP и SNV идентифицируются в базе данных dbSNP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) по номеру «rs». Если обнаруживается, что определенные генетические вариации значительно чаще встречаются у людей с заболеванием по сравнению с людьми без данной болезни, то считается, что эти вариации ассоциированы с патологическим процессом. Однако сами

ассоциированные варианты могут не иметь явной биологической связи с развитием болезни. По этой причине предпринимаются дополнительные шаги, такие как секвенирование пар оснований ДНК в конкретной области генома, чтобы определить точное генетическое изменение, связанное с заболеванием [89; 247; 331].

Обычно в свободном доступе публикуется сводная статистика GWAS, включающая такую информацию, как отношение шансов (OR) / размер эффекта (бета), стандартная ошибка (SE), р-значения и размеры выборки случай / контроль для каждого анализируемого SNP/SNV. Довольно часто в общем доступе размещаются только статистически значимые результаты. Доступ к большому количеству суммарных статистик предоставляют такие крупные ресурсы, как GWAS Central (<https://www.gwascentral.org>) и GWAS Catalog (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>). Доступность суммарных статистик GWAS вызвала большой интерес к разработке методологий, направленных на эффективное использование таких записей для получения как можно большего объема информации. Разработаны аналитические и вычислительные подходы, которые объединяют результаты из нескольких наборов данных GWAS и помогают выявить новые причинно-следственные связи между заболеванием и фактором риска, предположить плейотропию, предложить новые локусы и биохимические пути. К таким подходам относится менделевская рандомизация (MR). Для проведения анализа результатов GWAS была разработана платформа MR-Base, которая объединяет базу данных результатов GWAS, веб-приложение и пакеты среды вычислений R, которые автоматизируют анализ. Также доступны дополнительные пакеты R для MR от других исследователей, в том числе MendelianRandomization, RadialMR, MR-PRESSO и mr.raps [271; 337; 437].

У GWAS-исследований есть ряд ограничений. Так, накопленные к данному моменту результаты показывают, что каждый конкретный генетический маркер оказывает весьма скромный эффект, и все вместе они объясняют только небольшую часть наблюдаемой фенотипической изменчивости. Предполагается, что большинство вариантов, идентифицированных GWAS, не сами влияют на

исследуемый признак, а маркируют область неравновесного сцепления, содержащую один или несколько функциональных вариантов. Тем не менее, с помощью GWAS были идентифицированы воспроизводимые геномные локусы, связанные с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, воспалительными заболеваниями кишечника, диабетом 2 типа, новообразованиями. Интегрирование результатов GWAS с другими данными и методами исследований предоставляет потенциальную возможность для изучения биологических механизмов, лежащих в основе развития распространенных патологий.

Публикация результатов исследований, предоставляющих суммарные статистические данные об ассоциациях генетических полиморфизмов с фенотипическими проявлениями цереброваскулярной патологии, открывает широкие перспективы для идентификации новых факторов, влияющих на риск развития и функциональный исход инсульта.

Ряд проведенных в течение последнего десятилетия GWAS-исследований посвящен поиску новых локусов, ассоциированных с риском развития инсульта. Значительный объем данных о взаимосвязи инсульта и состояний, предрасполагающих к его развитию, был получен в ходе исследования MEGASTROKE. Консорциум MEGASTROKE опубликовал результаты многоцентрового GWAS-исследования, в котором приняли участие более 67 000 пациентов с инсультом и более 454 000 индивидуумов в контрольной группе [287]. По данным исследования было выявлено 32 полногеномно значимых локуса, 22 из которых ранее не описаны. Пять из выявленных локусов были связаны с артериальным давлением; пять – с ишемической болезнью сердца; два – с фибрилляцией предсердий; два – с венозной тромбоэмболией; два – с уровнем липопротеинов низкой плотности; один – с бляшками в сонной артерии; и один – с гиперинтенсивностью белого вещества. Полученные в ходе анализа данные убедительно демонстрируют возможность использования GWAS-технологий не только для изучения генетических факторов риска инсульта, но и для оценки связи коморбидных заболеваний с вероятностью развития определенных подтипов инсульта.

Принимая во внимание значимость инсульта, как ведущей причины развития стойкой инвалидизации, исследование генетических факторов, влияющих на степень функционального восстановления, вызывает долгосрочный интерес [24]. Вместе с тем, технологии GWAS для выявления генетических детерминант исходов инсульта стали использоваться лишь в течение последних нескольких лет [228]. В ходе полногеномного метаанализа 12 когорт пациентов с ишемическим инсультом был идентифицирован новый полиморфизм в гене PATJ (Pals1-associated tight junction), связанный с неблагоприятным функциональным исходом через три месяца после инсульта [308]. Известно, что данный ген регулирует апико-базальную полярность и направленную миграцию эпителиальных клеток, однако, его значительная роль в процессах миелинизации была обнаружена лишь недавно [424]. В другом исследовании полиморфизм rs184681 был связан с функциональными результатами нейрональной пластичности между 60 и 190 днями после развития инсульта [182]. Исследования в сфере генетического дисбаланса позволили идентифицировать роль дисбаланса ряда генов в развитии неблагоприятного исхода инсульта через 2-6 месяцев после коррекции на возраст, пол, расу и подтипы инсульта [175].

Важность генетических исследований в области факторов, влияющих на исход инсульта, привела к созданию консорциумов и международных баз данных, интегрирующих результаты полногеномных исследований во множестве когорт. Наиболее крупным консорциумом в данной области является сеть GISCOME, предоставляющая суммарные статистические данные 6165 пациентов с ишемическим инсультом из 12 исследований в Европе, США и Австралии, выполненных по инициативе Международного консорциума генетики инсульта и сети генетики инсульта Национального института неврологических заболеваний [182; 189]. Первичной конечной точкой в исследовании является сумма баллов по модифицированной шкале Рэнкина через 60-190 дней от момента развития инсульта, дихотомизированная как благоприятный исход (0-2 балла) и неблагоприятный исход (3-6 баллов), а также как порядковая (ordinal) переменная. GWAS-анализ проводился в каждом исследовании независимо, после чего

результаты были подвергнуты мета-анализу. Анализ проводился с поправкой на возраст, пол, тяжесть инсульта (исходный балл по шкале инсульта NIHSS). Уровень значимости для исследуемых полиморфизмов составлял $p < 5 \times 10^{-8}$.

1.6. Менделевская рандомизация как метод поиска новых факторов, влияющих на риск и исход цереброваскулярной патологии

Несмотря на то, что технология GWAS-исследований разрабатывалась как метод поиска ассоциаций между генетическими вариантами и фенотипами в норме и при патологии, увеличение количества GWAS-исследований и повышение доступности их результатов открывают широкие горизонты в исследованиях по поиску новых факторов, влияющих на развитие, течение и исход заболеваний. В последнее десятилетие в зарубежной литературе наблюдается увеличение числа публикаций с использованием менделевской рандомизации (MR) – аналитического вычислительного метода, основанного на использовании генетических вариантов как инструментальных переменных для определения того, зависит ли риск или исход заболевания от конкретных факторов (например, способа лечения, метаболических или биохимических характеристик организма и т.д.) [335].

Термин «менделевская рандомизация» был впервые предложен Греем и Уитли в 1991 году для метода, позволяющего объективно оценить эффекты лечения рака в рамках наблюдения с семейным дизайном. В MR-исследованиях генетические варианты используют для того, чтобы обнаружить, согласуется ли наблюдаемая ассоциация между фактором риска и исходом с причинным эффектом (показателем силы взаимосвязи между генетическими вариантами и фенотипической изменчивостью). Феномен этот основан на естественном расхождении генов при мейозе, которое обеспечивает случайное распределение генетических вариантов в популяции. Одни индивидуумы от рождения наследуют генетический вариант, влияющий на фактор риска, другие – нет. Поскольку эти генетические варианты, как правило, не связаны с искажающими факторами,

различия в риске и исходе заболевания между носителями этого варианта и теми, у кого его нет, можно отнести к разнице во влиянии самого фактора риска.

Благодаря этому менделевская рандомизация может преодолеть главное ограничение обсервационных исследований: искажение, которое не поддается измерению, возникающее вследствие неидентифицированных вмешивающихся факторов.

Основываясь на природе изучаемого промежуточного фенотипа и биологической достоверности генетических вариантов, используемых для оценки причинных эффектов, можно выделить три категории MR-исследований [335]:

1. Валидизация потенциальных мишеней для лекарственных средств. Некоторые из промежуточных фенотипов обусловлены небольшим числом ключевых кодирующих или функционально значимых локусов близкой локализации (например, С-реактивный белок, липопротеины низкой плотности, IL-6). MR-исследования таких генетических вариантов дают возможность определять наиболее перспективные препараты для воздействия на конкретные мишени, а также оценивать риск развития побочных эффектов. Так, например, рецептор IL-6 может быть заблокирован моноклональным антителом, разработанным для лечения ревматоидного артрита (тоцилизумаб). Но поскольку вариант в области гена IL6R в MR-исследованиях показывает связь с риском ишемической болезни сердца, то целесообразно также опробовать применение тоцилизумаба в исследованиях по профилактике сердечно-сосудистых заболеваний [267; 367].

2. Изучение сложных промежуточных фенотипов. Многие промежуточные фенотипы находятся под влиянием нескольких генетических вариантов (индекс массы тела, артериальное давление, рост). В таком случае проводят MR-исследования, основанные на анализе большого количества генетических вариантов в разных генетических областях. Эти варианты могут быть взяты в полногеномных исследованиях (GWAS), но биологические пути, связывающие каждый вариант с промежуточным фенотипом, могут быть неизвестны. Если несколько различных независимых генетических вариантов предполагают одно и то же направление причинного эффекта, и если общий статистический результат

не зависит только от одного или двух вариантов, то вывод о причинном воздействии наиболее достоверен. В этих случаях цель MR-исследования заключается не только в том, чтобы дать окончательный ответ, обусловлен ли промежуточный фенотип теми или иными генетическими вариантами, но и определить механизмы, связывающие фенотип с исходом [270].

3. Третья категория MR-исследований представляет собой автоматический анализ поиска ассоциаций между целым рядом факторов риска и исходами заболевания, полученных в широкомасштабных исследованиях GWAS, целью которого является ответ на вопрос, коррелируют ли общие генетические предикторы с исследуемыми фенотипами и исходами. Обнаруженные ассоциации могут оказаться спекулятивными, но статистическая мощность обнаружения причинного эффекта в таких исследованиях выше. В настоящее время с помощью генетических инструментов изучается влияние широкого спектра промежуточных фенотипов на исход различных заболеваний. Так, при поиске генетических инструментов в базе GWAS Catalog по запросу «DIO2 (дейодиназа II типа)» нами было обнаружено 62278 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), из которых для MR-анализа полностью подходили только три. Поиск ассоциаций между ними и исходами ишемического инсульта из базы GISCOME позволил обнаружить, что SNP rs11846182 ассоциирована с лакунарным инсультом ($p=0,0067$). Таким образом, MR-исследования предоставляют огромный выбор инструментов для поиска причинных эффектов широкого спектра заболеваний [268; 402].

Изначально в MR включался единственный генетический вариант и оценивалась причинная связь модифицируемого промежуточного фенотипа с исходом в единственной выборке. Однако последовавшее вскоре широкое распространение в открытом доступе данных GWAS позволило нарастить мощность MR-исследований за счет следующего:

1. Значительное увеличение размера выборки. Интернет-ресурсы с данными GWAS с большими объемами выборок доступны для анализа по многим фенотипическим признакам и исходам болезней (GWAS Catalog, GWAS Central и др.) [234; 330].

2. Использование множественных генетических вариантов. Для ряда промежуточных фенотипов в MR-исследованиях результаты GWAS помогли идентифицировать множественные генетические варианты, способствующие изменчивости фенотипа. В простейших случаях применения MR используется единственный генетический вариант в качестве инструмента для определения фактора риска. В большинстве случаев, однако, генетические варианты по отдельности обычно объясняют только очень небольшую часть вариации фенотипа; их можно назвать «слабыми инструментами», особенно в случае небольших выборок. Чтобы преодолеть это, были разработаны методы, использующие несколько генетических вариантов, которые в совокупности обладают большей статистической мощностью [234; 336].

3. Проведение MR по двум выборкам (two sample MR, 2SMR). Это стратегия дизайна, при которой генетические ассоциации с фенотипом и исходом берутся из отдельных выборок. При условии, что образцы взяты из одной и той же основной популяции (например, в пределах одной этнической группы), достоверные причинно-следственные оценки могут быть получены даже если сопутствующие данные о генетических вариантах, промежуточном фенотипе и исходе заболевания каждого конкретного пациента остаются недоступными. Более того, такие оценки могут быть получены на основе обобщенных данных, а не данных, полученных на индивидуальном уровне. Это позволяет эффективно оценивать причинно-следственные связи в выборках больших размеров без использования данных конкретных лиц. Поскольку фенотип и результат в MR по двум выборкам не нужно оценивать у одних и тех же индивидов, генетические ассоциации с фенотипом и исходом могут быть взяты из разных баз данных, что потенциально значительно увеличивает мощность по сравнению с MR по одной выборке. В результате 2SMR может использовать гораздо большие размеры выборки и оценивать эффекты с более высокой точностью, чем это обычно возможно при использовании любой отдельной выборки. Преимущество подхода с двумя выборками заключается в том, что его можно реализовать с использованием сводных данных крупномасштабных общегеномных ассоциативных исследований — GWAS) [377; 413].

За последнее десятилетие с помощью GWAS была исследована наследуемость многих сложных признаков. По большей части, эффекты, связанные с распространенными в популяции генетическими вариантами, оказались незначительными. Но даже варианты со скромными размерами эффекта предоставляют возможности для исследования потенциально новых причинно-следственных связей с использованием MR, особенно с учетом разработки новых статистических инструментов для обнаружения и корректировки эффекта плейотропии.

SNP, используемые в MR, должны отвечать трем условиям:

- 1) связь с воздействием (фактором риска);
- 2) влияние на результат только через воздействие;
- 3) отсутствие факторов, влияющих одновременно на SNP и результат.

Иными словами, в качестве инструментов в MR выступают SNP, которые надежно связаны с воздействием, получены из стандартизованного GWAS, и обладают порогом статистической значимости $p < 5 \cdot 10^{-8}$.

Есть у метода MR и ряд недостатков и ограничений:

1. Смещение в результате неравновесного сцепления. Это явление, когда аллели различных локусов в одних комбинациях встречаются чаще, чем в других, т. е. их частота отличается от теоретической, рассчитанной на основании законов Харди-Вайнберга.

2. Плейотропные эффекты – влияние варианта гена на множество биологических путей. При горизонтальной плейотропии SNP может влиять на исход не через изучаемое воздействие (фактор риска), а другим путем. Горизонтальная плейотропия является нарушением предположений инструментальной переменной.

3. Перекрытие образцов. GWAS обычно включает метаанализ большого количества различных когорт, где каждая когорта, вероятно, вносит свой вклад в GWAS по многим различным характеристикам. Как следствие, вероятно, будет

значительное перекрытие выборок среди различных GWAS в базе данных, что может смещать оценки эффекта [42].

4. Выборки принадлежат разным популяциям. Хотя исследования воздействия и исходов, используемые в 2SMR, могут не включать общих участников, участники обоих исследований должны принадлежать одной и той же популяции, иметь сходное распределение по возрасту и полу, а также географическое и наследственное происхождение [413] с аналогичными паттернами неравновесного сцепления. Когда исследования воздействия и исходов проводятся на разных популяциях, это может смещать величину связи между воздействием и исходом. Кроме того, величина воздействия инструмента может варьироваться в зависимости от возраста или может отличаться у мужчин и женщин.

5. Множественное тестирование. Хотя автоматизация позволяет проводить более сложные исследования и увеличивает возможности для множественных испытаний, это также увеличивает риск ложных срабатываний и перебора данных (при этом пользователи не представляют результаты всех своих анализов, но выбирают наиболее подходящие).

6. Слабая систематическая ошибка инструмента – может иметь место в исследованиях MR при использовании одного или нескольких генетических вариантов, которые объясняют лишь небольшую часть вариации фактора риска в сочетании с небольшим размером выборки [342; 370].

Для анализа эффекта фактора риска (признак 1) на исход (признак 2) используется линейная регрессия эффектов SNP на признак 1 против эффектов SNP на признак 2. Коэффициент регрессии – это оценка причинного воздействия признака 1 на результирующий признак 2. В зависимости от присутствия или отсутствия плейотропных эффектов SNP на исследуемые признаки должна быть выбрана соответствующая регрессионная модель. Модель линейной регрессии, взвешенной по обратным дисперсиям, работает только при отсутствии плейотропии.

Были разработаны различные методы, которые учитывают генетическую плейотропию. Они помогают выяснить, зависит ли результат от предположения, что все варианты не обладают плейотропными эффектами. Один из таких подходов, известный как медианная оценка, может дать надежные результаты, если по крайней мере половина генетических вариантов не имеет плейотропных эффектов. Вторым методом, известным как регрессия Эггера, позволяет всем вариантам иметь плейотропные эффекты при условии, что размер этих плейотропных эффектов не зависит от размера воздействия генетических вариантов на интересующий фактор риска. Это дает возможность скорректировать результаты таким образом, чтобы оценить правильный размер эффекта признака 1 на признак 2.

Мощность исследования с использованием менделевской рандомизации определяется размером выборки и силой связи между предлагаемым инструментом и фактором риска. Слабые инструменты вызывают три проблемы. Во-первых, они предоставляют очень небольшую статистическую мощность для проверки гипотез. Во-вторых, смещение из-за нарушений основных допущений инструментальных переменных, таких как горизонтальные плейотропные эффекты вариантов, будет усилено. В-третьих, даже при использовании очень больших выборок результаты, полученные при использовании слабых инструментов, смещены в ту или иную сторону. Точность (оцениваемая с помощью доверительных интервалов) будет занижена. Слабые инструменты могут быть обнаружены с помощью F-статистики [316].

Самый простой подход в Менделевской рандомизации – поиск ассоциаций между генетическими вариантами и результатами (исходами). Этот тест относительно надежен, и о нем следует сообщать во всех исследованиях. Он предоставляет доказательства того, является ли фактор риска причиной результата, но не является информативным о величине эффекта. Величину причинного эффекта можно оценить, разделив ассоциацию «генетический вариант-результат» на ассоциацию «генетический вариант-фактор риска». Это соотношение известно как инструментальная переменная, или оценка Вальда [269].

В некоторых образцах связь между генетическим вариантом и результатом может быть затруднена из-за скрытой структуры популяции. Это может быть преодолено путем поправки на генетическое происхождение или ограничением этнически однородными образцами.

Менделевская рандомизация предлагает мощный подход для выявления новых биологических путей и терапевтических мишеней для терапии цереброваскулярных заболеваний. В настоящее время опубликовано более 100 исследовательских работ, использующих МР для изучения, подтверждения и количественной оценки причинно-следственных связей между факторами, предположительно ответственными за повышенный риск и неблагоприятный исход инсульта [51]. Большинство опубликованных исследований посвящено подтверждению влияния базисных факторов на риск развития ишемического инсульта. В частности, согласно данным, полученным в крупных когортах пациентов, подтверждено влияние генетически детерминированного риска артериальной гипертензии, систолической гипертензии, сахарного диабета II типа, ЛПНП на риск развития определенных подтипов инсульта [126; 174; 177; 178].

Применение метода МР представляет особую ценность для поиска новых факторов риска инсульта, изучение действия которых в традиционных клинических исследованиях представляет сложную и ресурсоемкую задачу. К таким факторам можно отнести уровни гормонов, цитокинов, микроэлементов, сигнальных молекул, радиологических показателей и др. Особую значимость МР-исследования продемонстрировали в идентификации причин эмболического инсульта из неуточненного источника (ESUS-синдром), позволил выявить спектр клинически важных факторов, таких как провоспалительные сигнальные пути (IL-6, хемокины MCP-1/CCL2) и маркеры системы гемостаза (фактор XI). В течение последних нескольких лет опубликованы исследования, изучавшие влияние тиреоидных гормонов на риск развития ишемического инсульта, но не на его функциональный исход [381; 382]. Ряд выполненных в течение последних нескольких лет МР-исследований, посвященных идентификации новых факторов риска инсульта, представлен в таблице 1.3.

Таблица 1.3 – Исследования по типу менделевской рандомизации, посвящённые поиску новых факторов риска инсульта

Авторы, публикации	год	Фактор риска	Полученные результаты
Larsson et al., [348]	2019	Уровень магния в сыворотке	Генетические детерминированные повышенные уровни магния ассоциированы со снижением риска кардиоэмболического инсульта
Schooling et al., [176]	2018	Уровень тестостерона в сыворотке	Генетические детерминированные повышенные уровни тестостерона ассоциированы со снижением риска ИИ
Marouli et al., [381]	2020	Уровень ТТГ	Повышение ТТГ на 1 стандартное отклонение ассоциировано со снижением риска ИИ на 5%
Yuan et al., [143]	2020	Фактор некроза опухоли	Генетическое детерминированное повышение уровня фактора некроза опухоли ассоциировано с повышением риска ИИ
Chong et al., [279]	2022	Количество копий митохондриальной ДНК лейкоцитов	Снижение копий митохондриальной ДНК лейкоцитов ассоциировано с увеличением риска неблагоприятного исхода ИИ
Zhang et al.,	2022	Генетическая предрасположенность к респираторным синдромам при COVID-19	Генетическая предрасположенность к респираторным синдромам при COVID-19 ассоциирована с повышенным риском ИИ

Помимо идентификации и верификации новых факторов риска развития цереброваскулярной патологии широкие перспективы использования метода менделевской рандомизации в неврологических исследованиях заключаются в возможности поиска молекулярных мишеней для разработки нейропротекторных препаратов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С целью всестороннего изучения влияния компонентов, составляющих систему тиреоидного гомеостаза, на течение и исход острых нарушений мозгового кровообращения, было проведено комплексное исследование, включающее клинический этап, экспериментальный этап и аналитический этап, представленный менделевским рандомизационным исследованием и анализом дифференциальной экспрессии генов. Использование метода менделевской рандомизации позволяет подтвердить клинические данные благодаря возможности в значительной степени исключить влияния вмешивающихся факторов, что характерно для традиционных клинических исследований [51; 435]. Все этапы исследования были одобрены локальным комитетом по биоэтике ИНВХ им. В.К. Гусака.

2.1. Объем и методы клинического этапа исследования

Клинический этап исследования основан на анализе клинических, инструментальных и лабораторных данных пациентов с ишемическим инсультом, с акцентом на изучение тиреоидного профиля в острый период ишемического инсульта и его влияния на показатели постинсультного неврологического дефицита. Для решения поставленных задач применялись следующие методы исследования: клиничко-неврологическое обследование больных, биохимические, иммунологические, нейровизуализационные, ультразвуковые методы исследования, статистический анализ.

2.1.1. Общая характеристика изучаемого контингента пациентов

Исследование было проведено на базе отделения реконструктивной ангионеврологии и нейрореабилитации, лаборатории клинической иммунологии, отдела экспериментальной хирургии ИНВХ им. В.К. Гусака с 2017 г. по 2022 г.

Критерии включения:

- 1) острый церебральный ишемический инсульт;
- 2) госпитализация в период до 24 часов от появления симптомов инсульта;
- 3) возраст старше 18 лет.

Критерии исключения: геморрагический инсульт, лакунарный инсульт, наличие декомпенсированной тяжелой соматической патологии, онкологических заболеваний, аутоиммунного тиреоидита или рака (в т.ч. в анамнезе) щитовидной железы, сумма баллов по шкале комы Глазго менее 8, текущая ТЭЛА, терапия амиодароном, L-тироксидом или тирозолом, наличие тяжелого системного заболевания, ХПН (СКФ < 60 мл/мин), хирургическое вмешательство в течение 30 дней до скрининга.

Пациенты с лакунарным инсультом не включались в исследование, т.к. при данном подтипе ишемического инсульта неврологический дефицит в большей степени зависит не от размеров очага, а от вероятности локализации очага в стратегических зонах, на что влияет большое количество факторов, не доступных для анализа [359].

Расчеты размера выборки выполнялись с применением специализированного пакета «rwr» для среды статистических вычислений R [203]. Данный пакет содержит функции для базовых расчетов мощности с использованием размеров эффектов из методов, представленных Cohen et al. (1988): тест для одной пропорции; тест для двух пропорций (неравные размеры выборки); тест для общей линейной модели; вычисление размеров эффектов для всех предыдущих тестов, соответствующих обычным размерам эффекта (малый, средний, значительный).

Для расчета размеров выборки была выбрана статистическая мощность 0,8 и коэффициент статистической значимости p менее 0,05. Расчет размеров выборки для решения поставленных в исследовании задач представлен в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Оптимальные размеры выборки в соответствии с выбранными статистическими методами анализа

Задача	Статистический метод	Оптимальный размер выборки
Влияние предикторов на тяжесть неврологического дефицита	Мультивариантная регрессия	135 пациентов (18 предикторов, умеренная величина эффекта)
Различия в тяжести неврологического дефицита и в исходах инсульта	ANOVA-тест	157 пациентов (3 группы, умеренная величина эффекта)
Влияние предикторов на исход инсульта	Логистическая регрессия	136 пациентов (18 предикторов, умеренная величина эффекта)
Корреляция между показателями	Тест Спирмена	106 пациентов (для выявления силы корреляции $r > 0,2$)

С учетом анализа оптимального размера выборки в исследование было включено 158 пациентов. Средний возраст составил $71,6 \pm 10,5$ лет. Среди включенных в исследование пациентов были 104 мужчин (66%), средний возраст $68,2 \pm 10,4$ года и 54 женщины (34%), средний возраст $79,1 \pm 6,7$ лет.

2.1.2. Клинические методы исследования

Всем пациентам проводился комплексный клинико-неврологический осмотр в динамике. Данные, полученные при осмотре, оценивались на 1-е, 7-е и 21-е сутки пребывания больного в стационаре.

Тяжесть неврологической симптоматики в остром периоде ишемического инсульта оценивалась в динамике с помощью Скандинавской шкалы инсульта (Scandinavian Stroke Scale).

Скандинавская шкала инсульта (SSS) — это клинический показатель функциональных нарушений и ограничений активности у пациентов с острым

инсультом. Впервые она была представлена Копенгагенской группой по изучению инсульта в 1985 году. Шкала состоит из девяти пунктов, оценивающих сознание, движение глаз, двигательную способность рук, двигательную способность кистей, двигательную способность ног, ориентацию, речь, парез мимической мускулатуры и походку. Каждый пункт оценивается по порядковой шкале, включающей от двух до пяти категорий, при этом баллы по пунктам варьируются от 2 до 12. В оригинальной шкале пациенты без сознания не могли быть оценены, так как самая низкая категория в этом пункте гласила: реагирует на вербальные команды, но не находится в полном сознании (оценка 2). Однако пересмотр шкалы добавил категорию без сознания (оценка 0). Таким образом, суммарные оценки варьируются от 0 до 58 в отредактированной версии, где 0 означает тяжелые неврологические нарушения, а 58 – отсутствие неврологических нарушений. Скандинавская включает пункты, которые просты для оценки и не требуют сложной региональной и языковой адаптации. Поэтому при разработке шкалы были исключены такие пункты, как дизартрия, поля зрения и оценка рефлекторной сферы.

Скандинавская шкала включает в себя следующие пункты:

1. Сознание: норма - 6, оглушение - 4, реакция на словесные команды - 2, кома или ступор (реакция только на боль) - 0;
2. Ориентация: норма во времени, месте и личности - 6, два признака из них - 4, один признак из них - 2, полная дезориентация - 0;
3. Речь: норма - 10, ограничение произнесения или понимания - 6, более, чем да/нет, но менее предложения - 3, только да/нет или меньше - 0;
4. Движения глаз: нет глазодвигательных нарушений - 4, есть глазодвигательные нарушения - 2, парез взора - 0;
5. Паралич мимической мускулатуры: нет - 2, есть - 0;
6. Походка: более 5 метров без помощи - 12, может идти с опорой (тростью) - 9, может идти с посторонней помощью - 6, сидение без опоры - 3, прикован к постели (креслу) - 0;

7. Рука (только на стороне пареза): поднятие с нормальной силой - 6, поднятие со сниженной силой - 5, поднятие с согнутым локтем - 4, только в плоскости опоры (без преодоления силы тяжести) - 2, паралич - 0;

8. Кисть (только на стороне пареза): нормальная сила - 6, уменьшенная сила - 4, не может сжать пальцы в кулак - 2, паралич - 0;

9. Нога (только на стороне пареза): нормальная сила - 6, поднятие ноги с уменьшенной силой - 5, поднятие ноги только согнутой в колене - 4, без преодоления силы тяжести - 2, паралич - 0;

10. Стопа (только на стороне пареза): нет пареза - 2, парез - 0.

Скандинавская шкала обладает рядом преимуществ по сравнению с иными шкалами: простота, высокая чувствительность к выявлению легких нарушений двигательных функций конечностей (отсутствие эффекта «потолка»), отсутствие заданий, требующих языковой и культурной валидации. При этом показатели чувствительности и специфичности Скандинавской шкалы в прогнозировании исходов инсульта сопоставимы с иными шкалами. Сравнительные характеристики чувствительности и специфичности оценочных неврологических шкал представлены в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Сравнительные характеристики чувствительности и специфичности оценочных шкал тяжести неврологического дефицита при церебральном инсульте [193]

Шкала	Характеристика	Значение, %
NIHSS	Чувствительность	92,2
	Специфичность	64,6
CNS	Чувствительность	88,2
	Специфичность	43,6
GHS	Чувствительность	92,2
	Специфичность	54,0
POLYCLASS	Чувствительность	90,2

Продолжение таблицы 2.2

	Специфичность	75,8
SSS	Чувствительность	84,0
	Специфичность	89,0
mRs	Чувствительность	85,6
	Специфичность	91,7
IB	Чувствительность	87,0
	Специфичность	91,0

Проведенные клинические исследования демонстрируют эквивалентность Скандинавской шкалы тяжести инсульта шкале NIHSS при прогнозировании функциональных исходов через 3 месяца после перенесенного ишемического инсульта [375]. Кроме того, показатели Скандинавской шкалы коррелируют с данными КТ-характеристик ишемического очага по шкале ASPECTS [67]. В Российской Федерации Скандинавская шкала используется в клинических рекомендациях «Ишемический инсульт и транзиторная ишемическая атака у взрослых» [11] и в клинических исследованиях.

Для оценки функциональных исходов перенесенного ишемического инсульта применялась модифицированная шкала Рэнкина. Шкала не только позволяет объективизировать динамику симптомов и функциональных нарушений, но и оценить эффективность реабилитационных мероприятий, а также необходимость в использовании вспомогательных приспособлений. Модифицированная шкала Рэнкина включает в себя 6 степеней потери дееспособности: 0 - симптомы отсутствуют, 1 - незначительное уменьшение дееспособности, 2 - лёгкая потеря дееспособности, 3 - средняя степень потери дееспособности, 4 - среднетяжелая степень нарушения дееспособности, 5 - тяжёлое нарушение дееспособности. Русскоязычная версия модифицированной шкалы Рэнкина валидирована для применения в Российской Федерации [4].

2.1.3. Инструментальные методы исследования

Комплекс инструментальных методов обследования включал в себя дуплексное сканирование брахиоцефальных сосудов, магниторезонансную томографию (МРТ) головного мозга, ультразвуковое исследование органов брюшной полости и забрюшинного пространства, ультразвуковое исследование сердца (Эхо-КГ), щитовидной железы, ЭКГ. Исследования проводились на базе Института неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака Министерства здравоохранения Донецкой Народной Республики.

Для оценки поражения экстракраниальных брахиоцефальных сосудов применялась ультразвуковая доплерография на аппарате Toshiba Aplio 500 (TUS-A500cv). Проводился анализ толщины комплекса интима-медиа, внутрипросветного диаметра сосуда, степени нарушения проходимости сосуда вследствие наличия внутрипросветных образований. Для локализации и измерения толщины комплекса интима-медиа сонных артерий использовался линейный датчик с максимальной частотой 7,5 МГц.

Магниторезонансная томография головного мозга применялась для подтверждения диагноза ишемического инсульта, оценки характеристик ишемических очагов и исключения отличных от ишемии зон поражения головного мозга. Исследование проводилось на аппарате «Амико MPF3000». Технические характеристики аппарата: динамическая система балансировки (DBT), технология активного экранирования контура, активное шиммирование высокого порядка, быстропоточная конструкция эффективности полюсов, технология одновременной визуализации воды и жира (разделение Жир-Вода), система «Back-logic». Использовали стандартные режимы T1-, T2-взвешенных изображений и FAST FLAIR.

Для выявления структурных изменений щитовидной железы использовался метод сонографии. Исследование проводилось на аппарате «Toshiba Aplio 400 (TUS-A400)».

Ультразвуковое исследование сердца применялось для исключения классической и парадоксальной кардиальной эмболии, а также кардиогенной этиологии ишемического инсульта. Проводилась оценка таких параметров, как объемы камер сердца, фракция выброса левого желудочка, градиенты давления на клапанах сердца, толщина и структура миокарда, наличие внутрикамерных образований. Исключались пороки развития сердца, в том числе открытое овальное окно, аневризма межпредсердной перегородки, наличие сети Киари, рудимента Евстахиевого клапана и др. ЭКГ применялась для исключения нарушения ритма сердца, прежде всего, фибрилляции предсердий и атрио-вентрикулярных блокад. Исследование проводилось в стандартном режиме с использованием 3 стандартных отведений и 6 грудных отведений.

2.1.4. Лабораторные методы исследования

Исследование лабораторных биомаркеров, влияющих на тяжесть неврологического дефицита и функциональный исход инсульта, проводилось на базе лаборатории клинической иммунологии Института неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака. Помимо выполнения анализов, предусмотренных клиническими рекомендациями по оказанию помощи пациентам с ишемическим инсультом, всем пациентам были исследованы уровни свободного трийодтиронина, свободного тироксина, тиреотропного гормона, а также С-реактивного белка.

Содержание тиреоидных гормонов и ТТГ в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA) на приборах настольной лаборатории *Labsystems Multiscan Ascent* с использованием тест-систем производства «Алкор-Био» (Россия, Санкт-Петербург) – «ТиреоидИФА-свободный Т3», «ТиреоидИФА-ТТГ» (лот 309) и «ТиреоидИФА-свободный Т4» (лот 211AZ1) соответственно.

Характеристики тест-системы «ТиреоидИФА-свободный Т3»

Чувствительность тест-системы – 0,5 пмоль/л. Специфичность: перекрестная реакция антител к трийодтирону с другими тироидами составляет менее 0,1%. Коэффициент вариации – не более 8%.

Характеристики тест-системы «ТиреоидИФА-ТТГ»

Чувствительность тест-системы – 0,05 мкМЕ/мл. Хук-эффект при высоких концентрациях не наблюдается при значениях ТТГ ниже 800 мкМЕ/мл. Специфичность: не дает перекрестной реакции с другими тропными гормонами (ЛГ, ФСГ, ХГЧ-β). Коэффициент вариации – не более 8%.

Характеристики тест-системы «ТиреоидИФА-свободный Т4»

Чувствительность тест-системы – 1,0 пмоль/л. Специфичность: перекрестная реакция антител к тироксину с L-трийодтироном – 8%, с L-дийодтироном – 0,001%. Коэффициент вариации – не более 8%.

Определение С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови проводили турбидиметрическим методом с использованием тест-системы «С-реактивный белок IMULATEST» производства PLIVA-Lachema Diagnostika. Измерения проводили на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Eppendorf EPAC 6140 при длине волны 340 нм.

Характеристики тест-системы «С-реактивный белок IMULATEST»

Чувствительность тест-системы: 1,4 мг/л. Хук-эффект не наблюдается при концентрации СРБ до 950 мг/л. Специфичность: триглицериды (менее 11,3 ммоль/л), гемоглобин (менее 200 мкмоль/л), билирубин (менее 100 мкмоль/л) не влияют на результаты анализа.

2.1.5. Методы статистической обработки данных

Полученные в ходе исследования данные заносились в редактор электронных таблиц Microsoft EXCEL 14.0 с последующей обработкой в пакетах лицензионных статистических программ RStudio и MedCalc. Согласно международным рекомендациям по выполнению статистического анализа в медицинских исследованиях, обработка данных проводилась в несколько этапов. На первом этапе определялось соответствие полученных данных нормальному закону распределения. При этом использовались критерии Шапиро-Вилка и Д'Агостини. При проведении анализа на нормальность распределения установлено, что только возраст пациентов соответствовал нормальному закону распределения. В дальнейшем для анализа возрастных данных применялись параметрические методы исследования – анализ среднего арифметического, ошибки среднего, t-критерий Стьюдента. Для остальных показателей использовались непараметрические методы статистического анализа.

Количественные признаки описывались с помощью среднего, стандартного отклонения, медианы и квартилей. Качественные данные представлялись в виде абсолютных частот и процентов.

Для сравнения групп по категориальным данным использовался метод Хи-квадрат. Для определений различий между двумя независимыми выборками использовался U-критерий Манна-Уитни. Данный критерий применяется для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню какого-либо признака, измеренного количественно. Тест позволяет выявлять различия в значении параметра между малыми выборками. Этот метод определяет, достаточно ли мала зона перекрещивающихся значений между двумя рядами (ранжированным рядом значений параметра в первой выборке и таким же во второй выборке). Чем меньше значение критерия, тем вероятнее, что различия между значениями параметра в выборках достоверны.

Определяется значение U-критерия Манна-Уитни по формуле:

$$U = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_x \cdot (n_x + 1)}{2} - T_x.$$

где n_1 - количество элементов в первой выборке, n_2 - количество элементов во второй выборке, T_x – большая из двух ранговых сумм.

Для анализа динамики изменения показателей в исследуемых группах нами был использован критерий Вилкоксона. Т-критерий Вилкоксона - непараметрический статистический тест, используемый для проверки различий между двумя выборками парных измерений. Критерий предназначен для сопоставления показателей, измеренных в двух разных условиях на одной и той же выборке испытуемых. Он позволяет установить не только направленность изменений, но и их выраженность, то есть способен определить, является ли сдвиг показателей в одном направлении более интенсивным, чем в другом. Величина статистика критерия, отвечающая нулевой гипотезе, определялась по формуле:

$$T = \sum Rr$$

где Rr – ранговые значения сдвигов с более редким знаком.

Для оценки влияния одного или нескольких предикторов на зависимый показатель использовался линейный регрессионный анализ. Данный статистический метод позволяет определить влияние одной или нескольких независимых переменных X_1, X_2, \dots, X_p на зависимую переменную Y . Линия регрессии определялась в виде линейной функции $Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+\dots+b_nX_n$ (линейная регрессия). Построение регрессионной модели выполнялось с помощью функции `glm` в системе статистических вычислений R. В регрессию поочередно (метод `forward`) вводились предикторы, при этом проводилась оценка статистической значимости коэффициентов. Если статистическая значимость отличия коэффициента от 1 превышала критический уровень $p=0,05$, то предиктор

исключался из регрессионной модели. Также проводилась проверка на мультиколлинеарность путем расчета VIF-фактора (фактор вариации инфляции).

Для оценки корреляции между двумя переменными использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена, так как он не требует наличия нормального закона распределения.

Для анализа различий показателей в сравниваемых подгруппах использовался дисперсионный анализ (тест ANOVA). Метод направлен на поиск зависимостей в экспериментальных данных путём исследования значимости различий в средних значениях. Для определения влияния нескольких предикторов на межгрупповые различия использовался многофакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA).

Влияние предикторов на функциональный исход инсульта изучалось методом логистической регрессии. В качестве зависимой переменной были выбраны показатели по модифицированной шкале Рэнкина, дихотомизированные на «благоприятный» исход (0-2 балла) и «неблагоприятный» исход (3-6 баллов). Построение регрессионной модели выполнялось с помощью функции `glm (family = «logit»)` в системе статистических вычислений R.

Несмотря на то, что в большинстве клинических исследований, изучающих влияние различных предикторов на функциональный исход инсульта, в качестве конечной точки выбирается дихотомизированный показатель по шкале Рэнкина, ряд научных организаций, включая Европейскую Организацию по борьбе с инсультом (ESO), рекомендуют использовать порядковую конечную точку. При подобном подходе не происходит потеря клинически значимой информации в диапазоне «неблагоприятного» исхода, в частности, о способности к передвижению (например, 3 балла – пациент передвигается без посторонней помощи и 5 баллов – пациент прикован к постели). Кроме того, использование полной шкалы mRs повышает статистическую чувствительность.

Для определения предикторов, влияющих на функциональный исход инсульта по всему спектру шкалы mRs был использован метод порядковой логистической регрессии, представляющий собой расширение простой

логистической регрессии для бинарной переменной отклика (функция `polr` библиотеки MASS в среде R). Для определения наиболее эффективной модели были использованы информационные критерии Акайке и Шварца.

Одно из предположений, лежащих в основе порядковой логистической (и порядковой пробитовой) регрессии, заключается в том, что отношения между каждой парой групп результатов одинаковы. Порядковая логистическая регрессия предполагает, что коэффициенты, описывающие отношения между самой низкой и всеми более высокими категориями переменной ответа, такие же, как те, что описывают отношения между следующей самой низкой категорией и всеми более высокими категориями и т. д. Применительно шкалы Рэнкина имеются основания считать, что отношения между парами групп могут отличаться. В частности, 1 и 2 балла представляют собой легкий дефицит, в то время как 5 и 6 баллов – тяжелый дефицит или смерть, что нельзя считать равнозначным. Данный факт может требовать поиск иных коэффициентов для прогнозирования. С целью преодоления возможных нарушений требований к порядковой логистической регрессии нами был применён метод векторной обобщенной линейно-аддитивной модели (VGAM/VGLM), представленный в пакете VGAM для среды статистических вычислений R. Данный пакет основан на алгоритме наименьших квадратов с повторным взвешиванием (IRLS), представленном в работах Yee et al. [438].

Для определения направленности эффекта действия между переменными (причинная связь) использовался тест Грэнджера, представленный функцией `granger.test` пакета `lmetest` для среды статистических вычислений R. Тест Грэнджера на причинность — процедура проверки причинной связи («причинность по Грэнджеру») между временными рядами. Идея теста заключается в том, что значения (изменения) временного ряда, являющегося причиной изменений временного ряда, должны предшествовать изменениям этого временного ряда, и кроме того, должны вносить значимый вклад в прогноз его значений. Если же каждая из переменных вносит значимый вклад в прогноз другой, то, возможно, существует некоторая другая переменная, которая влияет на оба фактора. В тесте Грэнджера последовательно проверяются две нулевые гипотезы: « x не является

причиной y по Грэнджеру» и « y не является причиной x по Грэнджеру». Для проверки этих гипотез строятся две регрессии: в каждой регрессии одна из проверяемых на причинность переменных является зависимой, а регрессорами выступают лаги обеих переменных (векторная авторегрессия).

Для определения прогностической ценности предикторов формирования стойкого неврологического дефицита использовался анализ ROC-кривых (receiver operating characteristic). ROC-кривая представляет собой график, позволяющий оценить качество бинарной классификации, он отображает соотношение между долей объектов от общего количества носителей признака, верно классифицированных, как несущих признак, и долей объектов от общего количества объектов, не несущих признака, ошибочно классифицированных, как несущих признак. Анализ ROC-кривых является общепризнанным стандартом для определения качества и информативности диагностических тестов в медицине. Данный метод позволяет выполнить расчет чувствительности и специфичности диагностического теста. Кроме того, с помощью данного метода возможно определение численного значения клинической эффективности теста путем расчета показателя AUC (area under curve). Чем ближе значение AUC к 1, тем большей ценностью обладает диагностический тест.

2.2. Методы экспериментального этапа исследования

Для проверки научной гипотезы о наличии нейропротекторных эффектов у дейодированных метаболитов гормонов щитовидной железы в ГУ "Институт физико-органической химии и углехимии им. Л.М. Литвиненко" была синтезирована исследуемая субстанция – синтетический аналог тиронамина T0AM (далее – SA-T0AM). Синтез был выполнен по технологии, описанной Chiellini G. et al. [124] с собственными модификациями.

Спектры ЯМР ^1H записывали на приборе Bruker Avance II 400, внутренний стандарт – тетраметилсилан. Спектры поглощения в УФ-видимом диапазоне

записывали на спектрофотометре Helios Gamma фирмы Thermo Electron Corporation, США. Температуры плавления синтезированных соединений определены на нагревательном приборе типа Voetius и не подвергались коррекции.

2.2.1. Методика синтеза и характеристики 4-[4-(2-аминоэтокси)бензил]анилина (CA-T0AM)

Синтез соединения CA-T0AM (рисунок 2.1) выполнен в соответствии с методикой, предложенной Chellini et al. [123]. 3D-модель соединения получена в результате оптимизации молекулярной геометрии CA-T0AM в приближении полуэмпирического квантово-химического метода PM6 [267] с помощью программного комплекса MOPAC2016 [268]. Стратегию синтеза иллюстрирует схема на рисунке 2.2.

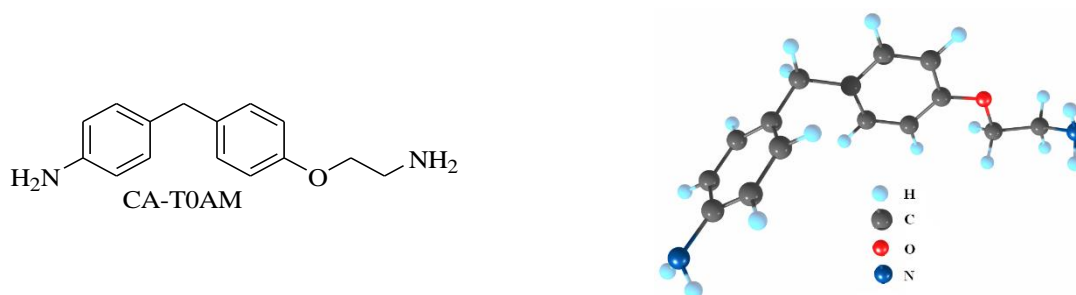


Рисунок 2.1 – 2D и 3D структурные модели 4-[4-(2-аминоэтокси)бензил]-анилина

На первом этапе получали биарильное производное путем взаимодействия *n*-нитробензилбромида с 4-метоксибороновой кислотой по реакции Pd-катализируемого кросс-сочетания Сузуки-Миура (стадия А). Продукт реакции обрабатывали трибромидом бора (стадия В). Полученное фенольное производное алкилировали бромацетонитрилом (стадия С). Целевой продукт CA-T0AM получали восстановлением с помощью $\text{LiAlH}_4/\text{AlCl}_3$ (стадия D). Гидрохлорид соединения CA-T0AM переводили в основание подщелачиванием его водного раствора насыщенным водным раствором карбоната натрия с последующей экстракцией хлористым метиленом, осушкой экстракта и упариванием под

вакуумом. Синтезированный таким образом 4-[4-(2-аминоэтокси)бензил]анилин охарактеризован методами ЯМР ^1H и УФ спектроскопии.

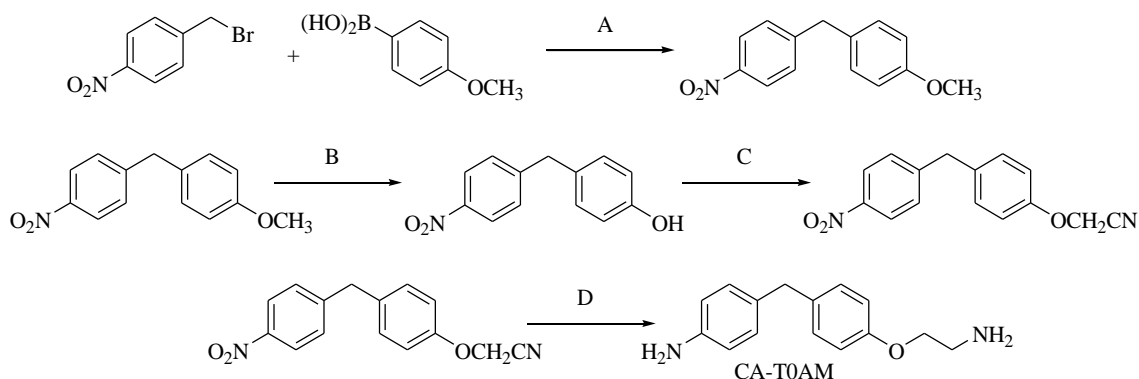


Рисунок 2.2 – Стратегия синтеза 4-[4-(2-аминоэтокси)бензил]анилина

Выход 4-[4-(2-аминоэтокси)бензил]анилина составил 62 % в виде гидрохлорида, $T_{\text{пл}} = 228\text{-}230\text{ }^{\circ}\text{C}$. В растворе $\text{DMCO-}d_6$ получены спектры ЯМР ^1H основания и гидрохлорида 4-[4-(2-аминоэтокси)бензил]анилина с хорошим разделением всех групп сигналов (рисунки 2.3 и 2.4 соответственно). В спектрах присутствуют сигналы основных групп протонов СА-Т0АМ, остаточный сигнал растворителя и отсутствуют сигналы исходных соединений, возможных сопутствующих и неидентифицированных примесей.

УФ-спектр 4-[4-(2-аминоэтокси)бензил]анилина в ацетонитриле показан на рисунке 2.5. Он имеет максимумы поглощения в области 225 нм ($\epsilon = 8500\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 246 нм ($\epsilon = 9400\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 277 нм ($\epsilon = 2000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 282 нм ($\epsilon = 1900\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) и 297 нм ($\epsilon = 1300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

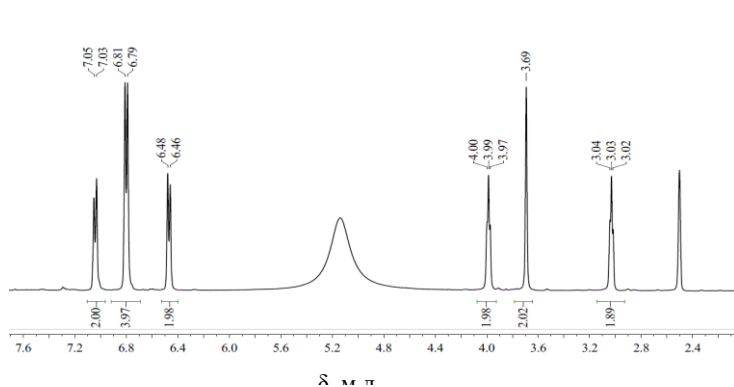


Рисунок 2.3 – ЯМР ^1H спектр 4-[4-(2-аминоэтокси)бензил]анилина в ДМСО

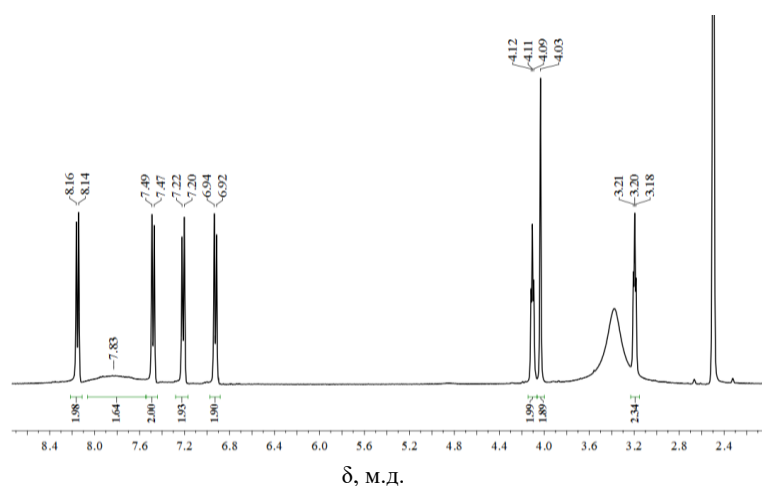


Рисунок 2.4 – ЯМР ^1H спектр гидрохлорида 4-[4-(2-аминоэтокси)бензил]-анилина в DMSO-d_6

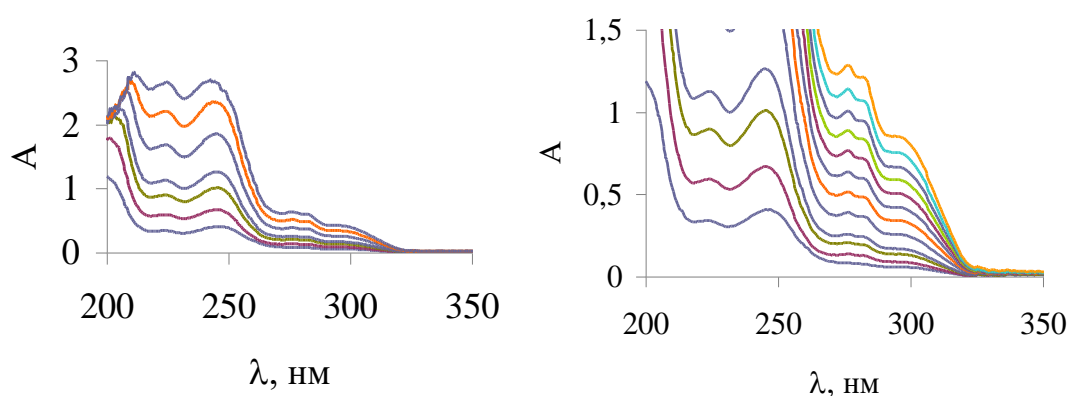


Рисунок 2.5 – УФ-спектр 4-[4-(2-аминоэтокси)бензил]анилина в ацетонитриле

Подбор оптимальной дозы СА-Т0 осуществлялся по степени максимальной выраженности фармакологически индуцированной гипотермии после введения препарата при отсутствии внетерапевтических эффектов. Известно, что метаболит трийодтиронина Т1АМ способен индуцировать гипотермию, однако, подобные эффекты у дейодированного метаболита трийодтиронина Т0АМ практически не изучены [220; 240; 299; 301; 318].

Фармакологически индуцированные изменения ректальной температуры анализировали в экспериментальном исследовании на 38 беспородных белых

крысах, массой 200-250 г, которые содержались в виварии в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде.

Животные были разделены на 5 групп: экспериментальные группы 1 (n=12), 2 (n=10), 3 (n=6), 4 (n=6) и контрольная группа К (n=10). Животным из группы 1 вводили внутривбрюшинно тиронамин из расчета 50 мг/кг массы тела, растворенный в 0,5 мл физраствора (хлорид натрия 0,9%) и 0,5 мл димексида. Животным из группы 2 внутривбрюшинно вводили тиронамин из расчета 75 мг/кг, растворенный в 0,5 мл физраствора и 0,5 мл димексида. Животным из группы 3 внутривбрюшинно вводили тиронамин из расчета 100 мг/кг, растворенный в 0,5 мл физраствора и 0,5 мл димексида. Животным из группы 4 внутривбрюшинно вводили тиронамин из расчета 200 мг/кг, растворенный в 0,5 мл физраствора и 0,5 мл димексида. Животные из группы К не получали исследуемого вещества; им вводили внутривбрюшинно 0,5 мл физраствора и 0,5 мл димексида.

Ректальную температуру тела измеряли термометром цифровым TFA с внешним проводным датчиком. Замеры производились за 5 минут до инъекции (начальная температура) и в течение 4 часов после инъекции с интервалами в 30 минут.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2007 и MedCalc. Для сравнения различий между группами использовали U-критерий Манна-Уитни. Для сравнения температур до и после введения тиронаминов использовали W-критерий Уилкоксона.

2.2.2. Экспериментальное моделирование острой полушарной ишемии головного мозга

На следующем этапе работы была сформирована новая группа животных, состоящая из 30 белых беспородных лабораторных крыс массой 250-300 г. Животные были разделены на три группы: «Sham», «Control» и «T0AM» по 10 животных в каждой группе.

Животным из группы «Т0АМ» (эксперимент) под общей анестезией (внутрибрюшинное введение препарата «Калипсол» в дозе 100 мг/кг) была выполнена операция – перманентная перевязка правой общей сонной артерии (ОСА) шелковой нитью (лигатурой). Через 10 минут после пережатия артерии животным внутрибрюшинно вводили исследуемый препарат – СА-Т0АМ в дозировке 75 мг/кг, растворенный в 0,5 мл димексида и 0,5 мл раствора натрия хлорида 0,9%.

Животным из группы «Control» (контроль без лечения) также перманентно перевязывали правую ОСА; через 10 минут после операции животным вводили внутрибрюшинно растворитель (0,5 мл димексида и 0,5 мл раствора натрия хлорида 0,9%) без исследуемого вещества.

С животными из группы «Sham» (ложная операция) производили те же хирургические манипуляции, что и с двумя предыдущими группами, вплоть до подвода шелковой нити под правую ОСА. Однако крысам группы «Sham» не пережимали артерию, а через 10 минут после подвода лигатуры под правую ОСА, ее концы аккуратно обрезали, и вводили животным растворитель без исследуемого вещества внутрибрюшинно.

2.2.3. Способы оценки поведенческих нарушений и неврологического дефицита в экспериментальной модели инсульта

В течение всей операции регистрировали ректальную температуру крыс с использованием цифрового термометра TFA с внешним проводным датчиком. Для поддержания постоянной температуры тела животного во время операции использовали подогрев с помощью медицинского рефлектора.

Для определения показателей тревожности, двигательной и исследовательской активности животных тестировали в установке «Открытое поле» до операции и повторно – спустя 24 часа после операции. Тест «Открытое поле» представляет собой прямоугольную камеру размерами 1 м x 1 м со стенками

высотой 0,4 м. Пол камеры разделен на 16 равных квадратов: 12 наружных и 4 внутренних. Для регистрации поведения животного использовалась видеосъемка. Процедура тестирования начиналась с помещения животного в центр «открытого поля». Время экспозиции каждого животного в поле составляло 3 минуты. После каждого теста пол установки тщательно обрабатывали мыльным раствором. Тестирование повторяли в одно и то же время суток.

В «открытом поле» регистрировали следующие показатели:

- общее число пересеченных квадратов;
- общее число стоек;
- число пересечений внутренних квадратов;
- число стоек во внутренних квадратах;
- число актов груминга и их суммарная продолжительность во внутренних квадратах;
- число актов груминга и их суммарная продолжительность во всех квадратах установки;
- число актов дефекаций и уринаций.

Переход в новый квадрат регистрировали, когда животное пересекало линию между квадратами тремя лапами.

Для оценки неврологического дефицита использовали следующие шкалы: 28-бальный неврологический тест, NSS, шкала Лонга, шкала Гарсиа.

Неврологический 28-бальный тест состоит из 11 заданий на общее состояние лабораторной крысы и координацию ее движений.

Задания, входящие в 28-бальный неврологический тест:

1. Вращение – крысу ставят на пол и наблюдают за ее передвижением, регистрируя движения по кругу (оценка: 4б-нет вращения, активность нормальная; 3б-нет вращения, активность снижена; 2б-незначительное вращение, нормальная активность; 1б-вращение выражено, активность снижена; 0б-движение отсутствует).

2. Общее состояние – оценивают общее состояние животного (оценка: 3б-шерстный покров крысы в хорошем состоянии, здоровая кожа, нормальная масса

тела (250-300г); 2б-наружные покровы в хорошем состоянии, масса тела снижена; 1б-незначительные дефекты наружных покровов, масса тела снижена; 0б-плохое общее состояние, истощение).

3. Рефлекс переворачивания – крысу кладут на спину и оценивают, насколько успешно она переворачивается на живот (оценка: 1б-переворачивается; 0б-не переворачивается).

4. Тест на наклонной платформе – крысу ставят на ровную нескользкую поверхность, расположенную под углом 45° к поверхности пола, головой вниз, и наблюдают за тем, как быстро крыса повернется головой кверху (оценка: 3б-поворачивается за 5сек; 2б-поворачивается за 20 сек; 1б-переворачивается более чем за 20 сек; 0б-не поворачивается).

5. Контрлатеральный рефлекс – крысу держат за основание хвоста, подвешенной над столом; животное должно сгибаться латерально в попытке дотянуться до хвоста (оценка: 1б-сгибается; 0б-не сгибается).

6. Контрлатеральное вращение – крысу держат за основание хвоста, подвешенной над столом и медленно вращают по очереди в обе стороны; животное должно поворачивать голову в направлении, противоположном направлению вращения (оценка: 2б-поворачивает голову при тесте в обе стороны; 1б-поворачивает голову только в одну сторону; 0б-нет реакции).

7. Подвижность – наблюдают за общей подвижностью крысы (3б-двигается активно, без вращений; 2б-активность средняя, без вращений; 1б-малоподвижная или вращается на одном месте; 0б-не двигается).

8. Перестановка лап – крысу располагают вдоль края стола головой вправо и аккуратно тянут одновременно за обе правые лапы (заднюю и переднюю), оценивая, насколько успешно крыса возвращает их в исходное положение. Повторяют тест для левых лап (оценка: по 1б на каждую успешно поставленную на стол лапу).

9. Вис на балке – крысу подвешивают за передние лапы на узкую балку; оценивают продолжительность вися (оценка: 3б-за 5 сек. крыса подтягивает обе

задние лапы на балку; 2б-за 5 сек. подтягивает одну заднюю лапу на балку; 1б-не подтягивает задние лапы; 0б-падает с балки).

10. Сила хватки – крысу держат за основание хвоста и опускают на горизонтальную решетку до момента захвата передними лапами. Аккуратно тянут животное за хвост и оценивают силу хватки (оценка: 3б-крепко держится за решетку двумя лапами; 2б-держится одной лапой; 1б-держится одной или двумя лапами, но слабо; 0б-не держится).

11. Визуальное дотягивание – крысу держат за основание хвоста и подносят к краю стола так, чтобы уровень глаз находился чуть ниже границы поверхности стола. Оценивают дотягивание передними лапами до края стола после визуального нахождения столешницы (оценка: 2б-дотягивается обеими лапами; 1б-дотягивается одной лапой; 0б-не дотягивается).

У здорового интактного животного сумма всех баллов должна составлять 28; чем меньше это число, тем более выражен неврологический дефицит.

Шкала NSS состоит из 5 заданий на сенсорную чувствительность и координацию движений крысы.

Задания шкалы NSS:

1. Подвешивание за хвост – крысу держат подвешенной за основание хвоста в течение не менее 30 сек. и наблюдают за тонусом лап (оценка: 0б-нормальный тонус; 1б-какая-либо из лап находится в постоянно согнутом состоянии либо голова отклоняется от оси тела на 10° через 30 сек.).

2. Ходьба по горизонтальной поверхности – наблюдают за характером передвижений крысы по горизонтальной поверхности (0б-нормально движение; 1б-двигается активно, но кругами или зигзагообразно; 2б-ходит кругами в направлении поврежденной стороны; 3б-заваливается на поврежденную сторону).

3. Баланс на балке – крысу помещают на горизонтальную балку шириной 2 см и оценивают характер движения (0б-идет свободно; 1б-зажимает края балки лапами при ходьбе; 2б-балансирует, но одна из лап срывается; 3б-падает через 30

сек; 4б-падение через 20 сек; 5б-падение через 10 сек; 6б-падение менее чем через 10 сек.).

4. Сенсорные тесты – ушной палочкой касаются поочередно до роговицы глаз и ушного проема с правой и левой сторон; регистрируется реакция (0б-есть рефлексы; 1б-есть только один из рефлексов; 2б-нет рефлексов).

5. Реакция на звук – производится хлопок над головой крысы, регистрируется реакция (0б-есть реакция; 1б-нет реакции).

У здоровых интактных животных результат теста составляет 0 баллов. Чем больше полученное количество баллов, тем сильнее выражен неврологический дефицит.

Шкала Гарсиа была использована для оценки спонтанной активности и сенсомоторного дефицита крыс.

1. Спонтанная активность - наблюдение проводили в клетке, не вынимая животное из нее. Регистрировали количество стенок, до которых крыса дотрагивалась в течение 5 мин. наблюдений (оценка: 0б-нет активности; 1б-двигается с трудом; 2б-касается 2 стенок клетки; 3б-касается 3 стенок клетки).

2. Симметричность движений – оценивают симметричность движений левой и правой конечностей на горизонтальной поверхности (0б-одна сторона полностью неподвижна; 1б-затруднено движение с одной стороны; 2б-одна сторона движется замедленно; 3б-обе стороны движутся симметрично).

3. Симметричность предплечий – оценивают симметричность движений правых и левых лап, держа крысу подвешенной за основание хвоста (оценка: 0б-с одной стороны движение отсутствует; 1б-слабая попытка вытянуть конечность; 2б-с одной стороны конечность вытягивается хуже, чем с другой; 3б-конечности вытягиваются симметрично).

4. Вис на решетке – животное помещают на вертикально расположенную решетку и оценивают характер вися (оценка: 0б-не цепляется за решетку, вис отсутствует; 1б-висит неподвижно на месте; 2б-карабкается вверх, но заваливается на одну сторону; 3б-забирается наверх решетки нормально).

5. Реакция на прикосновение к бокам – ушной палочкой осторожно прикасались к боковой поверхности тела крысы слева и справа поочередно и оценивали степень реакции (оценка: 0б-с обеих сторон реакция отсутствует; 1б-нет реакции на поврежденной стороне; 2б-слабая реакция на пораженной стороне; 3б-симметричный ответ с обеих сторон).

6. Реакция на прикосновение к вибриссам – ушной палочкой осторожно прикасались поочередно к вибриссам левой и правой сторон и оценивали реакцию (оценка: 0б-с обеих сторон реакция отсутствует; 1б-реакция отсутствует с одной стороны; 2б-с одной стороны реакция слабее, чем с другой; 3б-симметричная реакция с обеих сторон).

У здорового интактного животного сумма всех баллов должна составлять 18; чем меньше это число, тем более выражен неврологический дефицит.

Для оценки степени неглекта (расстройства восприятия пространства) и пареза взора использовали угловой тест. Животное помещали в квадратную камеру с прямыми углами и светлыми стенками высотой 50 см. Крысу располагали так, чтобы голова ее находилась в углу между стенками, а продольная ось тела условно делила угол камеры пополам. При попытке повернуть голову, фиксировали направление поворота. Ожидается, что у здорового интактного животного соотношение поворотов «влево-вправо» составляет 1:1 (т.е., коэффициент «повороты влево : повороты вправо» будет равен в норме 1). Считали число поворотов в каждую из сторон в 10 повторах.

Для оценки когнитивного дефицита использовали тест в Т-образном лабиринте (далее – Т-лабиринт). Т-лабиринт представляет собой Т-образную установку с открытым верхом из черного светонепроницаемого пластика шириной 10 см со стенками высотой 20 см. Длина коротких рукавов – по 30 см, длинного – 50 см. Тест начинается с этапа «Обучение». Животное помещают в начало длинного рукава. Когда крыса поворачивает в один из коротких Т-рукавов, его закрывают перегородкой из черного светонепроницаемого пластика на 30 сек. Затем переходят к этапу «Опыт». Крысу снова помещают в начало длинного рукава

и засекают время. Ожидается, что животное свернет в другой короткий T-рукав, в котором ее не запирали. Считают время, потраченное на прохождение лабиринта, процент правильных решений и ошибок в трех повторах этапа «Опыт». Данные регистрировали до операции и на 7 сутки после эксперимента.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2007 и MedCalc 14.1 (США). Исследуемые признаки не подчинялись нормальному распределению, поэтому при описании данных в качестве меры центральной тенденции определяли медиану (Me), в качестве меры рассеяния — интерквартильный размах — значение 25 и 75 квартиля. Данные представлены в виде Me (LQ, UQ), где LQ — нижний квартиль, UQ — верхний квартиль. Для сравнения температурных данных до и после введения синтетического аналога тиронамина использовали W-критерий Уилкоксона для связанных выборок.

2.3. Общая характеристика методов мета-анализа генетических корреляций

Для оценки влияния компонентов тиреоидной системы на риск развития и тяжесть цереброваскулярной патологии был использован новый метод в медицинских исследованиях — менделевская рандомизация. В MR-исследованиях генетические варианты используются для того, чтобы обнаружить, согласуется ли наблюдаемая ассоциация между фактором риска и исходом с причинным эффектом (показателем силы взаимосвязи между генетическими вариантами и фенотипической изменчивостью). Поскольку эти генетические варианты, как правило, не связаны с искажающими факторами, различия в исходе заболевания между носителями этого варианта и теми, у кого его нет, можно отнести к разнице во влиянии самого фактора риска [403; 435].

Для проведения анализа использовались среда разработки RStudio и пакеты TwoSampleMR [371], MRInstruments, MendelianRandomization. Составление дизайна исследования, выбор инструментальных переменных (генетических

вариаций), методов MR-анализа, определение чувствительности и воздействия горизонтальной плеiotропии проведены с использованием стандартных методов [114; 170; 269; 335]. Для исключения «слабых» переменных проводился расчет F-статистики. Из исследования исключались инструментальные переменные, находящиеся в неравновесном сцеплении ($R^2 > 0,1$). Для проведения менделевской рандомизации был обеспечен доступ к генетическим базам данных OpenGWAS (через разработанный в Бристольском Университете портал <https://gwas.mrcieu.ac.uk/>), HugeAmp (Общий портал знаний о метаболических заболеваниях, <https://hugeamp.org/>), MrBase, NHGRI-EBI (Национальный Институт исследования генома, <https://www.ebi.ac.uk/gwas/>), порталу «Gene expression omnibus» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

ГЛАВА 3. КЛИНИКО-НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОСТРОГО ПЕРИОДА ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА У ИССЛЕДУЕМОГО КОНТИНГЕНТА ПАЦИЕНТОВ

3.1. Общие клинико-неврологические характеристики исследуемого контингента пациентов

С целью изучения влияния гормонов тиреоидного профиля на клинические особенности и течение ишемического инсульта, а также на функциональный исход ИИ было выполнено исследование выраженности клинических проявлений, неврологических нарушений, проведена оценка взаимосвязи показателей тиреоидного профиля с анамнестическими и клиническими данными, острофазовыми и другими маркерами. Клиническая характеристика пациентов представлена в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Общие клинико-анамнестические характеристики исследуемого контингента пациентов

Клинические характеристики	N = 158 ¹
Возраст (годы)	73 (67, 80)
Пол	
Мужской	104 (66%)
Женский	54 (34%)
Систолическое АД при поступлении (mmHg)	140 (130, 160)
Систолическое АД при поступлении (mmHg)	80 (80, 90)
Прием антиагрегантов до развития инсульта	18 (11%)
Сосудистый бассейн	
Левая ВСА	48 (43%)
Правая ВСА	52 (33%)

Продолжение таблицы 3.1

Основная артерия	36 (23%)
Несколько бассейнов	2 (1.3%)
Этиология инсульта (TOAST)	
Атеротромботический	108 (68%)
Кардиоэмболический	22 (14%)
Криптогенный	26 (16%)
Другой (гемореологический)	2 (1.3%)
Артериальная гипертензия	
II ст.	58 (37%)
III ст.	100 (63%)
Фибрилляция предсердий	44 (28%)
Курение	26 (16%)
Сахарный диабет	20 (13%)
ИБС: сердечная недостаточность, 2 класс NYHA и выше	42 (27%)
Инсульт в анамнезе	22 (14%)
Примечание. ¹ Для непрерывных показателей представлены медиана и межквартильный интервал; для пропорций – количество случаев и процент от общего числа наблюдений.	

При анализе факторов риска ишемического инсульта в исследуемой когорте пациентов преобладали артериальная гипертензия III ст., фибрилляция предсердий, ИБС. Подавляющее число пациентов переносили ишемический инсульт в каротидном бассейне, ведущим подтипом гетерогенного ишемического инсульта являлся атеротромботический. Относительно высокая доля криптогенного инсульта (16%) обусловлена тем, что значительное число пациентов имели 2 конкурирующих фактора риска, что затрудняло верификацию подтипа инсульта. Следует отметить, что во многих исследуемых популяциях частота криптогенного инсульта достигает 30-40% [112]. Обращает на себя внимание, что лишь 11% пациентов принимали антиагреганты до развития острого ишемического инсульта,

при этом 14% больных имели острые цереброваскулярные события в анамнезе. Также в исследуемой когорте пациентов отсутствовала ассоциация между перенесенным ранее инсультом и текущим приемом антиагрегантов ($\chi^2 = 0.06$, $p = 0,8$). Характеристики тяжести неврологического дефицита, когнитивных функций и функционального исхода инсульта представлены в таблице 3.2.

Таблице 3.2 – Показатели тяжести неврологического дефицита, когнитивных нарушений и функциональных исходов ишемического инсульта

Характеристика	N = 158 ¹
Скандинавская шкала тяжести инсульта (баллы)	39 (26, 50)
Шкала MMSE (баллы)	20 (12, 26)
Тяжесть инсульта по Скандинавской шкале	
Легкий	72 (46%)
Умеренный	48 (30%)
Тяжелый	38 (24%)
Модифицированная шкала Рэнкина, баллы	
0	4 (2.5%)
1	12 (7.6%)
2	26 (16%)
3	20 (13%)
4	39 (25%)
5	51 (32%)
6	6 (3.8%)
Исход инсульта по дихотомизированной конечной точке	
Благоприятный (0-2 балла по шкале mRs)	42 (27%)
Неблагоприятный (3-6 баллов по шкале mRs)	116 (73%)
Примечание. ¹ Для непрерывных показателей представлена медиана и межквартильный интервал; для пропорций – количество случаев и процент от общего числа наблюдений.	

В исследуемой когорте значительная доля пациентов (46%) имела «легкий» (43-58 баллов) неврологический дефицит согласно Скандинавской шкале по определению Stroke Unit Trialists' Collaboration [243]. Вместе с тем через 6 месяцев лишь 27% пациентов имели благоприятный функциональный исход по шкале mRS. Данная диссоциация объясняется тем, что при оценке прогностической значимости Скандинавской шкалы и ее валидации, диапазон 43-58 баллов соответствовал 0-3 баллам по модифицированной шкале Рэнкина, в то время как в большинстве исследований благоприятный исход инсульта соответствует 0-2 баллам по модифицированной шкале Рэнкина [193].

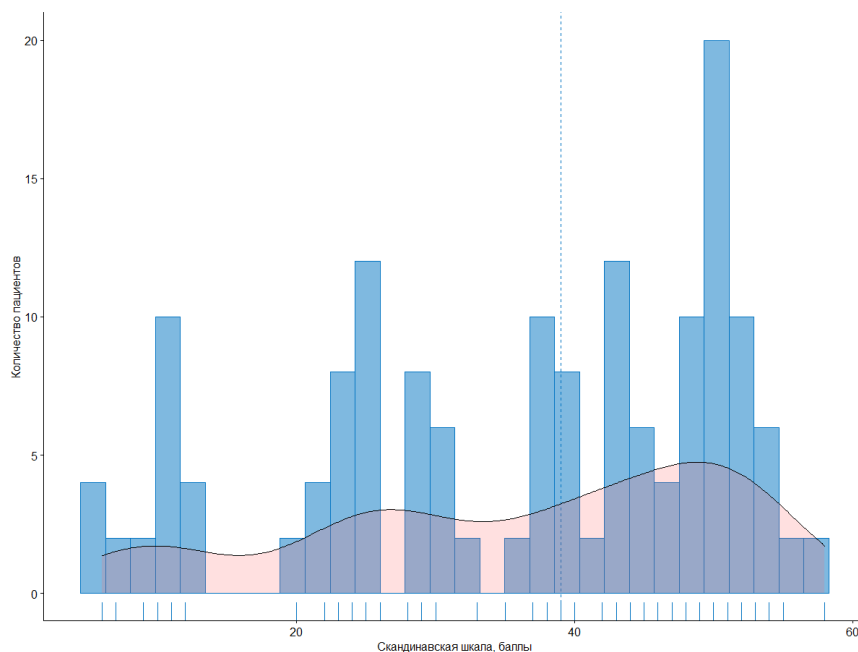


Рисунок 3.1 – Гистограмма тяжести неврологического дефицита по Скандинавской шкале

Все пациенты, включенные в исследуемую когорту, получали лечение согласно клиническому протоколу оказания медицинской помощи пациентам с острым ишемическим инсультом и транзиторной ишемической атакой, утверждённым Министерством здравоохранения Донецкой Народной республики. Вторичная профилактика проводилась согласно рекомендациям Американской ассоциации по борьбе с инсультом. Оценка функциональных исходов острого

ишемического инсульта по модифицированной шкале Рэнкина проводилась через 6 месяцев с момента его развития.

Через 6 месяцев с момента развития симптомов ишемического инсульта преобладающее число пациентов (73%) имели неблагоприятный функциональный исход согласно дихотомизированной конечной точке (3-6 баллов по шкале mRs). Аналогичные результаты отмечались и по данным порядковой конечной точки: функциональный исход в 32% случаев был представлен 5-ю баллами по шкале mRs, в 25% случаев – 4-мя баллами. Распределение пациентов согласно функциональным исходам по шкале mRs представлено на рисунке 3.2.

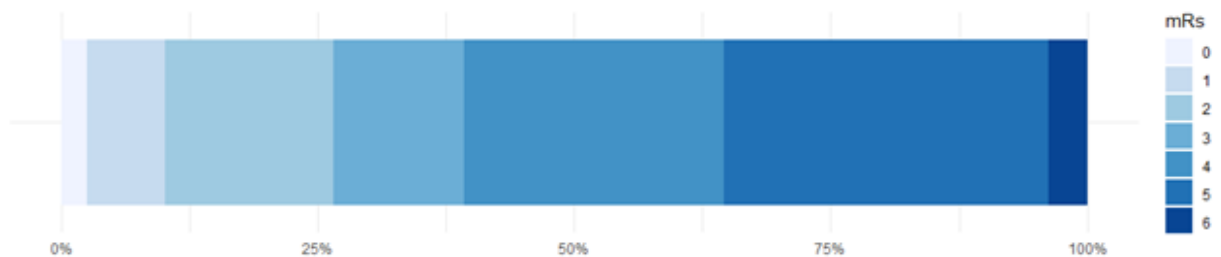


Рисунок 3.2 – Распределение пациентов согласно функциональным исходам по модифицированной шкале Рэнкина

Анализ распределений клинико-лабораторных характеристик в подгруппах согласно этиологии ишемического инсульта демонстрирует ряд статистически значимых различий (таблице 3.3). В частности, у пациентов с кардиоэмболическим инсультом чаще (в 82% случаев) встречалась фибрилляция предсердий, в этой группе отмечался более тяжелый неврологический дефицит (медиана по Скандинавской шкале 30 баллов по сравнению с 40 баллами у пациентов с атеротромботическим инсультом, и 46 баллами у пациентов с криптогенным инсультом, $p=0,005$). Кроме того, в этой же подгруппе наблюдались наименьшие значения баллов по шкале MMSE (медиана 16 баллов, Q1:Q3 0-23, $p = 0,0011$) и худшие функциональные исходы (у 91% пациентов показатели по шкале mRs находились в диапазоне 3-6 баллов).

Таблица 3.3 – Статистические характеристики пациентов в подгруппах соответственно подтипу ишемического инсульта

Показатель	Атеротромботический подтип, N = 108 ¹	Кардиоэмболический подтип, N = 22 ¹	Криптогенный подтип, N = 26 ¹	Другой (гемореологический) подтип, N = 2 ¹	p ²
Возраст, годы	74 (68, 80)	75 (67, 77)	65 (55, 73)	83 (83, 83)	0.016
Фибрилляция предсердий	16 (15%)	18 (82%)	10 (38%)	0 (0%)	<0.001
Скандинавская шкала, баллы	40 (26, 49)	30 (24, 42)	46 (28, 52)	14 (9, 17)	0.005
ТТГ, мкМЕ/мл	1.26 (0.86, 2.40)	1.36 (1.01, 1.96)	0.93 (0.59, 1.60)	1.16 (1.12, 1.18)	0.3
Св. Т4, пмоль/мл	16.15 (14.70, 17.50)	17.50 (16.55, 19.10)	15.80 (14.30, 16.50)	13.10 (13.10, 13.10)	<0.001
Св. Т3, пмоль/мл	4.78 (4.13, 5.50)	4.22 (3.35, 5.64)	4.50 (4.22, 4.82)	3.99 (3.99, 3.99)	0.2
С-реактивный белок, мг/мл	10 (5, 29)	25 (7, 40)	9 (4, 46)	23 (23, 23)	0.2
MMSE, баллы	20 (12, 26)	16 (0, 23)	25 (14, 28)	0 (0, 0)	0.011
Функциональный исход					0.021
благоприятный	28 (26%)	2 (9.1%)	12 (46%)	0 (0%)	
неблагоприятный	80 (74%)	20 (91%)	14 (54%)	2 (100%)	
Соотношение св. Т3 : св. Т4	0.30 (0.24, 0.34)	0.22 (0.21, 0.31)	0.28 (0.25, 0.32)	0.30 (0.30, 0.30)	0.2
Тяжесть инсульта					0.015
Легкий	52 (48%)	4 (18%)	16 (62%)	0 (0%)	
Умеренный	32 (30%)	10 (45%)	6 (23%)	0 (0%)	
Тяжелый	24 (22%)	8 (36%)	4 (15%)	2 (100%)	

Примечание: ¹Медиана (межквартильный интервал); n (%) ² Тест Краскалла-Уоллиса; Тест Фишера. Приведены факторы с уровнем статистической значимости межгрупповых различий p<0.2. Частоты встречаемости сахарного диабета, ИБС, артериальной гипертензии, курения, мужского или женского пола не имели статистически значимых межгрупповых различий.

При проведении сравнительного анализа клинико-лабораторных характеристик в подгруппах согласно этиологии ишемического инсульта не было выявлено статистически значимых различий в распределении таких факторов, как пол, наличие артериальной гипертензии, сахарного диабета, табакокурения, пораженный сосудистый бассейн. Также не обнаружены статистически значимые различия в медианах СРБ, св. Т4, ТТГ, соотношения св. Т3/св. Т4. Однако наличие кардиоэмболического инсульта было ассоциировано с более высокими уровнями св. Т4 (медиана 17.50 баллов, Q1:Q3 16.55 - 19.10; $p < 0,001$ для различий в медианах).

Для анализа возможных различий в распределении клинико-лабораторных характеристик ишемического инсульта в зависимости от наличия ранее перенесенных инсультов был проведен сравнительный анализ в соответствующих подгруппах. Результаты представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Клинико-anamнестические и лабораторные характеристики в подгруппах пациентов с впервые возникшим инсультом и с инсультами в анамнезе

Показатель	Пациенты с впервые возникшим инсультом, N = 136 ¹	Пациенты с инсультами в анамнезе, N = 22 ¹	p^2
Возраст	72 (67, 80)	76 (71, 78)	0.3
Сосудистый бассейн			
Левая ВСА	58 (43%)	10 (45%)	0.001
Правая ВСА	50 (37%)	2 (9.1%)	
Основная артерия	28 (21%)	8 (36%)	
Несколько бассейнов	0 (0%)	2 (9.1%)	
Фибрилляция предсердий	34 (25%)	10 (45%)	0.047
Сахарный диабет	34 (25%)	10 (45%)	0.7
ИБС: сердечная недостаточность, 2 класс NYHA и выше	36 (26%)	6 (27%)	>0.9

Продолжение таблицы 3.4

Скандинавская шкала, баллы	38 (26, 50)	40 (38, 44)	0.7
ТТГ, мкМЕ/мл	1.28 (0.86, 2.08)	1.10 (0.67, 2.28)	0.3
Св. Т4, пмоль/л	16.10 (14.65, 17.50)	17.20 (15.25, 17.50)	0.2
Св. Т3, пмоль/л	4.59 (3.84, 5.36)	4.61 (3.67, 5.70)	>0.9
СРБ, мг/л	12 (5, 31)	9 (6, 16)	>0.9
MMSE, баллы	20 (12, 26)	21 (19, 26)	0.8
Функциональный исход инсульта			
Благоприятный (0-2 балла mRs)	38 (28%)	4 (18%)	0.3
Неблагоприятный (3-6 баллов mRs)	98 (72%)	18 (82%)	
Примечание: ¹ Медиана (межквартильный интервал); n (%), ² Тест Краскела-Уоллиса; Тест Фишера			

В ходе сравнительного анализа установлено, что распределение таких базисных факторов риска, как возраст, сахарный диабет, ИБС, табакокурение не имело существенных различий у пациентов с впервые возникшим инсультом и ранее перенесенными инсультами в анамнезе. Тем не менее, имелись статистически значимые различия в распределении по пораженному сосудистому бассейну, также у пациентов с ранее перенесенным инсультом чаще (в 45% случаев) фиксировалась фибрилляция предсердий, что свидетельствует о ее значимой роли в возникновении повторных церебральных эмболий [15]. В ходе дисперсионного анализа не было обнаружено влияния факта ранее перенесенного инсульта на распределение таких показателей, как тяжесть инсульта, когнитивный дефицит по шкале MMSE, функциональные исходы инсульта, уровни ТТГ, св. Т4., св. Т3, С-реактивного белка.

Таким образом, в ходе анализа анамнестических, клинических и лабораторных данных пациентов в исследуемой когорте, возможно сделать вывод о репрезентативности выборки в отношении ведущих подтипов ишемического инсульта, различных вариантов функционального исхода. Размеры выборки и характер распределения ведущих предикторов позволяют проводить анализ в

соответствующих подгруппах с достаточной статистической мощностью. Статистические характеристики имеющейся когорты пациентов позволяют выполнить поставленные в ходе исследования задачи.

3.2. Характеристики ишемического инсульта в зависимости от тиреоидного профиля (дисперсионный анализ)

Для оценки клинических особенностей острого периода ишемического инсульта в зависимости от наличия гипотиреоза или тиреотоксикоза пациенты были распределены на соответствующие подгруппы. Следует отметить, что пациенты, страдающие аутоиммунным тиреоидитом или получавшие до развития инсульта L-тироксин или тирозол не включались в исследование. Такой подход был использован для оценки независимого влияния тиреоидных гормонов на неврологические характеристики ишемического инсульта. Вместе с тем, выявленные изменения уровней ТТГ позволяют классифицировать часть пациентов как субклинически гипо- и гипертиреоидных. В качестве критериев субклинического лабораторного гипотиреоза и гипертиреоза использовались уровни ТТГ 4.2 мкМЕ/мл и менее 0.1 мкМЕ/мл соответственно. Результаты представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Клинико-неврологические характеристики пациентов в зависимости от субклинического гипо- и гипертиреоза

Характеристика	Эутиреоз, N = 130 ¹	Субклинический гипертиреоз, N = 13 ¹	Субклинический гипотиреоз, N = 15 ¹	p ²
Возраст, годы	72 (67, 80)	60 (53, 71)	76 (74, 77)	0.094
Пол				0.043
Мужской	80 (62%)	8 (60%)	11 (73%)	
Женский	50 (38%)	5 (40%)	4 (27%)	
Прием АСК	16 (12%)	0 (0%)	0 (0%)	0.6

Сосудистый бассейн				0.2
Левая ВСА	58 (45%)	7 (54%)	4 (27%)	
Правая ВСА	36 (28%)	6 (46%)	8 (53%)	
Основная артерия	34 (26%)	0 (0%)	3 (20%)	
Несколько бассейнов	2 (1.5%)	0 (0%)	0 (0%)	
Этиология инсульта (TOAST)				0.3
Атеро-тромботический	84 (65%)	8 (54%)	15 (100%)	
Кардио-эмболический	22 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	
Криптогенный	22 (17%)	5 (47%)	0 (0%)	
Другой	2 (1.5%)	0 (0%)	0 (0%)	
Артериальная гипертензия				0.9
II ст.	50 (38%)	4 (30%)	4 (27%)	
III ст.	80 (62%)	9 (70%)	11 (73%)	
Фибрилляция предсердий	36 (28%)	8 (62%)	3 (20%)	0.3
Курение	24 (18%)	0 (0%)	2 (13%)	0.5
Сахарный диабет	18 (14%)	0 (0%)	0 (0%)	0.4
ИБС	34 (26%)	4 (31%)	7 (47%)	0.1
Инсульт в анамнезе	18 (14%)	4 (31%)	3 (20%)	0.4
Скандинавская шкала (баллы)	39 (26, 50)	48 (38, 52)	38 (37, 48)	0.3
ТТГ, мкМЕ/мл	1.23 (0.87, 1.78)	0.21 (0.18, 0.23)	4.79 (4.74, 6.46)	<0.001
Св. Т4, пмоль/мл	16.30 (14.50, 17.50)	15.65 (15.07, 16.23)	16.30 (15.6, 17.5)	0.6
Св. Т3, пмоль/мл	4.61 (3.94, 5.32)	3.68 (2.65, 4.96)	5.21 (3.66, 5.35)	0.4
СРБ, мг/л	9 (5, 31)	9 (4, 20)	16 (14, 16)	0.8
MMSE (баллы)	20 (12, 26)	24 (19, 29)	22 (19, 26)	0.13
Функциональный исход				>0.9
Благоприятный	36 (28%)	2 (25%)	2 (20%)	
Неблагоприятный	94 (72%)	6 (75%)	8 (80%)	
Соотношение св. Т3 : св. Т4	0.30 (0.24, 0.34)	0.23 (0.18, 0.30)	0.32 (0.22, 0.33)	0.4

Тяжесть инсульта				0.057
Легкий	56 (43%)	7 (54%)	7 (47%)	
Умеренный	42 (32%)	2 (15%)	9 (53%)	
Тяжелый	32 (25%)	4 (31%)	0 (0%)	
Примечание: ¹ Медиана (межквартильный интервал); n (%), ² Тест Краскалла-Уоллиса; Тест Фишера.				

Согласно данным дисперсионного анализа статистических различий между группами пациентов с эутиреозом, субклиническими гипо- и гипертиреозом не выявлено. Обращает на себя внимание также отсутствие статистических различий между уровнями св. Т3, св. Т4 и соотношением св.Т3 : ст.Т4 в исследуемых группах, что может свидетельствовать об изменении регуляции в системе таламус-щитовидная железа в острую фазу ишемического инсульта в рамках адаптации или дезадаптации.

В ходе исследования был проведен дисперсионный анализ клиничко-неврологических различий в исследуемой когорте пациентом с острым ишемическим инсультом в зависимости от уровня св. Т3 выше или ниже референтного интервала (3,7-6,9 пмоль/л). Результаты представлены в таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Клиничко-неврологические характеристики пациентов в зависимости от уровня свободного трийодтиронина (по отношению к референтному интервалу)

Характеристика	Св. Т3 выше РИ, N = 10 ¹	Св. Т3 ниже РИ, N = 42 ¹	Св. Т3 в пределах РИ, N = 102 ¹	p ²
Возраст, годы	77 (68, 82)	73 (67, 80)	72 (66, 77)	0.4
Пол				0.016
Мужской	6 (60%)	20 (48%)	74 (73%)	
Женский	4 (40%)	22 (52%)	28 (27%)	
Прием АСК	0 (0%)	4 (9.5%)	14 (14%)	0.5
Сосудистый бассейн				0.9
Левая ВСА	4 (40%)	18 (43%)	44 (43%)	
Правая ВСА	4 (40%)	16 (38%)	30 (29%)	

Продолжение таблицы 3.6

Основная артерия	2 (20%)	8 (19%)	26 (25%)	0.9
Несколько бассейнов	0 (0%)	0 (0%)	2 (2.0%)	
Этиология инсульта (TOAST)				0.10
Атеро-тромботический	8 (80%)	26 (62%)	72 (71%)	
Кардиоэмболический	2 (20%)	10 (24%)	8 (7.8%)	
Криптогенный	0 (0%)	6 (14%)	20 (20%)	
Другой	0 (0%)	0 (0%)	2 (2.0%)	
Артериальная гипертензия	4 (40%)	20 (48%)	34 (33%)	
II ст.	6 (60%)	22 (52%)	68 (67%)	0.3
III ст.				
Фибрилляция предсердий	4 (40%)	12 (29%)	26 (25%)	0.6
Курение	2 (20%)	4 (9.5%)	18 (18%)	0.5
Сахарный диабет	2 (20%)	2 (4.8%)	14 (14%)	0.2
ИБС	4 (40%)	14 (33%)	24 (24%)	0.3
Инсульт в анамнезе	2 (20%)	8 (19%)	12 (12%)	0.4
Скандинавская шкала (баллы)	48 (43, 50)	30 (24, 40)	43 (26, 51)	0.012
ТТГ, мкМЕ/мл	1.14 (0.86, 1.63)	1.19 (0.83, 2.37)	1.21 (0.84, 1.87)	>0.9
Св. Т4, пмоль/мл	17.20 (16.50, 18.30)	16.50 (15.20, 17.50)	16.1 (14.5, 17.2)	0.2
СРБ, мг/л	5 (5, 9)	15 (6, 29)	11 (5, 33)	0.14
MMSE (баллы)	21 (15, 26)	14 (9, 19)	23 (14, 26)	0.022
Функциональный исход				0.008
Благоприятный	4 (40%)	4 (9.5%)	32 (31%)	
Неблагоприятный	6 (60%)	38 (90%)	70 (69%)	
Соотношение св. Т3 : св. Т4	0.41 (0.38, 0.41)	0.18 (0.14, 0.21)	0.30 (0.28, 0.34)	<0.001
Тяжесть инсульта				<0.001
Легкий	8 (80%)	8 (19%)	54 (53%)	
Умеренный	0 (0%)	20 (48%)	26 (25%)	
Тяжелый	2 (20%)	14 (33%)	22 (22%)	

Уровень ТТГ				0.5
В пределах РИ	8 (100%)	32 (80%)	86 (90%)	
Ниже 0.1 мкМЕ/мл	0 (0%)	4 (10%)	4 (4.2%)	
Выше РИ	0 (0%)	4 (10%)	6 (6.2%)	
Примечание: ¹ Медиана (межквартильный интервал); n (%), ² Тест Краскалла-Уоллиса; Тест Фишера, РИ – референтный интервал				

В ходе дисперсионного анализа были выявлены статистически значимые различия по целому ряду показателей. Пациенты с уровнем св. Т3 выше референтного интервала переносили менее тяжелый неврологический дефицит (медиана по шкале SSS 48 [43, 50] баллов против 43 [26, 51] баллов у пациентов с уровнем св. Т3 в пределах референтного интервала и 30 [24, 40] баллов у пациентов с низким уровнем св. Т3). Также отмечались существенные различия по шкале MMSE: пациенты с уровнем св. Т3 ниже референтного интервала имели более низкие баллы (14 [9, 19]) по сравнению с остальными подгруппами, что отражает влияние гипотиреоза на выраженность постинсультных когнитивных нарушений [1]. У пациентов с уровнем св. Т3 выше референтного интервала чаще отмечался благоприятный функциональный исход инсульта (40% случаев), при этом больные с низким уровнем св. Т3 имели неблагоприятный функциональный исход инсульта в 90% случаев (n=34).

Выполненный дисперсионный анализ подтвердил необходимость дальнейшего изучения влияния уровня св. Т3 на клиничко-неврологические характеристики инсульта, в том числе в регрессионных моделях. Учитывая данные о нарушении гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси при ишемическом инсульте [392], в дальнейших этапах анализа пациенты были разделены на три группы соответственно квартилям уровней св. Т3: 1-й квартиль, 2-3-й квартили, 4-й квартиль. Подобный подход обусловлен гипотезой, заключающейся в возможном адаптивном повышении св. Т3 в острую стадию заболеваний сердечно-сосудистых заболеваний, при этом существующие референтные интервалы св. Т3, полученные у здоровых людей, могут быть не валидными [216; 221]. Результаты анализа представлены в таблице 3.7.

Таблица 3.7 – Клинико-неврологические характеристики пациентов в зависимости от квартилей уровня свободного трийодтиронина

Характеристика	Уровень св. Т3 в Q1, N = 36 ¹	Уровень св. Т3 в Q2-3, N = 78 ¹	Уровень св. Т3 в Q4, N = 40 ¹	p ²
Возраст, годы	75 (66, 83)	72 (67, 77)	71 (67, 80)	0.5
Пол				0.011
Мужской	16 (44%)	54 (69%)	30 (75%)	
Женский	20 (56%)	24 (31%)	10 (25%)	
Прием АСК	4 (11%)	10 (13%)	4 (10%)	>0.9
Этиология инсульта (TOAST)				0.046
Атеротромботический	22 (61%)	50 (64%)	34 (85%)	
Кардиоэмболический	8 (22%)	8 (10%)	4 (10%)	
Криптогенный	6 (17%)	18 (23%)	2 (5.0%)	
Другой	0 (0%)	2 (2.6%)	0 (0%)	
Артериальная гипертензия				0.2
II ст.	18 (50%)	26 (33%)	14 (35%)	
III ст.	18 (50%)	52 (67%)	26 (65%)	
Фибрилляция предсердий	8 (22%)	20 (26%)	14 (35%)	0.4
Курение	2 (5.6%)	16 (21%)	6 (15%)	0.12
Сахарный диабет	2 (5.6%)	12 (15%)	4 (10%)	0.3
ИБС	14 (39%)	14 (18%)	14 (35%)	0.029
Инсульт в анамнезе	4 (11%)	12 (15%)	6 (15%)	0.8
Скандинавская шкала (баллы)	29 (24, 42)	37 (24, 51)	44 (40, 50)	0.007
ТТГ, мкМЕ/мл	1.10 (0.81, 2.14)	1.11 (0.76, 1.61)	1.42 (0.91, 2.24)	0.2
Св. Т4, пмоль/мл	16.30 (14.8, 17.5)	16.10 (14.55, 17.08)	17.1 (15.68, 18.08)	0.14
Св. Т3, пмоль/мл	2.80 (2.21, 3.3)	4.58 (4.4, 4.84)	5.86 (5.53, 6.58)	<0.001

Продолжение таблицы 3.7

СРБ, мг/л	16 (6, 31)	10 (5, 33)	9 (4, 23)	0.2
MMSE (баллы)	13 (8, 19)	19 (12, 26)	25 (21, 28)	<0.001
Функциональный исход				0.005
Благоприятный	2 (5.6%)	24 (31%)	14 (35%)	
Неблагоприятный	34 (94%)	54 (69%)	26 (65%)	
Соотношение св. Т3 : св. Т4	0.17 (0.13, 0.21)	0.30 (0.27, 0.32)	0.36 (0.32, 0.41)	<0.001
Тяжесть инсульта				<0.001
Легкий	8 (22%)	34 (44%)	28 (70%)	
Умеренный	16 (44%)	22 (28%)	8 (20%)	
Тяжелый	12 (33%)	22 (28%)	4 (10%)	
Летальный исход	2 (5.6%)	2 (2.6%)	2 (5.0%)	0.6
Примечание: ¹ Медиана (межквартильный интервал); n (%), ² Тест Краскала-Уоллиса; Тест Фишера.				

По данным дисперсионного анализа пациенты с уровнем св. Т3 в IV квартиле имели менее выраженный неврологический дефицит в острейший период инсульта (медиана по шкале SSS на 7 баллов больше по сравнению с пациентами с уровнем св. Т3 во II-III квартилях, и на 15 баллов – по сравнению с пациентами с уровнем св. Т3 во I квартиле). Большинство пациентов (70%) с уровнем св. Т3 в IV квартиле переносили легкий неврологический дефицит по сравнению с 44% пациентов – во II-III квартилях, и 22% – в первом квартиле ($p < 0,001$). Аналогичные ассоциации отмечались и по показателям постинсультного дефицита: 35% пациентов с уровнем св. Т3 в IV квартиле имели благоприятный исход инсульта по сравнению с 5,6% пациентов с уровнем св. Т3 в I квартиле ($p = 0,005$). Степень когнитивных нарушений также была менее выражена у пациентов с уровнем св. Т3 в IV квартиле (медиана MMSE выше на 6 баллов по сравнению с пациентами с уровнем св. Т3 во II-III квартилях, и на 12 баллов – по сравнению с первым квартилем, $p < 0,001$).

Таким образом, дисперсионный анализ позволят выделить уровень свободного трийодтиронина как наиболее значимый фактор из маркеров тиреоидного профиля, влияющих на основные характеристики ишемического инсульта.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ТИРЕИОДНЫХ ГОРМОНОВ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ, ТЯЖЕСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ИСХОД ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА.
РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Неврологические и инструментальные характеристики пациентов с острым ишемическим инсультом в зависимости от уровня свободного трийодтиронина

В ходе предыдущих этапов исследования была определена роль трийодтиронина, как фактора влияющего на клинико-неврологические характеристики инсульта. С учетом выявленных ассоциаций был проведен анализ основных неврологических и инструментальных характеристик в остром периоде ишемического инсульта в зависимости от квартилей уровня св. Т3.

Клинические проявления ишемического инсульта у обследуемых больных в основном были представлены умеренным и выраженным гемипарезом, речевыми нарушениями, сенсорными расстройствами по гемитипу. Основные клинические синдромы у обследуемых больных указаны в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Характеристика клинических синдромом у пациентов с острым ишемическим инсультов в зависимости от квартилей уровня трийодтиронина

Клинический синдром	Группы						коэффициент значимости различий
	Уровень св. Т3 в Q1, N = 36 ¹		Уровень св. Т3 в Q2-3, N = 78 ¹		Уровень св. Т3 в Q4, N = 40 ¹		
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
Гемипарез	34	94	59	76	25	60	0,041
- легкий	6	17	13	17	13	33	
- умеренный	10	28	23	29	8	20	
- выраженный	11	31	15	19	0	0	
- глубокий	4	11	5	6	1	3	
- гемиплегия	3	8	3	5	1	3	
Афазия	27	75	18	23	7	18	0,024
- моторная	21	28	9	12	7	18	
- тотальная	5	14	4	5	0	0	
-корковая дизартрия	1	3	5	7	0	0	

Продолжение таблицы 4.1

Атаксия	8	22	24	31	6	15	0,2
Альтернирующие синдромы	6	17	17	22	6	15	0,65
Гемигипестезия	32	89	46	59	28	70	0,17
Общемозговая симптоматика	14	38	16	20	2	5	<0.01

Как видно из вышеприведенной таблицы, распределение некоторых неврологических характеристик различалось в группах в зависимости от уровня св. ТЗ. Так, пациенты с уровнем св. ТЗ в IV квартиле реже переносили общемозговую симптоматику, чаще имели неврологический дефицит в виде легкого или умеренного гемипареза, сенсорных расстройств. В группе пациентов с уровнем св. ТЗ в первом квартиле чаще (38%) встречалась общемозговая симптоматика, представленная изменением уровня сознания (от оглушения до сопора), менингеальным синдромом, психомоторным возбуждением. Альтернирующие синдромы в основном были представлены поражением глазодвигательного, лицевого и подъязычного (в сочетании с лицевым) нервов, статистически значимых межгрупповых различий не было выявлено.

Речевые расстройства были представлены, в основном, моторной афазией. В группе пациентов с уровнем св. ТЗ в IV квартиле афазия встречалась реже (18% против 23% в группе с уровнем св. ТЗ во II-III квартиле, и 75% в группе с уровнем св. ТЗ в I квартиле, $p=0,024$). В группе с низким уровнем св. ТЗ речевые расстройства сочетались с выраженным гемипарезом и общемозговой симптоматикой.

Наличие у пациентов ишемического инсульта было подтверждено как клинически, так и с применением магниторезонансной томографии головного мозга. При этом фиксировались локализация очагов, их размер, а также бассейн, в котором произошло острое нарушение мозгового кровообращения. Данные о локализации очагов представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 – Локализация ишемических очагов в зависимости от квартилей уровня свободного трийодтиронина

Локализация очагов	Группы						Коэффициент значимости различий
	Уровень св. Т3 в Q1, N = 36 ¹		Уровень св. Т3 в Q2-3, N = 78 ¹		Уровень св. Т3 в Q4, N = 40 ¹		
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
Корковые	5	14	11	14	9	22	0.3
Субкортикальные	12	33	28	36	21	53	
Корково-субкортикальные	17	47	39	50	10	25	
Множественные	2	6	0	0	0	0	

Как видно из таблицы 4.2, в группах пациентов с уровнями св. Т3 в I и II-III превалировала корково-субкортикальная локализация очагов, в группе пациентов с уровнем св. Т3 в IV квартиле чаще встречались субкортикальные очаги. Вместе с тем, статистически значимых изменений в распределении локализации очагов в исследуемых группах выявлено не было.

Размеры ишемических очагов в исследуемых группах оценивались согласно рекомендациям Научного центра неврологии (г. Москва). Очаги инфаркта, распространявшиеся на весь бассейн артерий каротидной системы, классифицировали как обширные; инфаркты, распространяющиеся на весь бассейн одной из церебральных артерий или несколько церебральных артерий, как большие (50 мм); инфаркты, локализующиеся в пределах бассейна отдельных ветвей этих артерий (20-50 мм) как средние; инфаркты в пределах 15-20 мм как малого размера.

Таблица 4.3 – Размеры ишемических очагов в зависимости от квартилей уровня свободного трийодтиронина

Размеры ишемических очагов	Группы						Коэффициент значимости различий
	Уровень св. Т3 в Q1, N = 36 ¹		Уровень св. Т3 в Q2-3, N = 78 ¹		Уровень св. Т3 в Q4, N = 40 ¹		
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
Малый	7	19	15	19	14	35	0.036
Средний	13	36	36	46	19	47	
Большой	14	39	27	35	7	18	
Обширный	2	6	0	0	0	0	

У пациентов с уровнем св. Т3 в I и II-III квартилях преобладали большие и средние очаги. В группе с низким уровнем св. Т3 находились 2 пациента с обширными инфарктами мозга – оба случая представлены гемодинамическим инсультом вследствие острой левожелудочковой недостаточности на фоне каротидного стеноза, с формированием нескольких очагов, занимающих практически весь бассейн СМА. В группе пациентов с уровнем св. Т3 в IV квартиле большие очаги встречаются существенно реже (18% против 25% в группе с уровнем св. Т3 в II-III квартилях, и 39% в группе с низким уровнем Т3), также чаще фиксировались малые очаги. Характер распределения размеров очагов в исследуемых группах статистически значимо различался ($p=0.036$).

4.2. Выбор ведущих показателей тиреоидного статуса и других факторов, влияющих на тяжесть и функциональный исход ишемического инсульта (корреляционный и унивариантный анализ)

Первый этап идентификации наиболее значимых лабораторных биомаркеров тиреоидного статуса представлен корреляционным анализом и построением

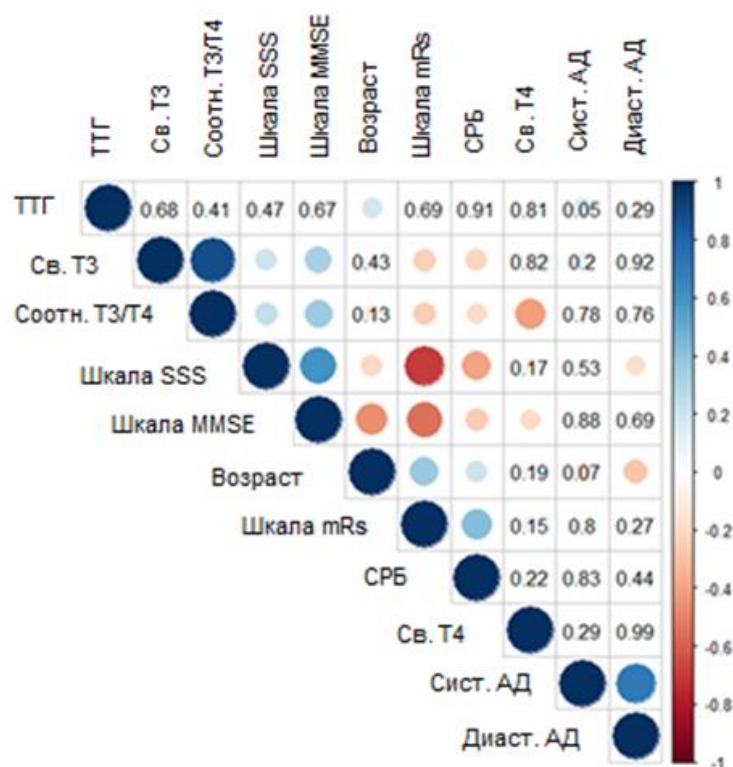
корреляционной матрицы. В анализ были включены предикторы, представленные непрерывными показателями, такими как, возраст, систолическое АД при поступлении, диастолическое АД при поступлении, уровень ТТГ, св. Т3, св. Т4, соотношение св. Т3/св. Т4, а также суммой баллов по шкале MMSE и Скандинавской шкале. Результаты корреляционного анализа представлены в таблице 4.4 и на рисунке 4.1.

Таблица 4.4 – Корреляционная матрица тиреоидных гормонов и клиничко-лабораторных предикторов тяжести неврологического дефицита

	Возраст, годы	Сист. АД, мм рт.ст.	Диаст. АД, мм рт.ст.	Шкала SSS, баллы	ТТГ, мкМЕ/мл	Св. Т3, пмоль/л	Св. Т4, пмоль/л	СРБ, мг/л	MMSE	Соотн. Св. Т3/св. Т4.
Возраст, годы	1
Сист. АД, мм рт.ст.	-0.03	1
Диаст. АД, мм рт.ст.	-0.19	.68	1
Шкала SSS, баллы	-0.11	.04	-0.15	1
ТТГ, мкМЕ/мл	.26	.04	-0.24	.03	1
Св. Т3, пмоль/л	.09	-0.01	-0.18	.44	.01	1
Св. Т4, пмоль/л	.14	-0.04	-0.04	-0.23	.00	-0.07	1	.	.	.
СРБ, мг/л	.26	.13	.11	-0.39	.09	-0.29	-0.21	1	.	.
MMSE	-0.37	.06	.01	.76	.01	.39	-0.18	-0.50	1	.
Соотн. Св. Т3/св. Т4.	.00	-0.06	-0.17	.47	.06	.85	-0.52	-0.16	.40	1

В ходе корреляционного анализа выявлена связь между целым рядом показателей, включая умеренную положительную корреляцию между уровнем св. Т3 и суммой баллов по Скандинавской шкале ($r=0,44$), отрицательную умеренную корреляцию между уровнем св. Т4 и суммой баллов по Скандинавской шкале ($r=-$

0,23), умеренную положительную корреляцию между соотношением св. Т3/св. Т4 и суммой баллов по шкале MMSE ($r=0,4$), умеренную положительную корреляцию между уровнем св. Т3 и суммой баллов по шкале MMSE ($r=0,39$) и рядом других показателей.



Примечание: шкала отражает силу и направление корреляционной связи, размер овала – показатель статистической значимости. Для статистически незначимых ассоциаций указан коэффициент r .

Рисунок 4.1 – Корреляционная матрица клинико-неврологических и лабораторных показателей пациентов с ИИ

Результаты корреляционного анализа демонстрируют, что уровень св. Т3 был ассоциирован с более высокими баллами по Скандинавской шкале, т.е. с менее тяжелым неврологическим дефицитом в острый период инсульта, а также с более высокими показателями по шкале MMSE. Для св. Т4 был характерен обратный эффект. Обращает на себя внимание отсутствие корреляционной связи между ТТГ и гормонами щитовидной железы. В течение последних десятилетий был проведен ряд исследований, изучавших корреляционные взаимоотношения между

гормонами гипофизарно-тиреоидной системы. Согласно классическим представлениям, между ТТГ и св. Т4 имеется логарифмическая зависимость [194]. Однако проведенные недавно исследования демонстрируют, что реакция ТТГ на отклонение значения св. Т4 при ряде состояний может быть не линейной, а непропорционально связанной со степенью отклонения от оптимального уровня, что выражается в отсутствии корреляции и согласуется с нашими данными [414]. Для подтверждения влияния тиреоидных гормонов на тяжесть неврологического дефицита был проведен унивариантный регрессионный анализ, результаты которого представлены в таблице 4.5.

Таблица 4.5 – Предикторы, влияющие на тяжесть неврологического дефицита в унивариантной регрессионной модели

Показатель	N	beta	95% ДИ ¹	p
Возраст, годы	158	-0.29	-0.50, -0.08	0.009
Женский пол	158	-4.3	-9.1, 0.52	0.083
Диастолическое АД, мм рт.ст.	150	-0.23	-0.43, -0.02	0.031
Курение	158	6.4	0.33, 13	0.040
ТТГ, мкМЕ/мл	148	0.52	-0.91, 2.0	0.5
Св. Т4, пмоль/л	158	-0.61	-1.5, 0.27	0.2
Св. Т3, пмоль/л	156	2.3	0.59, 4.0	0.009
СРБ, мг/л	152	-0.20	-0.27, -0.12	<0.001
Соотношение св. Т3/св. Т4	156	38	13, 63	0.003

Примечание: ¹ДИ - Доверительный интервал; N – количество наблюдений; beta – коэффициент регрессии; p – уровень статистической значимости. В качестве предикторов представлены только статистически значимые факторы риска, а также уровни тиреоидных гормонов и СРБ.

Согласно данным унивариантного регрессионного анализа из гормонов тиреоидной группы лишь св. Т3 статистически значимо влиял на тяжесть

ишемического инсульта в остром периоде, выраженную в виде суммы баллов по Скандинавской шкале. Вызывает интерес противоположно направленный эффект действия св. Т4, хотя данный показатель не достигал установленной статистической значимости. Регрессионное влияние св. Т3 и св. Т4 на тяжесть неврологического дефицита представлены на рисунках 4.2 и 4.3.

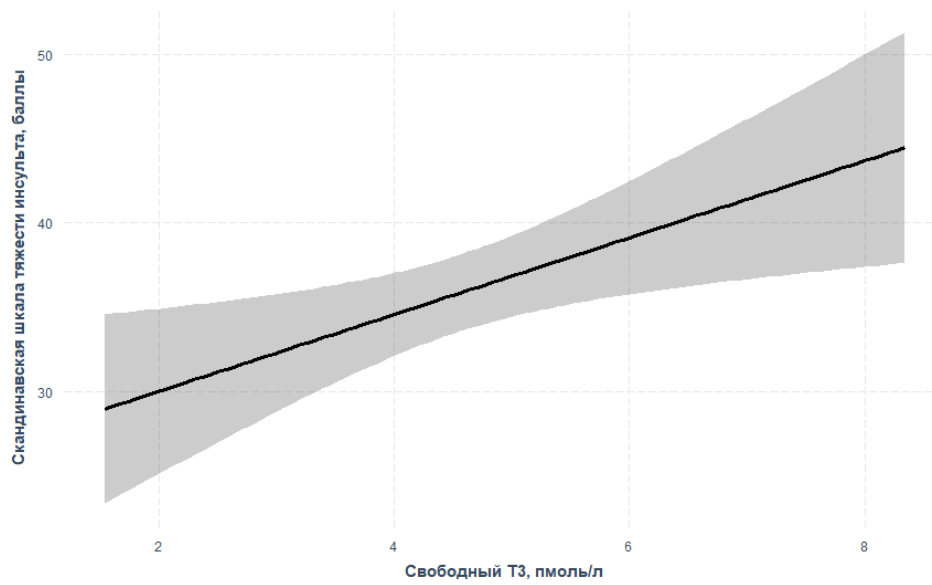


Рисунок 4.2 – Влияние уровня св. Т3 на тяжесть ишемического инсульта в унивариантной регрессионной модели

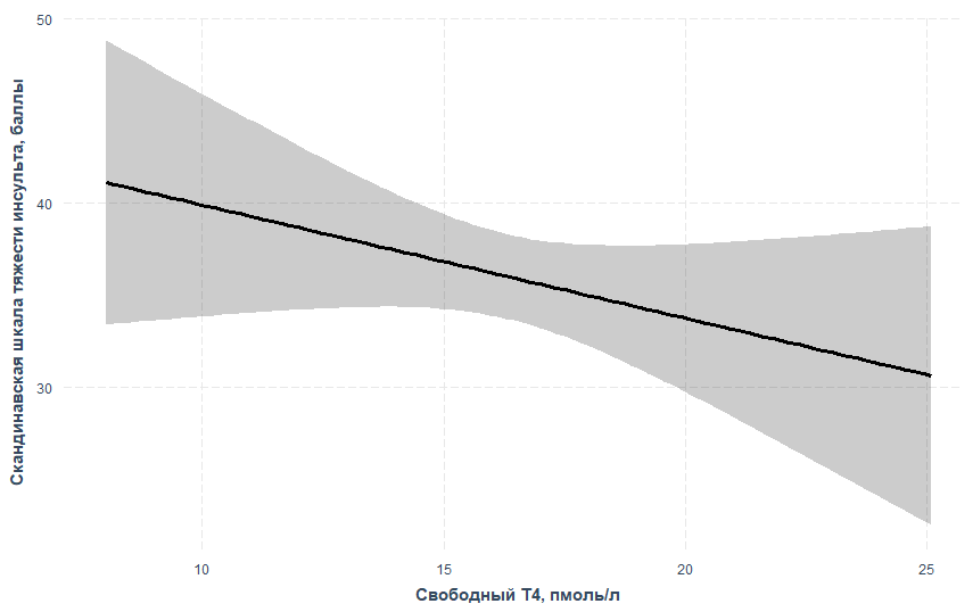


Рисунок 4.3 – Влияние уровня св. Т4 на тяжесть ишемического инсульта в унивариантной регрессионной модели

Важное значение имеют результаты теста Грэйнджера, которые демонстрируют, что уровень св. Т3 оказывает причинно-следственное влияние на уровень СРБ ($F = 7.767$, $p = 0.0001648$).

4.3. Влияние маркеров тиреоидного статуса на тяжесть неврологического дефицита в остром периоде ишемического инсульта в многофакторной модели

Для оценки независимого от действия других предикторов влияния свободного трийодтиронина на тяжесть неврологического дефицита в остром периоде инсульта был проведен мультивариантный регрессионный анализ, результаты которого представлены в таблице 4.6.

Таблица 4.6 – Результаты мультивариантного регрессионного анализа влияния клиничко-лабораторных предикторов на тяжесть ишемического инсульта

Предиктор	Beta	95% ДИ ¹	p
Возраст, годы	-0.03	-0.46, 0.39	0.9
Систолическое АД (mmHg)	0.23	-0.03, 0.49	0.086
Диастолическое АД (mmHg)	-0.43	-1.0, 0.09	0.10
Артериальная гипертензия	-2.0	-11, 7.2	0.7
Фибрилляция предсердий	2.3	-8.2, 13	0.7
Курение	5.7	-6.0, 17	0.3
Сахарный диабет	-1.9	-14, 10	0.8
ИБС: сердечная недостаточность, 2 класс NYHA и выше	6.1	-3.4, 16	0.2
ТТГ, мкМЕ/мл	-0.11	-2.6, 2.4	>0.9
Св. Т3, пмоль/л	3.7	-8.6, 16	0.5
Св. Т4, пмоль/л	-1.6	-4.7, 1.5	0.3
Соотношение св. Т3/св. Т4	-38	-231, 156	0.7
СРБ, мг/л	-0.24	-0.39, -0.09	0.003
Примечание: ¹ ДИ - Доверительный интервал; beta – коэффициент регрессии; p – уровень статистической значимости. Коэффициент $R^2=0.1$			

С учетом низкого коэффициента детерминации R^2 для повышения качества модели была проведена процедура подгонки модели путем оптимизации

количества включенных предикторов. Оптимизация модели осуществлялась с подсчетом информационного критерия Акайке (AIC), характеристики оптимизированной модели представлены в таблице 4.7.

Таблица 4.7 – Результаты мультивариантного регрессионного анализа влияния клинико-лабораторных предикторов на тяжесть ишемического инсульта (оптимизированная модель)

Предиктор	beta	95% ДИ ¹	p
Систолическое АД (mmHg)	0.25	-0.05, 0.56	0.10
Диастолическое АД (mmHg)	-0.33	-0.85, 0.19	0.2
Артериальная гипертензия	-6.3	-16, 3.5	0.2
Св. Т3, пмоль/л	3.03	0.15, 5.91	0.039
Св. Т4, пмоль/л	-1.1	-2.3, 0.05	0.060
СРБ, мг/л	-0.20	-0.40, 0.00	0.031
Примечание: ¹ ДИ - Доверительный интервал; N – количество наблюдений; beta – коэффициент регрессии; p – уровень статистической значимости. Коэффициент R ² = 0.42.			

Как видно из таблицы 4.7, уровень св. Т3 является независимым фактором, влияющим на тяжесть неврологического дефицита в остром периоде ишемического инсульта. С увеличением уровня св. Т3 на 1 пмоль/л сумма баллов по Скандинавской шкале увеличивается на 3 балла (95% ДИ 0.15 - 5.91). При этом повышение св. Т4 ассоциировано с уменьшением суммы баллов по Скандинавской шкале (увеличение тяжести дефицита), однако, данный эффект не достигает статистической значимости. Обращает на себя внимание, что такие показатели, как ТТГ, соотношение св. Т3/св. Т4, а также ряд базисных факторов риска исключены из регрессии на этапе подгонки модели, как не влияющие на качество модели. Графическое отображение сочетанного влияния уровней св. Т3 и св. Т4 представлено на рисунке 4.3.

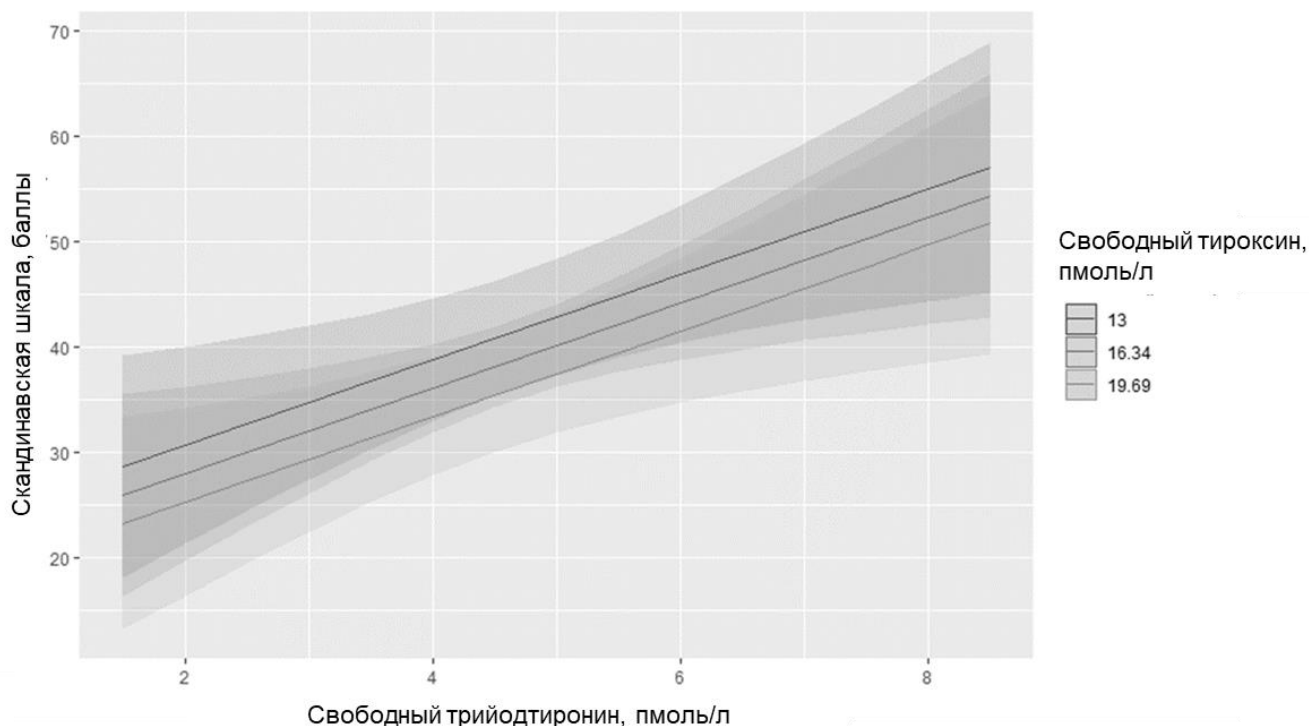


Рисунок 4.4 – График регрессионного влияния уровней св. Т3 и св. Т4 на тяжесть неврологического дефицита в остром периоде ишемического инсульта

Для подтверждения ассоциации между высоким уровнем св. Т3 и менее тяжелым неврологическим дефицитом в остром периоде ишемического инсульта был проведен анализ вариации (метод ANOVA) тяжести неврологического дефицита в подгруппах пациентов, сформированных в зависимости от уровня свободного трийодтиронина (менее 25-го перцентилья, 25-75 перцентиль, более 75-го перцентилья).

Тест ANOVA показал, что у пациентов с уровнем свободного трийодтиронина в IV квантиле (≥ 5.35 пмоль/л; 95% ДИ 5,01 – 5,61) неврологический дефицит был менее выражен по сравнению с пациентами с уровнем трийодтиронина во II-III квантиле (медиана по шкале SSS 48 баллов и 37 баллов соответственно, $p = 0,0481$), и значительно менее выражен по сравнению с пациентами, у которых уровень трийодтиронина находился в I квантиле ($\leq 3,4050$ пмоль/л, медианы по шкале SSS 48 и 30 баллов соответственно, $p=0,0018$). Результаты анализа вариации представлены на рисунке 4.5.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что низкий уровень трийодтиронина ассоциирован с более тяжелым неврологическим дефицитом, в то время как высокий уровень может иметь потенциальный защитный эффект.



Рисунок 4.5 – Анализ вариации неврологического дефицита в подгруппах пациентов в зависимости от содержания свободного трийодтиронина (тест ANOVA)

4.4. Влияние тиреоидных гормонов на функциональный исход ишемического инсульта в многофакторной модели

Через 6 месяцев с момента развития ишемического инсульта 114 пациентов были отнесены к группе, перенесших инсульт с неблагоприятным исходом, а 44 пациента составили группу с благоприятным функциональным исходом. Для выбора наиболее значимых предикторов, влияющих на функциональный исход инсульта, был проведен сравнительный анализ их распределения в подгруппах

пациентов согласно дихотомизированной конечной точке. Результаты проведенного анализа представлены в таблице 4.8.

Таблица 4.8 – Сравнительный анализ распределения предикторов в подгруппах пациентов с различными исходами инсульта

	mRs 0-2 (n=44)	mRs 3-6 (n=114)	Значение p
Возраст, годы	68 (55 – 70,4)	76 (72 – 77)	0,0006
Св. Т3, пмоль/л	4,815 (4,57 – 5,5798)	4,43 (4,036 – 4,65)	0,0173
Св. Т4, пмоль/л	16,1 (14,61-17,22)	16,5 (15,47 – 16,83)	> 0,05
ТТГ, мкМЕ/мл	1,305 (0,78 – 1,86)	1,16 (0,99 – 1,43)	> 0,05
С-реактивный белок, мг/л	6,29 (5,26 – 8,04)	16,1 (8,57 – 24,7)	0,0140
Отношение Св.Т3 / Св.Т4	0,366 (0,287 – 0,343)	0,27 (0,236 – 0,304)	0,0374

Сравнительный анализ показал, что пациенты группы с неблагоприятным исходом были старше, имели значительно более низкий уровень св. Т3, более высокие уровни СРБ и более низкое соотношение свободного Т3 и свободного Т4.

Для определения предикторов, влияющих на функциональный исход инсульта по всему спектру шкалы mRs был использован метод порядковой логистической регрессии, представляющий собой расширение простой логистической регрессии для бинарной переменной отклика. Для определения наиболее эффективной модели были использованы информационные критерии Акайке и Шварца. При выборе предикторов наилучшее качество модели (AIC = 61,78) достигнуто при включении в модель возраста, пола, систолического АД, уровня св. Т3, св. Т4, ТТГ, соотношения св. Т3 / св. Т4, уровня С-реактивного белка, количества баллов по Скандинавской шкале инсульта. Остальные предикторы, включая тип ишемического инсульта, сосудистый бассейн, существенно не влияли

на качество модели по информационным критериям. Полученные в ходе моделирования коэффициенты предикторов, влияющих на функциональный исход инсульта, уровни их статистической значимости, отношение шансов для более высоких значений по шкале mRs и 95% доверительный интервал представлены в таблице 4.9.

Таблица 4.9 – Показатели модели влияния предикторов на функциональный исход инсульта, основанной на порядковой логистической регрессии (модель 1)

Предиктор	Коэффициент	p	Отношение шансов (OR)	95% ДИ для отношения шансов
Возраст, годы	0.055	0,058	1,06	0,998-1.12
Систолическое АД, мм. рт. рт.	0.014	0,23	1,014	0,99-1,04
ТТГ, мкМЕ/мл	-0.167	0,349	0,8466	0,5976-1,1992
Св. Т3, пмоль/л	-0.84	<0,0001	0,432	0,277-0,674
Св. Т4, пмоль/л	0,19	0,0496	1,2095	1,0003-1,47
СРБ, мг/л	0.01178570	0,346	1.012	0,988-1,037
Скандинавская шкала, баллы	-0.156	<0,0001	0,8555	0,8048-0,9094

Анализ результатов моделирования методом порядковой логистической регрессии показал, что увеличение уровня св. Т3 на 1 пмоль/л ассоциировано со снижением шанса более тяжелого функционального исхода инсульта (больше баллов по шкале mRs) на 56% при прочих равных условиях. Модель обладает точностью прогнозирования тяжести по шкале mRs: 1 балл– 46%, mRs 2 балла – 66%, mRs 3 балла – 70%, mRs 4 балла – 71%, mRs 5 баллов – 80%, 6 баллов – 84%.

Одно из предположений, лежащих в основе порядковой логистической (и порядковой пробитовой) регрессии, заключается в том, что отношения между каждой парой групп результатов одинаковы. Применительно шкалы Рэнкина имеются основания считать, что отношения между парами групп могут отличаться. В частности, 1 и 2 балла представляют собой легкий дефицит, в то время как 5 и 6 баллов – тяжелый дефицит или смерть, что нельзя считать равнозначным. Данный факт может требовать поиск иных коэффициентов для прогнозирования. С целью преодоления возможных нарушений требований к порядковой логистической регрессии нами был применён метод векторной обобщенной линейно-аддитивной модели (VGLM/VGAM), представленный в пакете VGAM для среды статистических вычислений R. Полученные коэффициенты, отношение шансов и 95% доверительные интервалы, для предикторов, влияющих на функциональный исход инсульта по порядковой шкале mRs, представлены в таблице 4.10.

Таблица 4.10 – Показатели векторной обобщенной линейно-аддитивной модели влияния предикторов на функциональный исход инсульта (модель 2)

Предиктор	Коэффициент	p	Отношение шансов (OR)	95% ДИ для отношения шансов
Возраст, годы	0,063	0,00024	1,065	1,0299-1,102
Систолическое АД, мм. рт. рт.	0,018	0,0204*	1,018	1,003-1,033
ТТГ, мкМЕ/мл	-0,124	0,1667	0,884	0,742-1,053
Св. Т3, пмоль/л	-1,115	0,0355*	0,3279	0,1099-0,9782
Св. Т4, пмоль/л	0,227	0,152	1,255	0,9196-1,712
СРБ, мг/л	0,0249	0,003397*	1,026	1,008-1,042
Скандинавская шкала, баллы	-0,131	p<0,0001*	0,877	0,847-9.077

Согласно данным векторной обобщенной линейно-аддитивной модели, увеличение уровня св. Т3 на 1 пмоль/л ассоциировано со снижением шанса более тяжелого функционального исхода инсульта (больше баллов по шкале mRs) на 67% при прочих равных условиях. Другими факторами, влияющими на исход инсульта,

помимо изначальной его тяжести, согласно данной модели, являются возраст, систолическое артериальное давление, уровень С-реактивного белка.

График влияния св. Т3 на исход инсульта в модели логистической порядковой регрессии представлен на рисунке 4.5.

Согласно данным, представленным на рисунке 4.5, повышение уровня свободного трийодтиронина в большей степени ассоциировано с повышением вероятности функционального исхода в 1 и 2 балла по шкале mRs и со снижением вероятности исхода инсульта в 5 баллов по шкале mRs.

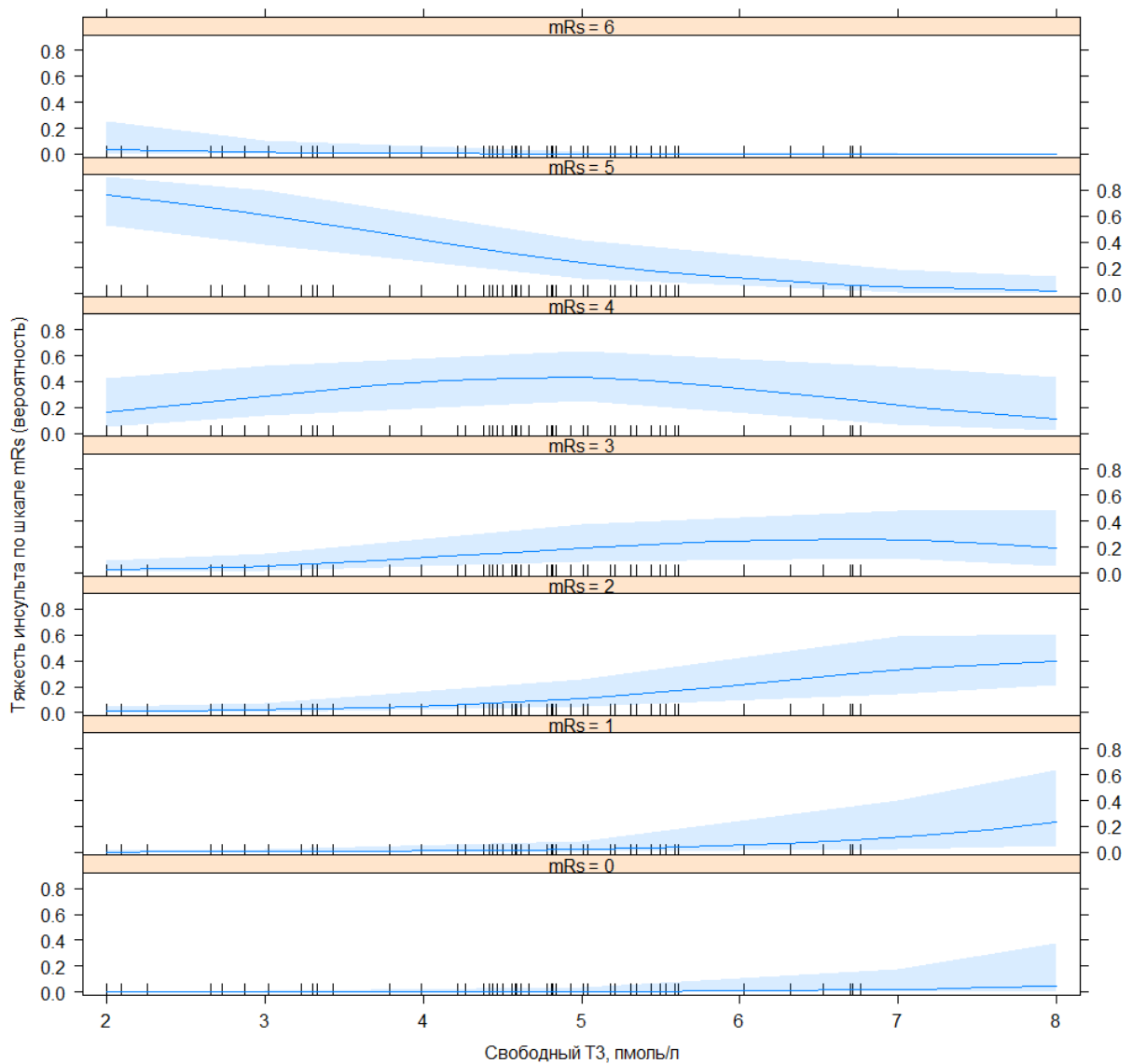
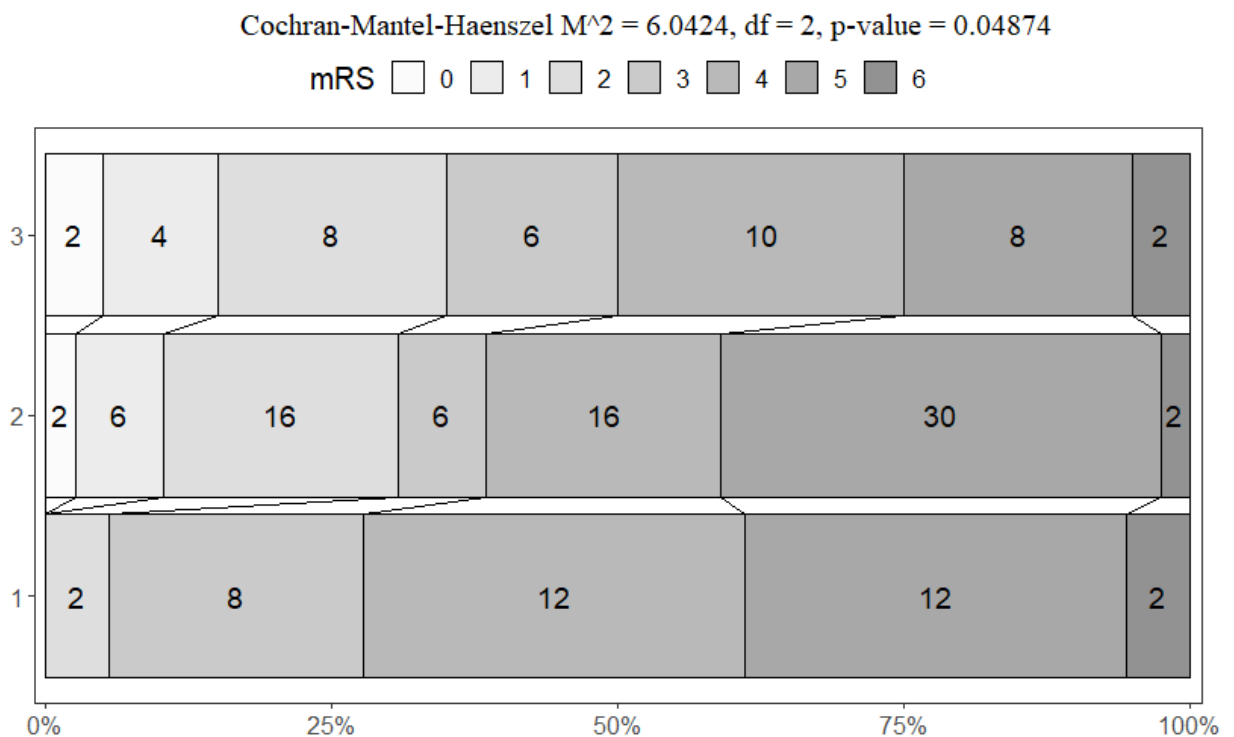


Рисунок 4.6 – Влияние уровня свободного трийодтиронина на шансы различных функциональных исходов ишемического инсульта

Обе использованные модели демонстрируют ассоциацию высоких уровней свободного трийодтиронина с более высокими шансами благоприятного функционального исхода инсульта.

С целью выполнения рекомендаций Европейской Организации по борьбе с инсультом (ESO) по научному анализу факторов, влияющих на функциональный исход ишемического инсульта, был использован тест Кохрена-Мантеля-Хензеля для поправки полученных различий в исходах на возраст и базисную тяжесть инсульта [305–307]. Результаты анализа (СМН $p = 0,0489$) демонстрируют, что функциональный исход ишемического инсульта статистически значимо связан с уровнем св. Т3, вне зависимости от возраста и исходной тяжести неврологического дефицита (рисунок 4.7).



Примечание: 1 – группа пациентов с уровнем св. Т3 в первом квантиле, 2 – группа пациентов с уровнем св. Т3 во втором-третьем квантилях, 3 – группа пациентов с уровнем св. Т3 в четвертом квантиле.

Рисунок 4.7 – Распределение пациентов по тяжести функционального исхода инсульта в зависимости от квантилей уровня свободного трийодтиронина

Для прогнозирования исхода ишемического инсульта по дихотомизированному отклику (0-2 балла по шкале mRs против 3-6 баллов) была использована обобщенная модель бинарной регрессии (GLM). В качестве предикторов риска для модели использовался полный набор признаков, указанных в табл. 1, значимость влияния признаков на риск неблагоприятного исхода инсульта рассчитывалась согласно критерию Вальда. Характеристики статистически значимых предикторов неблагоприятного исхода инсульта в дихотомизированной модели представлены в таблице 4.11.

Таблица 4.11 – Показатели влияния предикторов на дихотомизированный функциональный исход инсульта в модели пробит-регрессии (модель 3)

Предиктор	Коэффициент	p	Отношение шансов (OR)	95% ДИ для отношения шансов
Возраст, годы	0,054	0.037	1,06	1,013-1,105
Св. Т3, пмоль/л	-0,63	0.008	0,534	0,33-0,76
СРБ, мг/л	0,03	0.042	1,03	1,005-1,065
Скандинавская шкала инсульта, баллы	-0,13	p<0,0001	0,88	0,8-0,9413

Согласно данным пробит-регрессии, увеличение уровня св. Т3 на 1 пмоль/л ассоциировано со снижением шанса неблагоприятного функционального исхода инсульта (более 2 баллов шкале mRs) на 46% при прочих равных условиях. Эффект уровня свободного трийодтиронина на вероятность неблагоприятного исхода инсульта представлен на рисунке 4.7. На рисунке 4.8 представлена ROC-кривая, построенная для модели логистической регрессии влияния предикторов на риск

неблагоприятного исхода ишемического инсульта. Площадью под кривой составила $AUC=0,84$.

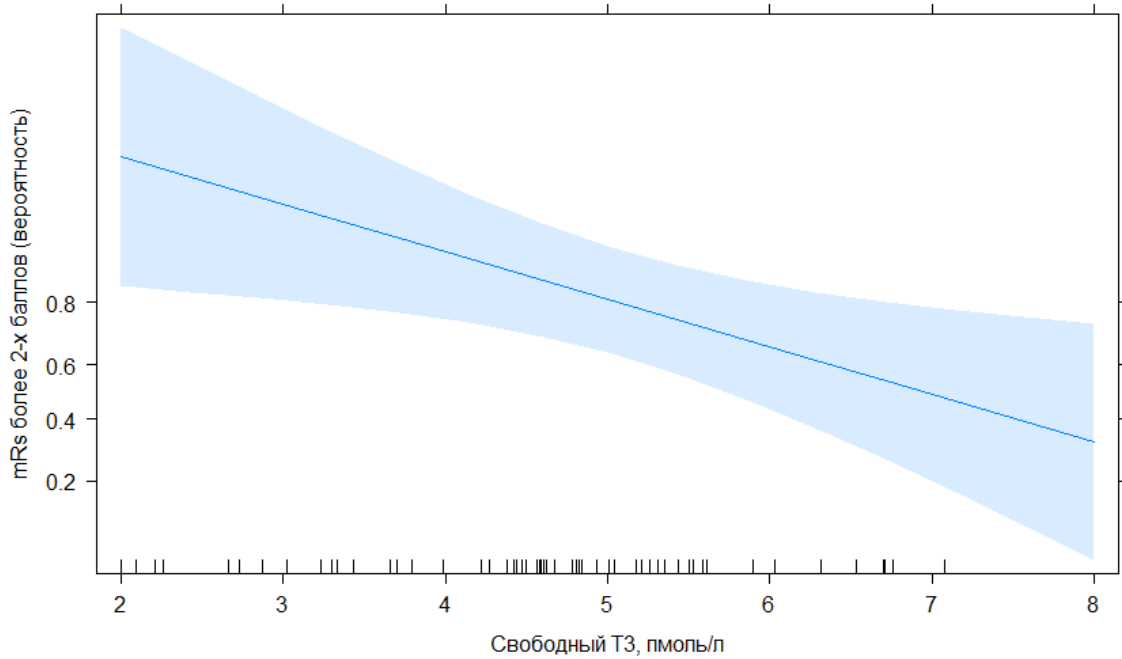


Рисунок 4.7 – Влияние уровня свободного трийодтиронина на вероятность неблагоприятного исхода инсульта

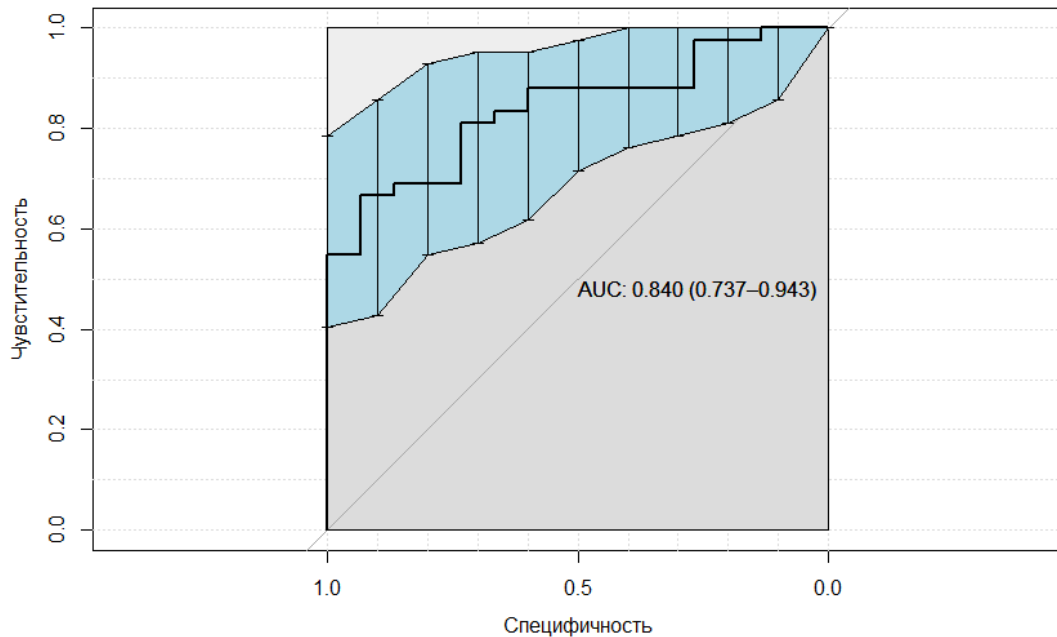


Рисунок 4.8 – График ROC-кривой влияния предикторов (модель 3) на риск неблагоприятного исхода инсульта

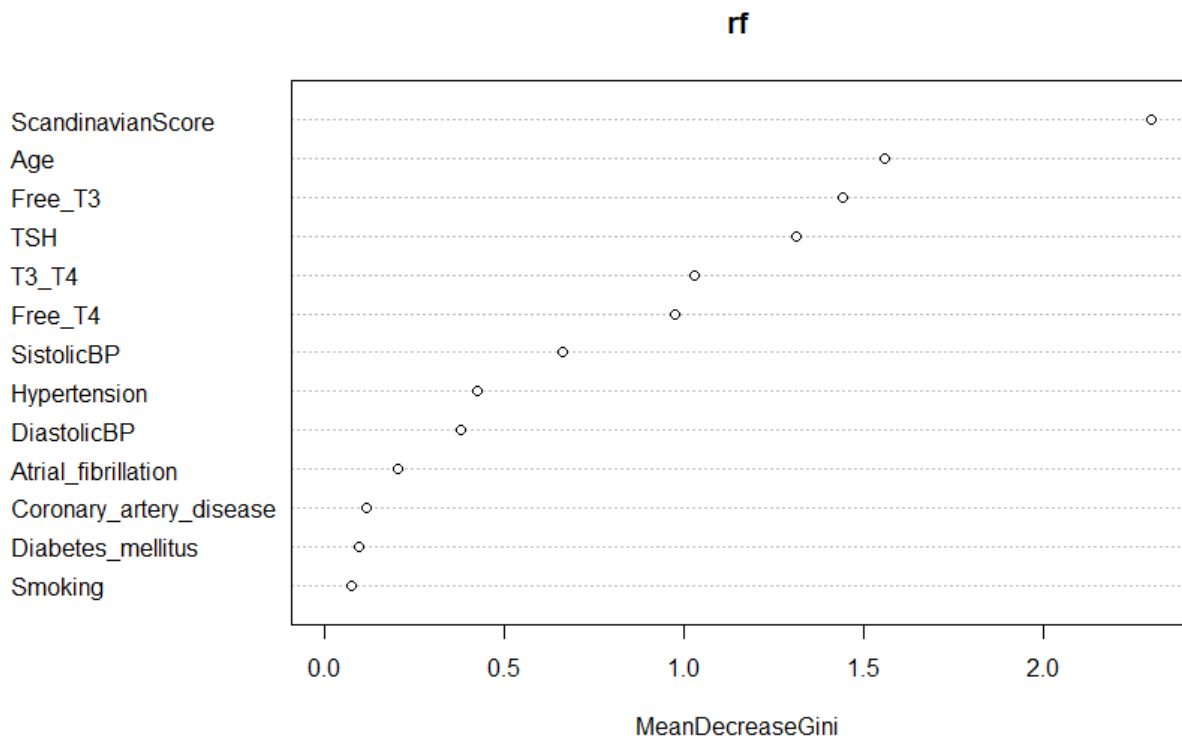
4.5. Разработка прогностической модели влияния тиреоидных гормонов на функциональный исход ишемического инсульта с применением машинного обучения

Результаты предыдущих этапов исследования продемонстрировали, что уровень св. ТЗ является независимым фактором, оказывающим влияние на тяжесть неврологического дефицита в острый период ишемического инсульта и на его функциональный исход. Вместе с тем, практический клинический интерес представляет собой использование данной ассоциации для раннего прогнозирования исходов ишемического инсульта.

Для создания модели прогнозирования функциональных исходов ишемического инсульта был использован алгоритм RandomForest. Данный метод машинного обучения представлен стратегией, которая объединяет множество прогнозов для уменьшения дисперсии и повышения надежности результатов [260; 351]. Примечательной особенностью алгоритма RandomForest является то, что он обеспечивает оценку внутренней меры важности каждого признака для прогноза [53; 261]. Эта модель обычно валидна для любого типа задач, независимо от размера, в том числе, если данные несбалансированные или частично отсутствуют. Она также позволяет проанализировать важность переменных, используемых моделью. С этой целью был рассчитан индекс важности GINI. Данный индекс измеряет увеличение вклада каждой переменной в модели при выборе в процессе случайного распределения.

Все алгоритмы машинного обучения имеют ряд гиперпараметров, которые должны быть оптимизированы для получения наилучших результатов для конкретной проблемы. Нами была использована система R и следующие пакеты: `mlr` для расчета оптимального количества деревьев (в диапазоне от 100 до 1000), пакет машинного обучения RandomForest и графический пакет `ggplot2` для анализа данных.

Для моделирования исхода ишемического инсульта с применением технологии машинного обучения были использованы 7 предикторов, представленных в таблице 4.9, а также дополнительно соотношение св. Т3/св. Т4. В качестве зависимой переменной были выбраны дихотомизированные показатели по шкале mRs. Для каждого из предикторов был рассчитан индекс важности GINI, их ранжирование согласно данному индексу представлено на рисунке 4.10.



Примечание: ScandinavianScore – Скандинавская шкала тяжести, Age – возраст, Free_T3 – св. Т3, Free_T4 – св. Т4, TSH – ТТГ, T3_T4 – соотношение св. Т3/св. Т4, SystolicBP – систолическое АД, DiastolicBP – диастолическое АД, Hypertension – артериальная гипертензия, Atrial_fibrillation – фибрилляция предсердий, Coronary_artery_disease – ИБС, Diabetes_mellitus – сахарный диабет, Smoking – курение, MeanDecreaseGini – показатель уменьшения точности прогнозирования при исключении предиктора.

Рисунок. 4.10 – Предикторы функционального исхода ишемического инсульта в модели для машинного обучения и их индексы важности GINI

Как видно из представленного выше графика, значимость уровня св. Т3 во влиянии на функциональный исход с инсультом сопоставима с возрастом и уступает тяжести неврологического дефицита в острый период.

Для обучения и тестирования модели машинного прогнозирования когорта пациентов была случайным образом разделена на 2 части: 70% и 30%. Тестирование осуществлялось путем сопоставления спрогнозированных исходов и фактически наблюдаемых. Для анализа прогностических свойств модели была построена матрица неточностей (confusion matrix). Проводилась подгонка модели путем оптимизации количества «ответвлений» в «дереве» принятия решений (параметр «ntree») и переменных, случайно выбранных в качестве кандидатов при каждом разделении (параметр «mtry»).

Окончательная модель прогнозирования функционального исхода (благоприятный/неблагоприятны) обладает точностью 89%, чувствительностью 86%, специфичностью – 100%.

Следует отметить, что разработанная модель обладает 100% чувствительностью в прогнозировании неблагоприятного функционального исхода инсульта. Зона площади под ROC-кривой составила 0,94 (рисунок 4.11)

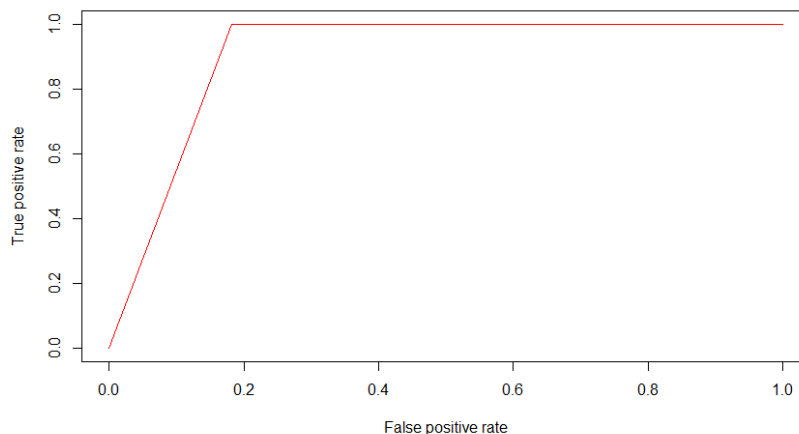


Рисунок 4.11 – График ROC-кривой модели прогнозирования исхода ишемического инсульта на основе машинного обучения

Для реализации технологии машинного обучения в клинической практике с целью прогнозирования исходов ишемического инсульта был разработан легкий в использовании алгоритм на основе технологии `rpart`. Алгоритм `rpart` строит классификационные или регрессионные модели общей структуры с помощью

двухэтапной процедуры, полученные модели можно представить в виде бинарных деревьев. Пакет реализует идеи, представленные Breiman, Friedman, Olshen, Stone et al. [353].

В модель для машинного обучения были включены предикторы, представленные в таблице 4.8. В ходе работы алгоритма предикторы, существенно не влияющие на прогностическую ценность модели, исключались автоматически. Окончательный вариант алгоритма прогнозирования исхода инсульта представлен на рисунке 4.12.

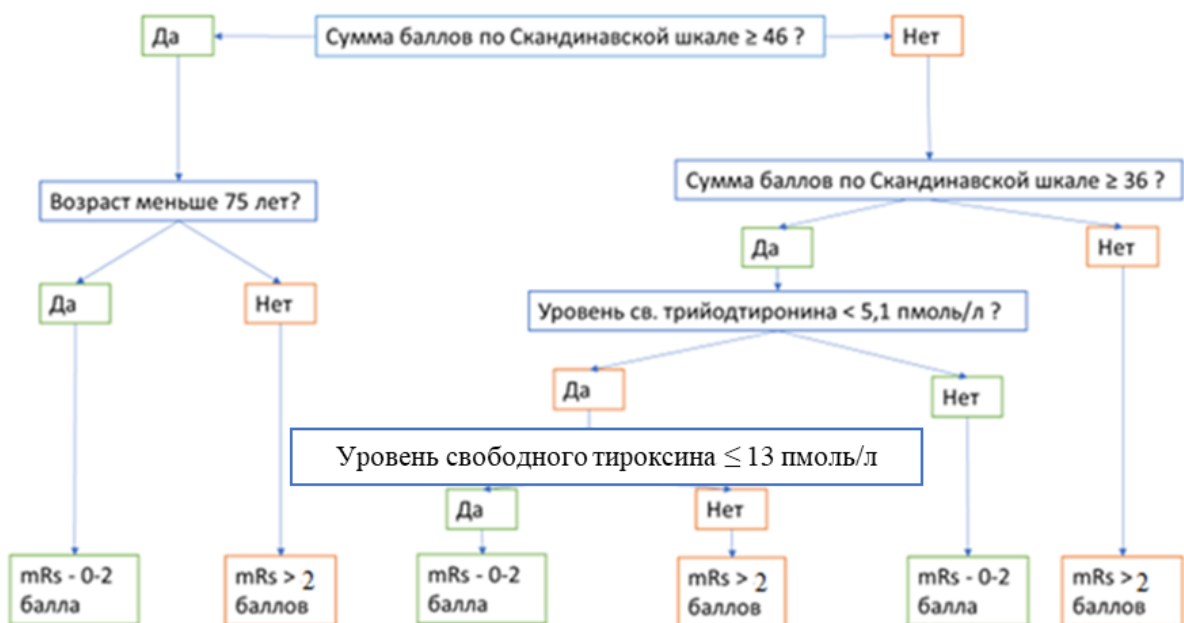
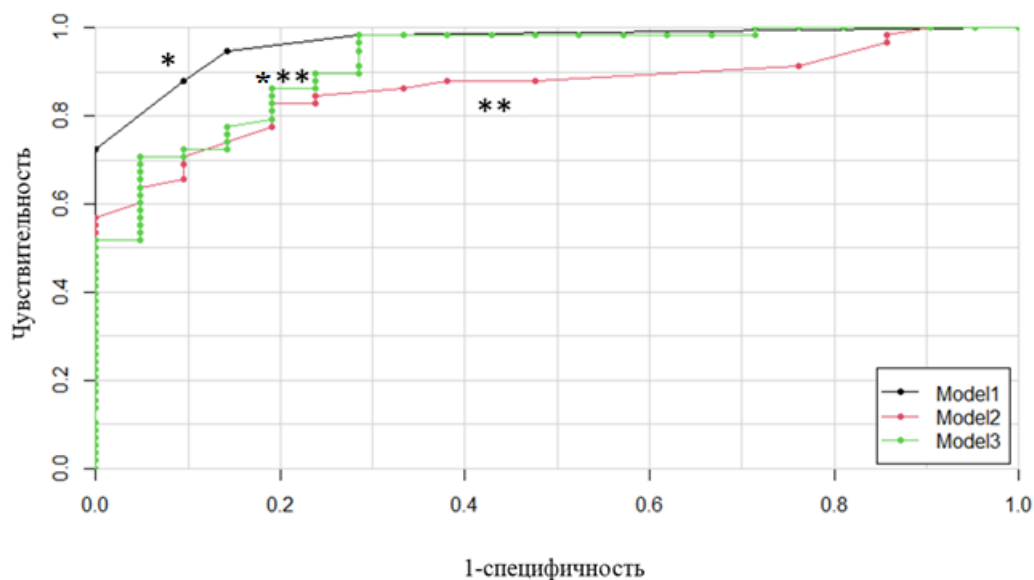


Рисунок 4.12 – Клинический алгоритм прогнозирования функционального исхода ишемического инсульта, разработанный на основе технологии машинного обучения

При анализе с применением тестовой когорты и построения матрицы неточностей, установлено, что предложенный алгоритм обладает точностью 92,6%, чувствительностью 88% и специфичностью 94%. Точность предсказания неблагоприятного исхода составляет 96%. Следует отметить, что предложенный алгоритм может быть легко применим в клинической практике, т.к. требует всего

лишь двух лабораторных показателей. Статистические характеристики предложенной модели представлена на рисунке 4.13.



Примечание: * - модель прогнозирования на основе машинного обучения; ** - модель прогнозирования на основе Скандинавской шкалы, *** - модель прогнозирования на основе возраста и Скандинавской шкалы

Рисунок 4.13 – График ROC-кривых моделей прогнозирования неблагоприятного функционального исхода ишемического инсульта

При анализе характеристик трех моделей прогнозирования неблагоприятного функционального исхода ИИ установлено, что площадь под ROC кривой для модели, основанной на машинном обучении составляет $AUC=0,92$, что превосходит площадь под ROC-кривой для модели, основанной на исходной тяжести инсульта по Скандинавской шкале ($AUC=0,84$) и площадь под ROC-кривой для модели, основанной на двух показателях (исходной тяжести инсульта по Скандинавской шкале и возрасте пациентов, $AUC=0,88$). Таким образом, разработанная модель прогнозирования неблагоприятного функционального исхода ИИ обладает превосходящими характеристиками по сравнению с методами прогнозирования, основанными на клинических данных.

ГЛАВА 5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА ТИРОНАМИНА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

5.1. Определение оптимальной однократной дозы синтетического аналога тиронамина

С учетом имеющихся данных о том, что дейодированные метаболиты трийодтиронина являются фармакологическими индукторами гипотермии, в качестве биомаркера, отражающего системные эффекты СА-Т0 была выбрана температура тела лабораторных животных. Начальная ректальная температура тела крыс до инъекции составила 38,3 °С в контрольной группе К; 38,2 °С в группе 1; 38,4 °С в группе 2; 38,3 °С в группе 3; 38,4 °С в группе 4. Статистически значимых различий в базовой температуре тела между тремя группами выявлено не было ($p>0,05$).

В контрольной группе в течение всего эксперимента температура колебалась в диапазоне $\pm 0,3$ °С. Статистически значимых изменений температуры по сравнению с начальной не было на протяжении всего эксперимента ($p>0,05$). Незначительное повышение температуры (вплоть до 1 °С у отдельных особей) можно объяснить некоторым стрессированием животных.

В экспериментальных группах 1 и 2 уже через 30 минут после инъекции тиронамина началось снижение ректальной температуры ($p\leq 0,05$). В таблице 5.1 представлено изменение температуры со временем в группе 1 и группе 2 и уровень значимости p . ΔT равно разнице между начальной температурой и температурой в эксперименте.

В группе 1 ректальная температура максимально снизилась к 60 минуте эксперимента, когда разница с начальной температурой составила 2,1 °С ($p=0,028$). Затем температура начала плавно возрастать, при этом оставаясь достоверно ниже

контроля до 150 минуты. К 210 минуте эксперимента средняя температура была всего на 0,5°C ниже нормы.

В группе 2 температура снижалась до 90-120 минуты, максимальное снижение составило 2,6°C ($p=0,043$). Затем температура начала постепенно возрастать, оставаясь статистически ниже нормы ($p\leq 0,05$) вплоть до 240 минуты.

Как видно из графика, представленного на рисунке 5.1, приблизительно до 60 минуты снижение температуры протекало схожим образом, не зависимо от дозы препарата. Однако затем в группе 2 снижение продолжилось, в то время как в группе 1 температура начала постепенно возрастать. На 210 минуте эксперимента выявлена статистически значимая ($p\leq 0,05$) разница между температурой тела животных из групп 1 и 2.

Таблица 5.1 – Изменение ректальной температуры крыс под влиянием СА-Т0АМ

Минута эксперимента	Группа 1		Группа 2	
	ΔT	p	ΔT	p
30	1,9	0,027709	1,7	0,043115
60	2,1	0,027709	2,2	0,043115
90	2,0	0,027709	2,6	0,043115
120	1,7	0,027709	2,6	0,043115
150	1,5	0,074736	2,4	0,043115
180	1,1	0,046400	1,9	0,043115
210	0,5	0,224917	2,0	0,043115
240	0,5	0,224917	1,7	0,067890

Таким образом, у животных, получавших препарат в большей дозировке, пониженная температура держалась дольше.

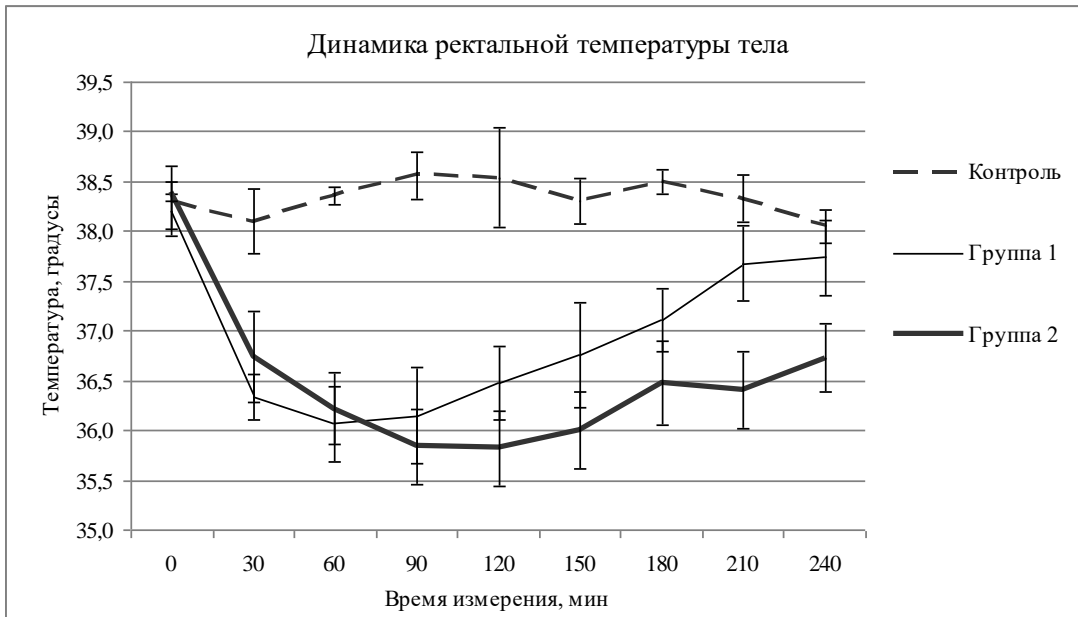


Рисунок 5.1 – Динамика изменения ректальной температуры в 1, 2 и К группах животных

В экспериментальной группе 3 снижение температуры составило $-4,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 60 минуте ($p \leq 0,05$). Летальность в группе 1 составила 33,3%. У выживших животных в период действия препарата были отмечены ригидность, судороги и миоклонии.

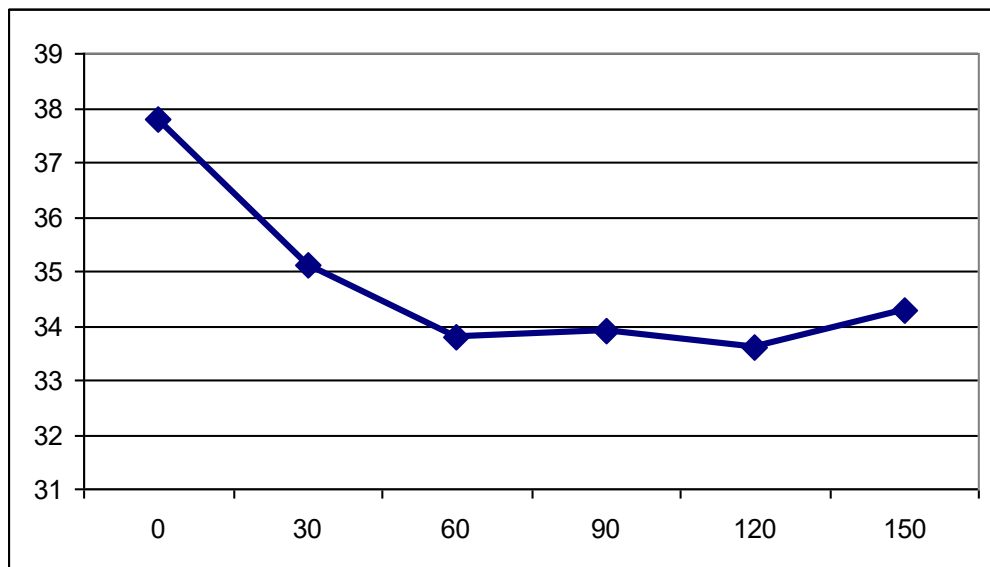


Рисунок 5.2 – Динамика изменения ректальной температуры тела у животных экспериментальной группы 3

В группе 4, животные которой получили СА-Т0АМ в дозировке 200 мг/кг, летальность составила 100%, причем гибель животных отмечалась уже с 15 мин. эксперимента.

Таким образом, в дальнейшей работе по изучению влияния СА-Т0АМ на неврологические последствия церебральной ишемии использовалась дозировка 75 мг/кг как наименее опасная в отношении витального прогноза и наиболее эффективная с точки зрения индуцирования гипотермии (в сравнении с дозировкой 50 мг/кг).

5.2. Анализ гипотермических эффектов синтетического аналога тиронамина на фоне действия других индукторов гипотермии

Имеющиеся в литературе данные о способности тиронаминов индуцировать фармакологическую гипотермию касаются, в значительно большей степени, тиронамина Т1АМ. Предполагается, что механизм гипотермического эффекта заключается в изменении под действием тиронаминов установочной точки термогенеза [220; 399]. При этом гипотермический эффект дейодированного метаболита трийодтиронина Т0АМ (синтетическим аналогом которого является синтезированная нами субстанция СА-Т0АМ) мало изучен. Для доказательства влияния СА-Т0АМ на центральные механизмы терморегуляции нами была изучена динамика температуры тела на после введения СА-Т0АМ на фоне действия другого индуктора гипотермии, связанного с норэпинефриновым механизмом. Исследование было выполнено на 20 белых беспородных лабораторных крысах массой 250-300 г., содержащихся в стандартных условиях вивария.

Животные были разделены на две экспериментальные группы: «Контроль» (6 животных, 3 самки и 3 самца) – крысы, которым после наркотизации вводили интраперитонеально 2 мл воды для инъекций и в течение 30 мин. с интервалом в 3 мин. измеряли ректальную температуру; и «Опыт» (6 животных, 3 самки и 3 самца) – крысы, которым после наркотизации вводили интраперитонеально

тиронамин T_0 в дозировке 50 мг/кг, растворенный в 2 мл воды для инъекций, с последующей термометрией.

Для регистрации температурных параметров использовали цифровой термометр ТФА с внешним проводным датчиком. Наркотизированное животное фиксировали на лабораторном столике животом вверх. Датчик, предварительно смазанный вазелином, вводили в прямую кишку крысы на глубину 2-3 см и снимали данные после стабилизации показателей. Через 30 мин. наблюдений животное снимали со столика, помещали в отдельную клетку до полного пробуждения. Датчик извлекали и обрабатывали 70% раствором этилового спирта. Через 60 мин. после начала эксперимента однократно измеряли ректальную температуру пробудившихся животных без повторной наркотизации.

Для наркотизации применяли препарат «Наркотан», действующее вещество – галотан.

Среднее значение ректальной температуры у животных под действием наркоза в начале эксперимента составило 35,12 °С (95% ДИ 34,9 - 35,3 °С). В течение следующих 10 мин. температура постепенно снижалась в обеих группах, что может быть объяснено действием наркоза, однако уже на 15 минуте эксперимента в опытной группе температура снизилась на 1 °С ($p \leq 0,05$). На 18 минуте наблюдалось сближение показаний термометрии в обеих группах («Контроль» - $33,8 \pm 0,17$ °С, «Опыт» - $33,1 \pm 0,13$ °С; $p = 0,13$). Затем температура в контрольной группе незначительно повышается и выходит на плато, уже не опускаясь ниже отметки 33,5°С до конца эксперимента. В группе «Опыт», напротив, с 15 по 21 мин. температура удерживается на одном уровне, а затем начинает падать, достигая на 30 минуте среднего значения $32,7 \pm 0,23$ °С (95% ДИ 33,35 - 32,98 °С). Медиана времени до достижения минимальной температуры в контрольной группе составила 18 минут, а в экспериментальной группе – 30 минут ($p = 0,0001$).

Статистически значимая разница в средних показателях температуры отмечалась с 21 минуты исследования ($33,47$ °С, 95% ДИ 33,1 - 34,7 °С в экспериментальной группе и $33,97$ °С, 95% ДИ 33,7 - 34,3 °С в контрольной группе,

$p=0,0121$) и сохранялась до конца исследования. Через 60 мин. после начала эксперимента средняя температура в экспериментальной была по-прежнему на $1,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ниже, чем у контрольных животных ($p\leq 0,0001$). В целом, в исследуемых группах статистически значимо отличались разница температур между первым и последним измерением (в экспериментальной группе – $1,9\text{ }^{\circ}\text{C}$, 95% ДИ $1,7 - 2,08\text{ }^{\circ}\text{C}$, в контрольной – $0,67\text{ }^{\circ}\text{C}$, 95% ДИ $0,51 - 0,85\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p<0,0001$), а также разница температуры между первым измерением и минимальным значением (в экспериментальной группе – $2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 95% ДИ $2,2 - 2,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, в контрольной – $1,4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 95% ДИ $1,6 - 1,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p<0,0001$).

Для сводной оценки различий в температурных кривых между исследуемыми группами был использован метод расчета разницы в площадях под ROC-кривыми (AUC, area under the receiver operating characteristic curve). Анализ показал наличие статистически значимой разницы в средних значениях показателя AUC (в экспериментальной группе – $-103,9$; 95% ДИ $-114,6 - -93,2$, в контрольной группе – $49,7$; 95% ДИ $-59,5 - -39,9$; $p<0,0001$). Графики температурных кривых представлены на рисунке 5.3.

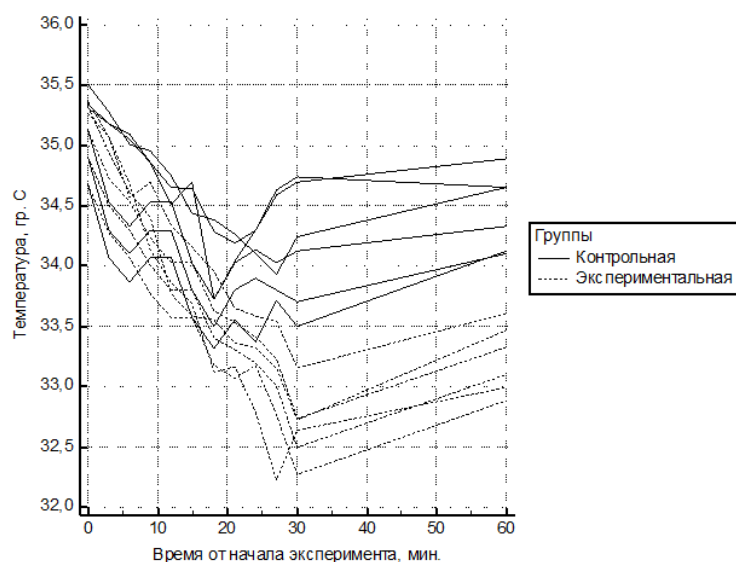


Рисунок 5.3 – Динамика ректальной температуры тела исследуемых животных на фоне галотанового наркоза (контроль) и инъекции СА-Т0АМ на фоне галотанового наркоза (эксперимент)

Как в экспериментальной, так и в контрольной группе не было отмечено таких побочных эффектов гипотермии как холодовая дрожь.

Наши результаты подтверждают данные о том, что в сравнении с тиреоидными гормонами, тиронамины проявляют свои биологические эффекты практически сразу после введения. Тиронамин (Т0) и 3-йодтиронамин (Т1) являются продуктами дейодирования и декарбоксилирования тиреоидных гормонов и действуют в организме как их антагонисты, вызывая развитие стремительной системной гипотермии посредством механизма, не затрагивающего генную транскрипцию. Тиронамины не являются лигандами для обычных ядерных рецепторов к тиреоидным гормонам, а представляют собой агонисты рецептора TAAR1 (рецептор-1, ассоциированный со следовыми аминами), сопряженного с G-белком и активируемого фенилэтиламином, тирамином, метамфетамином и схожими соединениями. Хотя имеет место доза-зависимый эффект связывания Т0 и Т1 с TAAR1 с последующей продукцией циклического аденозинмонофосфата (сAMP), до сих пор неясно, является ли TAAR1 эндогенным рецептором к тиронаминам или нет [240].

5.3. Анализ воздействия синтетического аналога тиронамина на поведенческие функции и неврологический дефицит в модели ишемического инсульта

В качестве модели острой очаговой ишемии головного мозга была выбрана перманентная перевязка ОСА с временным наложением лигатуры на контралатеральную ОСА, с учетом развитых у крыс анастомозов контралатеральных менингеальных артерий. Спектр тестов включал исследование показателей тревожности, исследовательской деятельности, неврологического дефицита по шкале NSS и 28-бальному тесту. Данные по медианам показателей тревожности и исследовательской деятельности экспериментальных животных в первые сутки после операции приведены в таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Результаты теста «Открытое поле» (ОП)

Группы животных	N	Sham	Control	T0AM
О-ОП	20 (14,5-25,0)	8 (4,3-13,3)	1 (0,3-7,8)	1 (0-4)
Вн-ОП	3 (1,5-4,0)	1 (0,3-1,0)	0 (0-1,5)	0
О-Ст	9 (7-10)	6 (3,5-7,8)	0,5 (0-4)	1 (0-4)
Вн-Ст	0 (0-0,5)	0	0 (0-1,5)	0
О-ГрА	1 (0-2,5)	2,5 (2,0-5,3)	0,5 (0-1,8)	1 (0-1,5)
Вн-ГрА	0	0	0	0
О-Гр, сек.	1 (0-3)	18,5 (5-26)	1 (0-1,2)	3 (0-5)
Вн-Гр, сек.	0	0	0	0
О-Дф	0	0	0 (0-0,8)	0 (0-1)
Вн-Дф	0	0	0	0

Примечания: N – животные до операции; Sham – ложная операция, Control – ишемия без лечения, T0AM – ишемия на фоне введения СА-T0AM (75 мг/кг); О-ОП – общие переходы в ОП, Вн-ОП – переходы во внутренние квадраты ОП, О-Ст – общее число стоек, Вн-Ст – стойки во внутренних квадратах ОП, О-ГрА – общее число актов груминга за 3 мин. теста в ОП, Вн-ГрА – акты груминга во внутренних квадратах ОП, О-Гр – общее время груминга в ОП, Вн-Гр – время груминга во внутренних квадратах ОП, О-Дф – количество дефекаций в ОП, Вн-Дф – количество дефекаций во внутренних квадратах ОП

В первые сутки после ложной операции количество общих переходов в ОП сократилось на 60%, а во внутренних квадратах – на 33,3%. У животных с ишемией как на фоне лечения, так и без него падение общих переходов составило 95%, а переходов во внутренние квадраты – 100%. Такое снижение общей активности, на наш взгляд, является следствием ишемии, возникшей после односторонней перманентной перевязки правой ОСА.

Общее количество стоек в ОП после ложной операции снизилось на 33,3%, после моделирования ишемии – на 94,4%, а на фоне введения препарата этот показатель составил 88,9%. Количество стоек во внутренних квадратах ОП в нашем эксперименте оказалось неинформативным, поскольку ни в одной из групп – ни до операции, ни после они не наблюдались.

Общее количество актов груминга после ложной операции возросло в 2,5 раза, а его продолжительность – в 18,5 раз, что отражает реакцию животных на перенесенный стресс. После моделирования ишемии актов груминга стало в 2 раза меньше, а общая продолжительность осталась на предоперационном уровне, что может быть следствием общей слабости и угнетения нервной системы. В группе животных, получавших лечение, не произошло существенных изменений в общем количестве актов груминга по сравнению с предоперационным периодом, зато общая продолжительность груминга возросла в 3 раза. Количество и продолжительность актов груминга во внутренних квадратах оказалось в нашем исследовании неинформативным показателем, поскольку не было зарегистрировано ни в одной из экспериментальных групп ни до операции, ни после нее (рисунок 5.4).

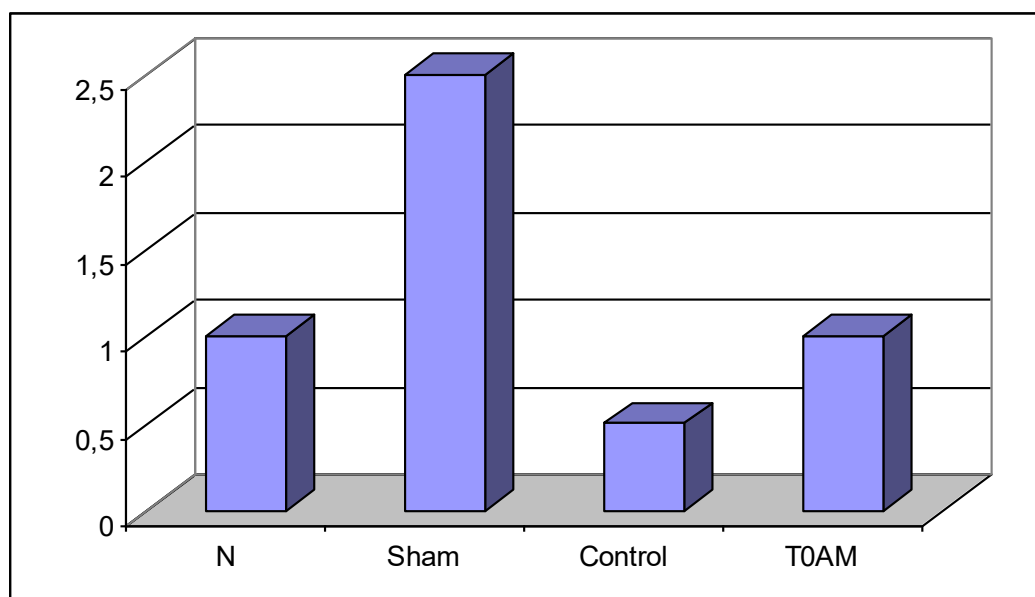


Рисунок 5.4 – Медианы общего количества актов груминга экспериментальных животных

Количество дефекаций, считающееся показателем эмоционального состояния животных и повышения уровня тревожности, в нашем исследовании, к сожалению, оказалось неинформативным, поскольку медиана во всех группах составила 0 – как до, так и после оперативного вмешательства. Поэтому сделать заключение об изменении эмоционального состояния животных после ишемизации и на фоне терапии СА-Т0АМ на основании полученных данных невозможно. Тем не менее, обращает на себя внимание сам факт появления дефекаций в ОП у некоторых крыс с ишемией ($UQ=0,8$ для Control и $UQ=1,0$ для Т0АМ), в то время как у здоровых и ложноперирированных животных они отсутствовали.

Тест «Открытое поле» (ОП) широко используется для оценки двигательной и исследовательской активности и эмоциональности у грызунов [9]. Особенно широко он представлен в исследованиях по психологии животных, поскольку прост как в изготовлении установки, так и в работе с ней. ОП обеспечивает простую и довольно быструю оценку четко определенных форм поведения, не требующих предварительного обучения испытуемого животного и практически никакой специальной подготовки для человека, проводящего наблюдение. Однако интерпретация различными авторами одних и тех же поведенческих реакций в тесте не всегда совпадает, что зависит от задач конкретного эксперимента и его организации.

Согласно классическим представлениям, двигательная горизонтальная и вертикальная активность (переходы и стойки) определяет состояние активно-поисковой компоненты поведения, а груминг и уровень дефекаций – пассивно-оборонительной. Низкую двигательную активность некоторые исследователи связывают с более высоким уровнем эмоциональности, т.к. неподвижность можно рассматривать как симптом страха, тревожности, а интенсивность страха отражает эмоциональное состояние животного. Однако, по мнению других авторов, снижение показателя двигательной активности указывает на уменьшение общего беспокойства и уменьшение стрессированности. Для решения этих противоречий предложено отдельно измерять двигательную и исследовательскую активность во внутренних и внешних квадратах. Увеличение числа выходов во внутренние

квадраты, увеличение длительности пребывания во внутренних квадратах рассматривают как проявление снижения тревожности. В работе [341] вертикальную подвижность (количество стоек) рассматривали как степень любопытства животных к новым условиям окружающей среды. Увеличение спонтанной двигательной активности и увеличение времени, которое мыши проводили в незащищенной центральной зоне открытого поля в работе [119] расценивали как свидетельства эффективности лечения инсульта исследуемым препаратом.

В нашем исследовании показано общее снижение поисковой активности животных после перманентной односторонней перевязки ОСА. Также косвенно можно сделать вывод о росте уровня тревожности (снижение общего количества переходов и стоек, отсутствие выходов во внутренние квадраты). Наши результаты подтверждает литературные данные, согласно которым в период острой фазы фокальной ишемии у мышей развивается период гипоактивности [68]. Мы также наблюдаем резкое снижение активности в первые сутки после операции как у крыс, получавших аналог тиронамина, так и у крыс без лечения. Вероятно, требуется более продолжительное введение ТОАМ для получения выраженного терапевтического эффекта. Кроме того, малоподвижность сама по себе может быть непосредственным симптомом ишемии, а также следствием угнетения высшей нервной деятельности после инсульта.

При проведении теста «Открытое поле» необходимо учитывать, что на поведение животных влияет ряд внешних и внутренних факторов, поскольку ОП является незнакомой средой для грызунов. Поэтому помещение крысы в установку связано с чувством страха, которое конкурирует с исследовательской активностью. Повышенная тревожность снижает исследовательское поведение, чем также можно объяснить полученные нами данные.

Стойки, которые животное выполняет, стоя на обеих задних лапах в вертикальном положении, считаются исследовательским поведением. Нет четких указаний на их связь с тревожностью. Некоторые исследования показывают, что повышение числа стоек согласуется с повышенным уровнем тревожности у

мышей, в то время как другие утверждают, что пониженное число стоек является показателем повышенной тревожности. Таким образом, стойки можно использовать для отличия поведения, связанного с тревогой, от поведения интактных животных. Некоторые исследователи интерпретировали высокую активность или повышенное исследовательское поведение как показатель низкой эмоциональности, в то время как другие считают, что исследовательское поведение не зависит от эмоциональности [68]. В нашем исследовании у всех животных после операции исследовательская активность несколько снижена. В группе ложнооперированных крыс это объясняется в первую очередь повышенной настороженностью, тревожностью. У животных с ишемией этот показатель снижен гораздо сильнее, вероятно, вследствие мышечной слабости и физических затруднений в выполнении стоек на задних лапах. Тем не менее, в группе животных, получавших аналог тиронамина медиана общих стоек в два раза выше, чем у контрольных животных.

Грумминг рассматривается как сигнал тревоги и стресса, выраженные в виде смещенного поведения. По мнению M.Rojas-Carvajal et al., если животное тратит больше времени на принятие поз и движения, которые несовместимы с защитным поведением, то грумминг может иметь другие биологические функции, не связанные с тревожностью [338]. Грумминг такого типа, называемый также постстрессовым груммингом, будет демонстрироваться, когда максимальный уровень возбуждения уже был пройден. Длительный грумминг с более сложным паттерном движений может рассматриваться как важный показатель привыкания к стрессирующей ситуации. В нашем исследовании наибольшая продолжительность актов грумминга наблюдалась у ложнооперированных животных, что мы рассматриваем как показатель восстановления после стресса (постстрессовый грумминг). У крыс с ишемией средняя продолжительность одного акта грумминга несколько выше, чем у здоровых животных, но гораздо ниже, чем после ложной операции. Это может быть связано с общей депрессией и угнетением мозговой деятельности либо с мышечной слабостью. Тем не менее, у крыс, получавших аналог тиронамина, данный показатель немного выше, чем у крыс, не получавших лечения, и мы

рассматриваем это как положительную динамику в отношении реакции восстановления после стресса.

Показатели 28-бального теста тяжести неврологического дефицита приведены в таблице 5.3 и отражены на рисунке 5.6.

Таблица 5.3 – Показатели 28-бального теста в динамике эксперимента

Группы животных	N	Sham	Control	T0AM
Сутки после операции				
1	27 (LQ=26, UQ=27)	27 (LQ=23,5, UQ=27)	24 (LQ=23,5, UQ=24,5)	25 (LQ=24, UQ=25,5)
3	27 (LQ=26, UQ=27)	26 (LQ=23,5, UQ=26)	25 (LQ=24,5, UQ=26)	26 (LQ=25,5, UQ=26,5)
7	27 (LQ=26, UQ=27)	26 (LQ=23, UQ=26,5)	25 (LQ=25, UQ=25,5)	24 (LQ=24, UQ=25,5)

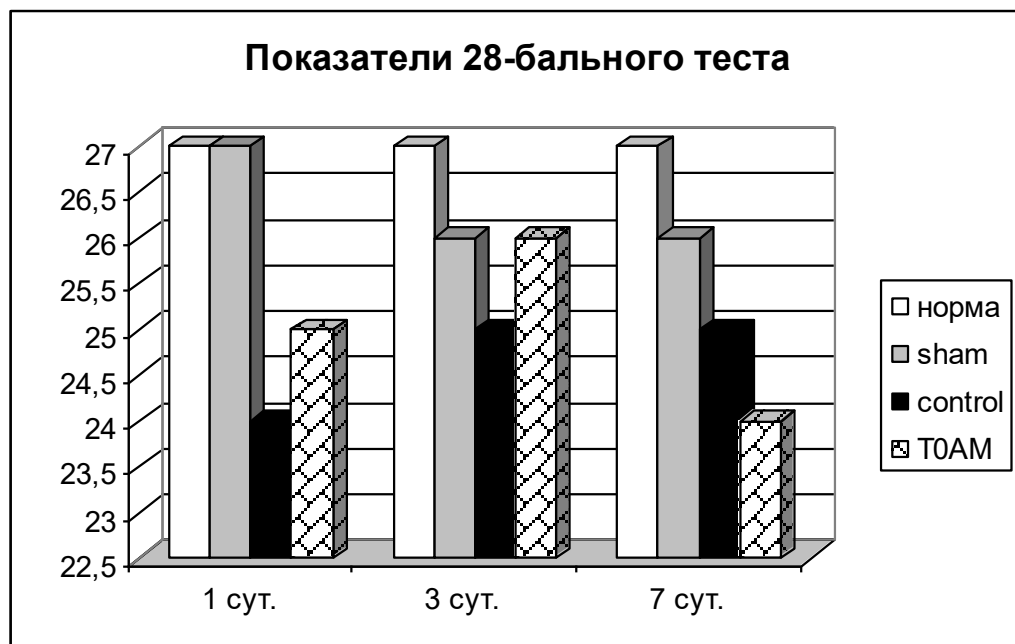


Рисунок 5.5 – Динамика изменений показателей 28-бального теста у лабораторных крыс в эксперименте

До эксперимента у интактных животных показатель 28-бального теста составил 27 баллов. Мы предполагаем, что такое значение, в отличие от ожидаемого в 28 баллов, обусловлено пожилым возрастом животных. На первые сутки после операции у ложнооперированных животных этот показатель не изменился, а в дальнейшем (3 и 7 сутки) снизился до 26 баллов, что можно объяснить либо процессами естественного старения, либо незначительным воспалением послеоперационного шва, которое наблюдалось у отдельных особей. У крыс с окклюзией ПОСА на первые сутки на фоне ишемии наблюдается значительное падение показателей теста – до 24 баллов. В дальнейшем (3 и 7 сутки) неврологический дефицит так и не был скомпенсирован, и показатель теста составил 25 баллов. На фоне терапии аналогом T0AM неврологический дефицит на первые сутки был выше, чем у крыс, не получавших лечение (25 баллов). На 3 сутки этот показатель почти приблизился к норме (26 баллов), однако, к 7 суткам мы наблюдаем падение до 24 баллов, что может быть связано с предполагаемым угнетающим влиянием CA-T0AM на ЦНС. Показатели NSS-теста приведены в таблице 5.4 и отражены на рисунке 5.7.

Таблица 5.4– Показатели медианы NSS-теста в динамике эксперимента

Группы животных	N	Sham	Control	T0AM
Сутки после операции				
1	1 (LQ=0, UQ=1)	1 (LQ=0,5, UQ=1)	3 (LQ=2, UQ=3)	1 (LQ=0,5, UQ=1,5)
3	1 (LQ=0, UQ=1)	1 (LQ=0,5, UQ=1,5)	2 (LQ=1, UQ=2,5)	1 (LQ=1, UQ=1)
7	1 (LQ=0, UQ=1)	1 (LQ=0,5, UQ=1,5)	2 (LQ=2, UQ=2)	0 (LQ=0, UQ=1)

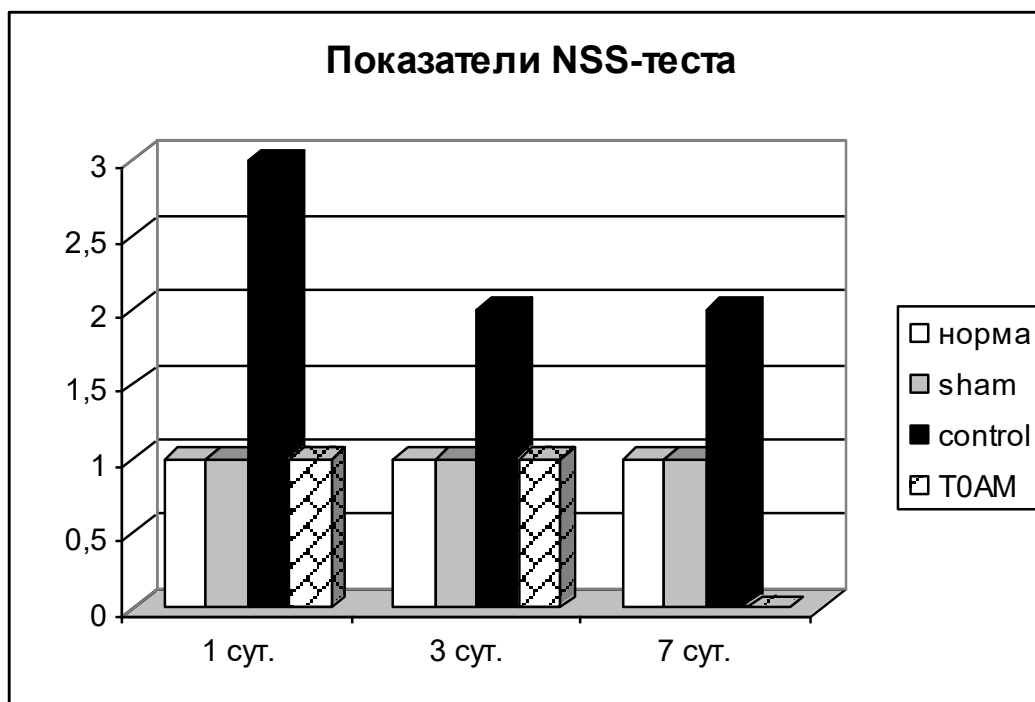


Рисунок 5.6 – Динамика изменений показателей NSS-теста у лабораторных крыс в эксперименте

У интактных животных показателей NSS-теста составил 1 балл. Это несколько выше ожидаемого показателя (0 баллов), что может быть связано с возрастом экспериментальных животных. После операции у ложнооперированных особей результаты NSS-теста не отличались от нормы (1, 3, 7 сутки – 1 балл). У крыс с ишемией на первые сутки наблюдался выраженный неврологический дефицит (3 баллов), который сохранялся вплоть до 7 суток (2 балла). У животных на фоне терапии показатель NSS-теста не отличался от нормальных значений (1 балл), а к концу наблюдений (7 сутки) даже превзошел дооперационный результат (0 баллов).

Показатели теста Гарсиа приведены в таблице 5.4 и отражены на рисунке 5.8. У интактных животных показатель теста составил ожидаемые для здоровых особей 18 баллов. Ложная операция привела к падению показателя до 16 баллов на 1-3 сутки и к еще большему – на 7 сутки (14 баллов).

Таблица 5.4 – Показатели теста Гарсия в динамике эксперимента

Группы животных	N	Sham	Control	T0AM
Сутки после операции				
1	18 (LQ=14, UQ=18)	16 (LQ=15,5, UQ=17)	17 (LQ=16, UQ=17)	17 (LQ=15, UQ=17,5)
3	18 (LQ=14, UQ=18)	16 (LQ=14,5, UQ=17)	17 (LQ=16, UQ=17)	15 (LQ=12,5, UQ=16)
7	18 (LQ=14, UQ=18)	14 (LQ=14, UQ=16)	16 (LQ=16, UQ=17)	16,5 (LQ=16,3, UQ=16,8)

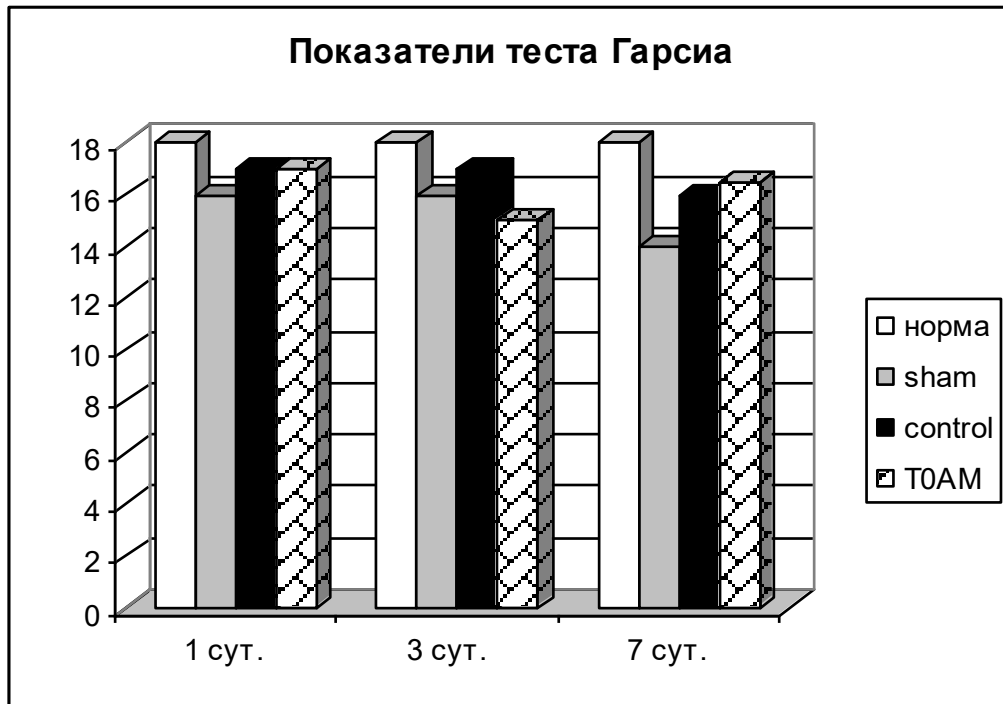


Рисунок 5.7 – Динамика изменений показателей теста Гарсия у лабораторных крыс в эксперименте

У животных с ишемией тест Гарсия показал результат в 17 баллов на 1-3 сутки с дальнейшим снижением до 16 баллов. В группе с терапией на 1 сутки получен тот же результат, что и у крыс без лечения (17 баллов). Затем показатель теста Гарсия снижается до 15 баллов на 3 сутки с тенденцией роста к концу эксперимента (16,5 балла на 7 сутки). Таким образом, полученные данные

оказались противоречивыми, и мы пришли к выводу, что тест Гарсия малоинформативен в нашем эксперименте. По-видимому, данная шкала не подходит для выбранной нами модели ишемии и в дальнейшем мы не предполагаем пользоваться этим способом оценки неврологического дефицита.

Показатели углового теста, характеризующие наличие у лабораторных животных синдрома гемиигнорирования, зрительной асимметрии, а также нарушений динамического равновесия приведены в таблице 5.7 и отражены на рисунке 5.8.

Таблица 5.7 – Показатели углового теста (медианы) в модели острой полушарной ишемии головного мозга у лабораторных животных

Группы животных	N	Sham	Control	T0AM
Сутки после операции				
1	0,67 (LQ=0,67, UQ=1,5)	2,33 (LQ=1,38, UQ=2,33)	1,00 (LQ=0,72, UQ=1,0)	0,67 (LQ=0,46, UQ=4,84)
3	0,67 (LQ=0,67, UQ=1,5)	0,43 (LQ=0,43, UQ=2,22)	0,43 (LQ=0,43, UQ=0,55)	0,11 (LQ=0,06, UQ=2,06)
7	0,67 (LQ=0,67, UQ=1,5)	2,33 (LQ=1,67, UQ=2,33)	0,46 (LQ=0,36, UQ=0,57)	0,67 (LQ=0,67, UQ=0,84)

Обращает на себя внимание тот факт, что разброс значений в группе животных, принимавших терапию синтетическим аналогом тиронамина, был наибольшим, т.е. группа в целом оказалась неоднородной по показателям углового теста.

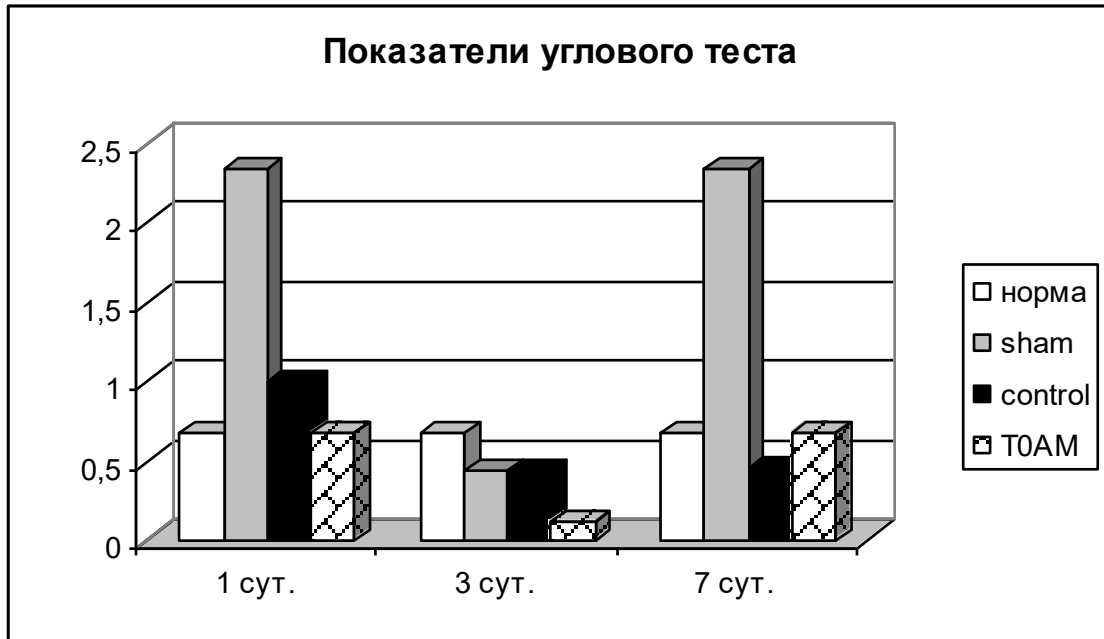


Рисунок 5.8 – Динамика изменений показателей углового теста у лабораторных крыс в эксперименте

Таким образом, у животных до эксперимента соотношение поворотов «влево/вправо» составляло 0,67 (с преобладанием правой стороны). Этот показатель отличался от ожидаемых 1,0, вероятно, вследствие возрастных особенностей нашей выборки. После ложной операции показатель углового теста составляет 2,33 (1 и 7 сутки) с падением до 0,43 в середине эксперимента (3 сутки). Т.е., животные стараются чаще поворачивать голову в ту сторону, где отсутствуют послеоперационные швы. Это может быть связано с целым рядом факторов, поскольку угловой тест демонстрирует не только зрительную асимметрию, но и нарушение симметричности движений лап и проблемы с поддержанием статического и динамического равновесия [420]. Крысы с моделью ишемии в первые сутки демонстрируют равное соотношение поворотов влево и вправо – в сравнении с нормой это можно рассматривать как увеличение числа поворотов влево – на неповрежденную сторону. Тем не менее, начиная с третьих суток правые повороты начинают преобладать, что можно объяснить действием компенсаторных механизмов, направленных против последствий транзиторной ишемии. У животных на фоне приема синтетического аналога T0AM на первые и

седьмые сутки показатель углового теста не отличался от нормы. Как и у животных других экспериментальных групп, на третьи сутки было отмечено резко выраженное смещение количества поворотов вправо, наиболее ярко выраженное именно в данной группе. Таким образом, хотя данные углового теста оказались неоднозначными, именно в группе крыс, получавших терапию аналогом тиронамина, соотношение поворотов влево и вправо было наиболее приближено к нормальным для данной выборки значениям.

Тест в Т-лабиринте проводился в трех повторах. Было замечено, что с каждым повтором время прохождения установки увеличивалось, что мы связываем с повышенной утомляемостью крыс старшей возрастной категории, с которой мы работали. Поэтому было принято решение использовать только результаты первого успешного прохождения Т-лабиринта. Данные представлены в таблице 5.7 и отражены на рисунке 5.9. Число представляет собой количество секунд, затраченных на выполнения задания крысой, а знак показывает, правильным («+») или ошибочным («-») было решение, принятое животным.

Таблица 5.7 – Показатели прохождения Т-лабиринта экспериментальными животными на 7 сутки

Группы животных	N	Sham	Control	T0AM
Время, сек.	29 (LQ=14, UQ=87)	158 (LQ=79, UQ=438)	104 (LQ=88, UQ=295)	12 (LQ=6, UQ=16)

До операции животные успешно справлялись с прохождением Т-лабиринта за 29 сек. После ложной операции время прохождения возросло до 158 сек., а число ошибок стало преобладать над правильными решениями. У крыс контрольной группы правильных решений было больше, чем ошибок, но время прохождения задания у них также увеличилось – до 104 сек. Напротив, терапия СА-T0AM

привела к тому, что правильные решения крысами принимались за 12 сек., что однозначно указывает на улучшение когнитивных способностей под влиянием синтетического аналога тиронамина, даже в сравнении с предоперационными показателями.

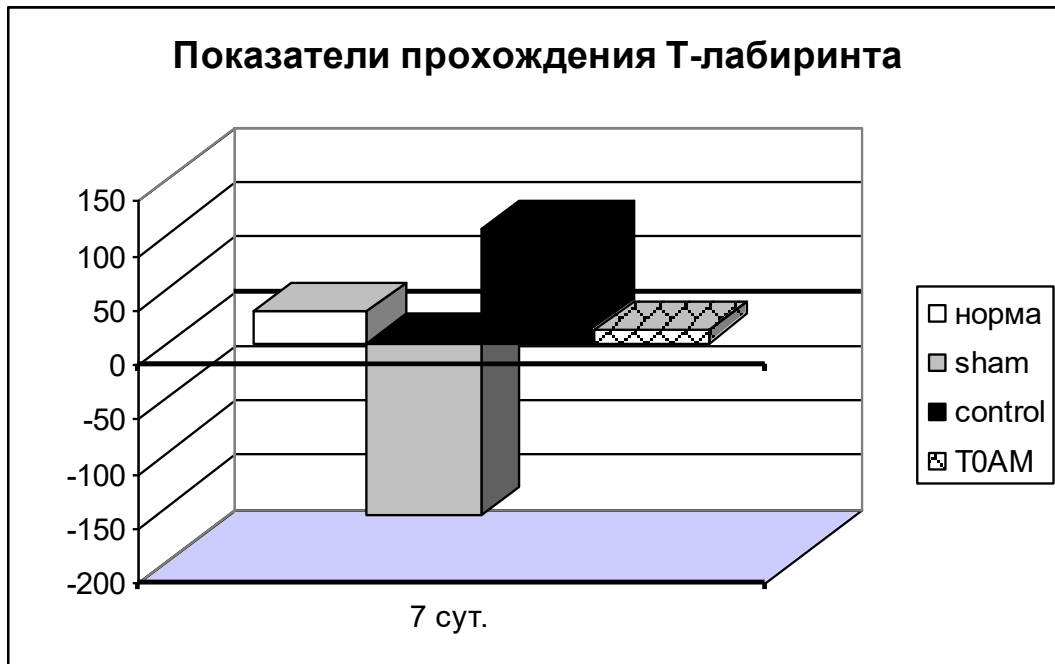


Рисунок 5.9 – Результаты прохождения Т-лабиринта лабораторными животными в модели острой полушарной ишемии головного мозга

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что терапия аналогом T0AM приводит к улучшению показателей рабочей памяти и обучаемости, поскольку животные лучше ориентировались в установке и эффективнее использовали воспоминания о негативном опыте, полученным на этапе «Обучение», когда их запирали в одном из коротких рукавов Т-лабиринта.

5.4. Анализ активности антиоксидантных систем в ткани головного мозга в модели ишемического инсульта

В ходе исследования базисный метод оценки активности антиоксидантных систем в ткани головного мозга лабораторных животных в модели острой церебральной ишемии был представлен определением накопления продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты, ТБК-АП). Антиоксидантную защиту оценивали по активности супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО). Результаты представлены в таблице 5.8 и на рисунке 5.10.

Таблица 5.8 – Активность маркеров окислительного стресса в головном мозге в исследуемых группах животных

Группы	Контроль		Эксперимент		p
	N	Медиана	N	Медиана	
СОД, Ед., интактное полушарие	6	60	6	63	0,75
СОД, Ед., ишемизированное полушарие	8	59	8	72.5	0,042
ГПО, мкмоль/мин.*мг, интактное полушарие	16	278.5	18	693	0.004
ГПО, мкмоль/мин.*мг, ишемизированное полушарие	16	304	18	805	0.021
ТБК-АП, мкмоль, интактное полушарие	10	0.44	10	1.5	<0,001
ТБК-АП, мкмоль, ишемизированное полушарие	10	0.7	10	0.34	0,022

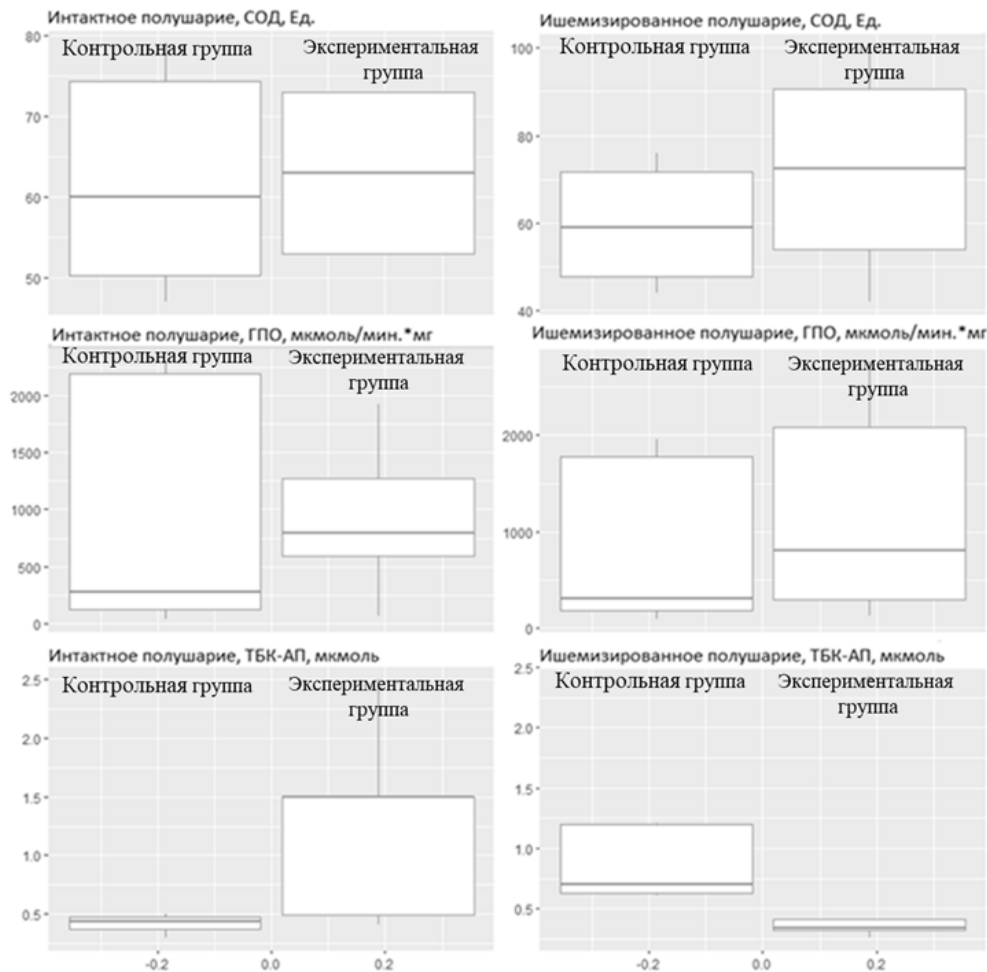


Рисунок 5.10 – Активность маркеров окислительного стресса в головном мозге в исследуемых группах животных

При сравнении интактного и экспериментального полушарий головного мозга крыс после правосторонней перевязки общей сонной артерии была выявлена тенденция к накоплению ТБК-АП в ишемизированном полушарии у всех 10 животных. После введения синтетического аналога тиронамина количество ТБК-АП в гомогенатах мозга значительно возросло только у 3 животных в интактном полушарии, однако оставалось примерно на том же уровне, какой был до введения препарата у 8 крыс в ишемизированном полушарии, тогда как у одного животного наблюдалось выраженное повышение.

При сравнении активности ГПО в интактном и экспериментальном полушариях после правосторонней перевязки общей сонной артерии была обнаружена тенденция к увеличению активности фермента у 8 крыс из 10 в

исследуемой группе. Введение синтетического аналога тиронамина стимулировало возрастание активности ГПО более чем в два раза у 8 животных, тогда, как у 2-х ГПО оставалось на том же уровне, что и до получения препарата в гомогенатах интактного полушария. В гомогенатах ишемизированного полушария активность ГПО увеличивалась в 1,5 раза после введения аналога также у 8 крыс, тогда, как у 2-х выраженных изменений не наблюдалось.

Установлено, что введение синтетического аналога тиронамина препятствовало снижению активности СОД и накоплению ТБК-активных продуктов в ишемизированном полушарии, при этом способствовало невыраженному повышению ТБК-активных продуктов в неишемизированном полушарии. Данный факт свидетельствует о дифференцированном действии тиронаминов в условиях окислительного стресса.

Основным продуктом, который реагирует с тиобарбитуровой кислотой, является малоновый диальдегид (МДА). МДА образуется в результате как ферментативного, так и неферментативного свободнорадикального окисления (СРО) арахидоновой и других полиненасыщенных высших жирных кислот (ПНЖК).

Следовательно, увеличение количества ТБК-АП, которое наблюдалось в гомогенатах полушарий крыс, свидетельствует об активации процессов СРО при ишемии, и после введения аналога тиронамина. При неферментативном СРО происходит образование липидных гидроперекисей, а под действием циклооксигеназы арахидоновая кислота продуцирует простагландины, простациклины и тромбоксаны, однако, в результате цепных реакций в клетках накапливается вторичный продукт ПОЛ – МДА. МДА является стабильным и токсичным продуктом СРО. Повышение уровня МДА, основного компонента ТБК-активных продуктов приводит к нарушению проницаемости и последующему разрушению клеточных мембран, выходу лизосомальных ферментов и активации процессов лизиса клеточных структур.

СОД относится к основным ферментам антиоксидантной защиты. Супероксиддисмутаза катализирует реакцию нейтрализации супероксидного

анион-радикала, в результате чего образуется вода и перекись водорода в митохондриях и цитозоле. H_2O_2 также относится к активным формам кислорода, однако обладает гораздо меньшей реакционной способностью, и, в первую очередь, выполняет сигнальную функцию.

Незначительная активация СОД в гомогенатах экспериментального полушария после операции окклюзии является характерной для ишемизированных тканей и свидетельствует об адаптивной перестройке процессов АОЗ в ответ на нарушение поступления кислорода в клетки.

Влияние тиронамина на активность фермента в мозге является мало изученным и требует дальнейшего исследования. Активация процессов свободно радикального окисления, увеличение количества АФК, о чем косвенно свидетельствует повышение уровня ТБК-АП и активности СОД в нашем эксперименте, включает процессы редокс-сигнализации. Считается, что система Nrf2-Keap1-ARE является основной ответственной за включение адаптивных механизмов в клетках в условиях окислительного стресса.

Фактор Nrf2 в ядре клеток связывается с антиоксидантным элементом (antioxidant response element, ARE), расположенным в промоторном участке целого ряда генов [9; 171; 233; 251]. Таким образом включается активация транскрипции генов, кодирующих ферменты синтеза и обмена глутатиона (глутамат-цистеин-лигаза, глутатион-S-трансфераза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза) и других ферментов АОЗ (супероксиддисмутаза, каталаза).

Увеличение активности ГПО в ответ на возрастание уровня ТБК-АП в гомогенатах ишемизированного полушария до введения синтетического аналога тиронамина, и, особенно, после введения, может быть вызвано активацией системы редокс-сигналирования Nrf2-Keap1-ARE [233].

Основной функцией ГПО является восстановление гидроперекисей липидов до спиртов с выделением молекулы воды с одновременным окислением восстановленного глутатиона. Следовательно, активность фермента непосредственно зависит от внутриклеточного пула восстановленного глутатиона в клетках.

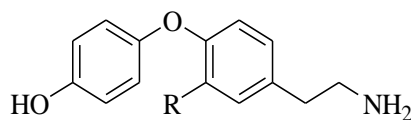
5.5. Разработка водорастворимых форм синтетических аналогов тиронамина

Поскольку терапевтическое использование эндогенных тиронаминов (рисунок 5.11, структура 1) ограничено вследствие их быстрого метаболизма при взаимодействии с аминоксидазами, дейодиназами, сульфотрансферазами [102], были предложены их синтетические аналоги [82; 301; 318; 404], полученные путем модификации ядра тиронамина (рисунок 5.11, структура 2). При этом соединение 2 обнаружило биологическую активность, сравнимую с эндогенными тиронаминами 1 [301]. Дальнейшая модификация соединения 2 с целью введения в структуру дополнительных центров связывания с рецептором путем замены этиламинового фрагмента на карбоксильную группу привело к получению соединения 3.

Учитывая, что боковой этиламиновый фрагмент этих веществ подвержен быстрой реакции с аминоксидазами, была осуществлена структурная модификация соединения 2-а, которая состояла в замене этиламинового фрагмента на амидный, в результате чего получили соединение 4. Амидная группа, выступая в качестве акцептора водородных связей, используется для модификации и функционализации органических соединений с целью обеспечения дополнительных центров связывания с рецептором. Для повышения растворимости соединение 4 перевели в гидрохлорид и использовали для дальнейших исследований.

Идентификация исследуемого соединения 4(2-[4-(4-аминобензил)фенокси]ацетамид) в виде гидрохлорида и определение его чистоты (спектроскопически чистый) выполнено методом ЯМР ^1H спектроскопии. Спектры ЯМР ^1H записывали в дейтерированном диметилсульфоксиде на приборе Bruker Avance II 400 (400 МГц), внутренний стандарт – тетраметилсилан. В ЯМР ^1H спектре гидрохлорида 2-[4-(4-аминобензил)фенокси]ацетамида (далее – СА-Т $^{\text{H}_2\text{O}}$) отсутствовали сигналы исходных реагентов и промежуточных продуктов, образующихся в процессе синтеза, что указывает на отсутствие их следовых

переносов в конечный продукт. Также отсутствуют сигналы для остаточных растворителей, используемых в процессе синтеза.

**1**

тиронамин T0AM: R=H;

T1AM R=I

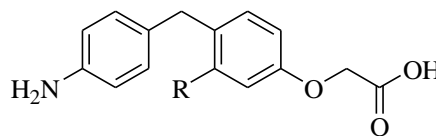
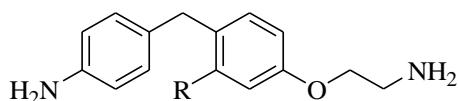
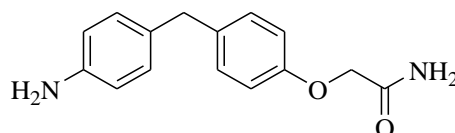
**3**CA-T0^{ppO}: a R=H; b R=CH₃**2**CA-T0: a R=H; b R=CH₃**4**CA-T0^{H2O}: 2-[4-(4-аминобензил)фенокси]ацетамид

Рисунок 5.11 – Структура эндогенных тиронаминов (1) и их синтетических структурных аналогов (2-4)

Исследование биологической активности проводилось на 16 самцах белых беспородных крыс, массой 200-250 г, которые содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Животных разделили на две группы по 8 животных: «Контроль» (внутрибрюшинное введение 1 мл воды для инъекций) и «Опыт» (внутрибрюшинное введение CA-T0^{H2O} в концентрации 50 мг/кг массы тела крысы, растворенного в 1 мл воды для инъекций). Статистически значимых отличий в характеристиках экспериментальных групп до начала опыта обнаружено не было. Ректальную температуру тела измеряли термометром цифровым TFA с внешним проводным датчиком. Замеры производились непосредственно перед инъекцией (базовая температура) и в течение 150 минут после инъекции с интервалами в 30 минут.

Базовая температура у крыс группы «Контроль» в начале эксперимента составила $38,15 \pm 0,30$ °С. После введения воды для инъекций температура тела животных достоверно не менялась в течение 120 мин. наблюдений, а затем измеряемый параметр начал расти, достигнув к 150 мин. наблюдений $39,35$ °С (прирост $+1,2$ °С, $p > 0,05$). Статистически значимых изменений температуры по сравнению с начальной не было на протяжении всего эксперимента.

У животных группы «Опыт», температура тела снизилась к 30 мин эксперимента с $37,43 \pm 1,3$ °С до $36,48 \pm 1,2$ °С (снижение на $0,95$ °С, $p = 0,06$). В течение всего наблюдения температура оставалась ниже начального уровня и только к 150 мин. поднялась до $37,58$ °С (прирост $+0,15$ °С, $p > 0,05$) (рис.2). В сравнении с группой «Контроль» у экспериментальных животных наблюдались статистически значимые различия в температурных показателях на 30 мин. ($p = 0,02$) и 60 мин. ($p = 0,03$) наблюдения.

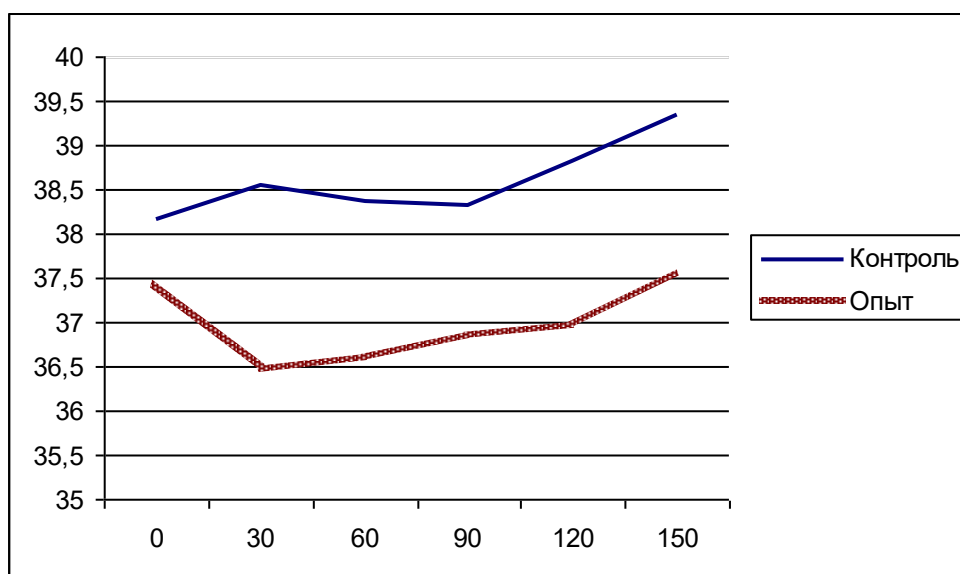


Рисунок 5.12 – Изменение ректальной температуры у белых беспородных крыс при внутрибрюшинном введении водорастворимой формы синтетического аналога тиронамина Т0АМ (СА-Т0^{H2O})

Анализ разницы в площадях под ROC-кривыми показал наличие статистически значимой разницы в средних значениях показателя AUC между группами «Контроль» и «Опыт» ($p \leq 0,05$), что объясняется скорее нарастанием температуры в контрольной группе к концу эксперимента (вызванное, вероятно,

незначительным стрессированием животных), чем гипотермическим эффектом СА-Т0^{H2O}. Метод серийных измерений показал отсутствие статистически значимых различий между исходным и минимальным достигнутым в эксперименте значением температуры в обеих выборках ($p=0,08$).

Также мы ретроспективно сравнили наши данные с результатами, полученными для аналогичной концентрации водонерастворимой формы синтетического аналога Т0АМ (СА-Т0) (рис. 5.16). Анализ площадей под ROC-кривыми, метод серийных измерений и U-критерий Манна-Уитни не выявили статистически значимой разницы между водорастворимой и водонерастворимой формами синтетического аналога Т0АМ, исследованных нами (табл.1). Однако обращает на себя внимание тот факт, что снижение температуры, которое мы наблюдали на 30 и 60 мин. опыта, для водорастворимого аналога оказалось заметно ниже, чем для водонерастворимого (в 1,8 и 2,1 раза соответственно). Также, в отличие от СА-Т0^{H2O}, введение водонерастворимой формы СА-Т0 привело к статистически значимому снижению базовой температуры у крыс. Таким образом, хотя водорастворимый аналог тиронамина и оказывает некоторый гипотермический эффект, он оказывается менее выраженным, чем при использовании водонерастворимой формы.

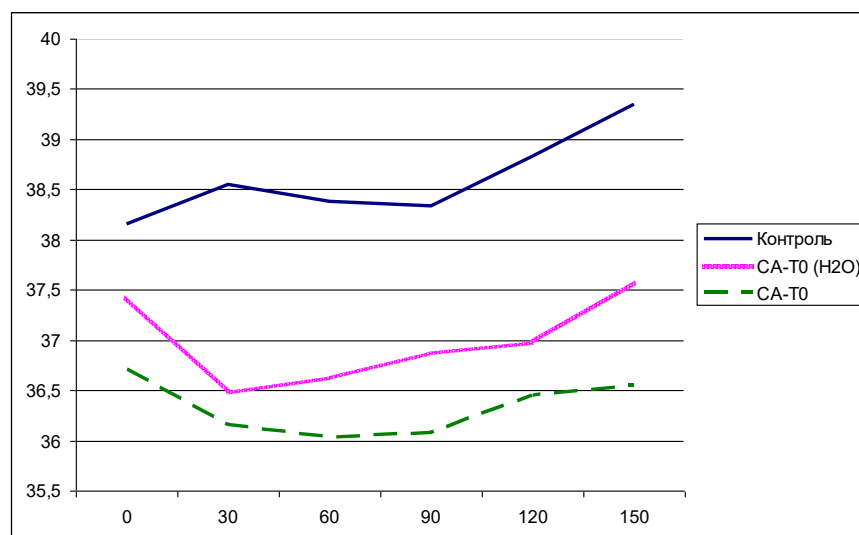


Рисунок 5.13 – Изменение ректальной температуры у белых беспородных крыс при внутрибрюшинном введении водорастворимой (СА-Т0^{H2O}) и водонерастворимой (СА-Т0) форм синтетического аналога тиронамина Т0АМ

Таблица 5.10 – Динамика температурных изменений в эксперименте по сравнению с исходным показателем

Время, мин	Группы сравнения			Уровень статистической значимости ΔT	
	Конт- роль	СА-Т0 ^{H2O} , 50 мг/кг	СА-Т0, 50 мг/кг	p (СА-Т0 ^{H2O} - СА-Т0)	p (СА-Т0 ^{H2O} – Контроль)
30	-0,40	0,95	1,75	0,13	0,02
60	-0,23	0,80	1,68	0,17	0,03
90	-0,18	0,55	1,60	0,20	0,25
120	-0,68	0,45	1,30	0,39	0,15
150	-1,20	-0,15	0,97	0,29	0,08
p (0 и 30 мин.)	0,07	0,07	0,03		
p (0 и 60 мин.)	0,36	0,07	0,03		
p (0 и 150 мин.)	0,07	1,00	0,17		
Примечание: Т0 – базовая температура, Тi – температура, измеренная соответственно на 30, 60, 90, 120 и 150 минутах эксперимента.					

Биогенные амины проявляют высокую биологическую активность во многих органах и тканях, выступая в роли гормонов и нейромедиаторов. Наряду с биогенными аминами важную роль в передаче сигналов для нейронов играют следовые амины. Физиологические эффекты тиронаминов, также относящихся к классу следовых аминов (терморегуляторные, кардиотропные, метаболические и др.), неоднократно описывались в многочисленных обзорах и исследованиях [57; 90; 123; 301; 304]. Большинство этих эффектов реализуется посредством связывания тиронаминов и других следовых аминов с TAAR-рецепторами. В настоящее время в научном мире активно ведется исследование данного семейства рецепторов, а также разработка синтетических аналогов их природных агонистов

[102]. С целью расширения доступного ряда структурных аналогов тиронаминов, в ГУ «Институт физико-органической химии и углехимии им. Л.М. Литвиненко» была получена водорастворимая форма T0AM. Однако замена этиламинового фрагмента на амидный привела к тому, что новый аналог (CA-T0^{H2O}) оказался веществом, относящимся к другому классу соединений – биогенным амидам.

ГЛАВА 6. МЕТА-АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОРРЕЛЯЦИЙ МЕЖДУ ТИРЕОИДНЫМ СТАТУСОМ, РИСКОМ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ ИСХОДОМ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В последнее десятилетие наблюдается увеличение числа научных исследований с использованием менделевской рандомизации (MR) – аналитического вычислительного метода, основанного на использовании генетических вариантов как инструментальных переменных для определения того, зависит ли исход заболевания от конкретных факторов (например, способа лечения, метаболических или биохимических характеристик организма и т.д.).

В MR-исследованиях генетические варианты используют для того, чтобы обнаружить, согласуется ли наблюдаемая ассоциация между фактором риска и исходом с причинным эффектом (показателем силы взаимосвязи между генетическими вариантами и фенотипической изменчивостью). Феномен этот основан на естественном расхождении генов при мейозе, которое обеспечивает случайное распределение генетических вариантов в популяции. Одни индивидуумы от рождения наследуют генетический вариант, влияющий на фактор риска, другие – нет. Поскольку эти генетические варианты, как правило, не связаны с искажающими факторами, различия в исходе заболевания между носителями этого варианта и теми, у кого его нет, можно отнести к разнице во влиянии самого фактора риска [269].

6.1. Анализ причинно-следственной связи между уровнем свободного трийодтиронина и риском неблагоприятного исхода инсульта

В качестве инструментальных переменных, генетически предсказывающих уровень св. Т3, использовались 14 независимых однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), которые были извлечены из 2 GWAS-исследований в когортах Split и Corsula (Хорватия) и представлены в таблице 6.1 [181; 186].

Однонуклеотидные вариации, связанные с неблагоприятным функциональным исходом ишемического инсульта (3-6 баллов по шкале mRS через 90 дней после развития инсульта), были извлечены из базы данных GISCOME (Genetics of Ischaemic Stroke Functional Outcome network), содержащей данные 12 полногеномных исследований, проведенных Международным консорциумом генетики инсульта (International Stroke Genetics Consortium) и инициативой Stroke Genetics Network Национального института неврологических заболеваний (США). GISCOME включает данные о генотипе и исходе ишемического инсульта 8831 пациента, которые используются для изучения взаимосвязи ними [189].

В качестве переменной, отражающей функциональный исход ишемического инсульта в GISCOME, использовали модифицированную шкалу Рэнкина (mRS). Благоприятный исход после инсульта по данной шкале определялся как 0-2 балла, а неблагоприятный исход – как 3-6 баллов. Это позволяет использовать обычную статистику, такую как бинарная логистическая регрессия, где результаты интуитивно представлены в виде отношения шансов, представляющего риск хорошего или плохого исхода. Важным является, что в ходе исследования были использованы инструменты, ассоциированные с функциональным исходом, стратифицированные по тяжести изначального неврологического дефицита.

Таблица 6.1 – Одиночные нуклеотидные последовательности, ассоциированные с уровнем свободного трийодтиронина

SNP	Хр	Ближайший ген	EA	OA	FREQ1	BETA	SE	P-value
rs67142165	1	EPHB2	T	C	0.13	0.34	0.06	9.27e-9
rs13428799	2	ERBB4	G	C	0.09	0.34	0.07	2.69e-7
rs72752186	15	AGBL1	T	G	0.19	-0.22	0.04	7.22e-7

Продолжение таблицы 6.1

rs4712793	6		G	A	0.44	0.23	0.04	6.09e-8
rs116951285	11		C	T	0.03	-1.17	0.22	6.25e-08
rs10192064	2		C	T	0.35	-0.31	0.06	2.65e-07
rs145757720	7	DPP6	T	C	0.446	0.22	0.04	1.21E-6
rs1950580	14	LOC101 927081	G	A	0.041	0.71	0.15	1.63E-6
rs110362831	11	LRRC4C	A	G	0.336	-0.29	0.06	1.69E-6
rs4860544	4		T	C	0.327	0.29	0.06	1.92E-6
rs149325385	1	NEGR1	A	G	0.016	1.21	0.25	1.92E-6
rs12448370	16	XYLT1	A	G	0.399	0.30	0.06	2.56E-6
rs4807438	19	CELF5	A	G	0.155	-0.46	0.10	3.30E-6
rs2720957	3	XXYLT1	C	G	0.148	-0.44	0.09	3.65E-6
Примечание: SNP - однонуклеотидный полиморфизм; EA - эффективный аллель (кодирующий аллель); OA - Неэффективный аллель (некодирующий аллель); FREQ1 - частота эффективного аллеля; BETA - общая расчетная величина эффекта для эффективного аллеля; SE — общая стандартная ошибка оценки величины эффекта; P-value - P-значения мета-анализа с использованием коэффициентов регрессии, Xp – хромосома.								

Связь выбранных в качестве инструментальных переменных однонуклеотидных вариаций с промежуточными фенотипами, способными повлиять на тяжесть инсульта была исследована в системе Phenoscaner v2 [315]. Включение подобных инструментов в исследование привело бы к нарушению требований к менделевской рандомизации. Нами не были обнаружены данные о влиянии выбранных инструментов на промежуточные фенотипы, достоверно связанные с неблагоприятным исходом инсульта.

Тест на нарушение равновесия сцепления Хайди-Вайберга проводился с использованием базы данных 1000Genomes [44]. Для выявления сцепленных между собой SNP была построена матрица сцепления, графическое отображение которой представлено на рисунке 6.1. В ходе выравнивания матрицы сцепления из

перечня однонуклеотидных вариаций, генетически прогнозирующих уровень св. ТЗ были удалены 5 SNP ($R^2 > 0,2$ для нарушения сцепления).

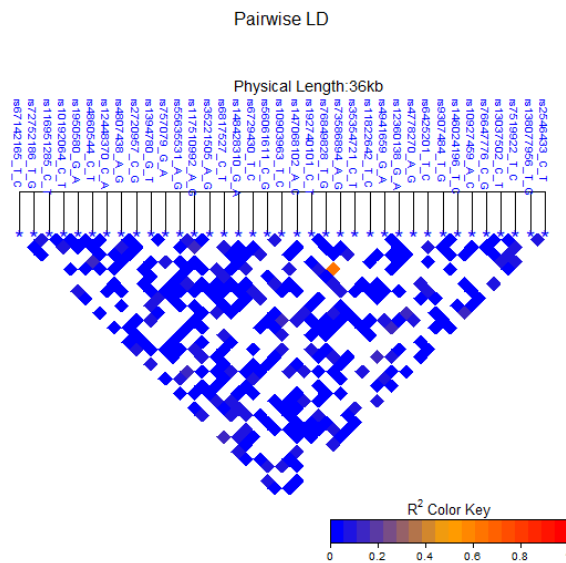


Рисунок 6.1 – Матрица нарушения равновесия сцепления однонуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с уровнем свободного трийодтиронина

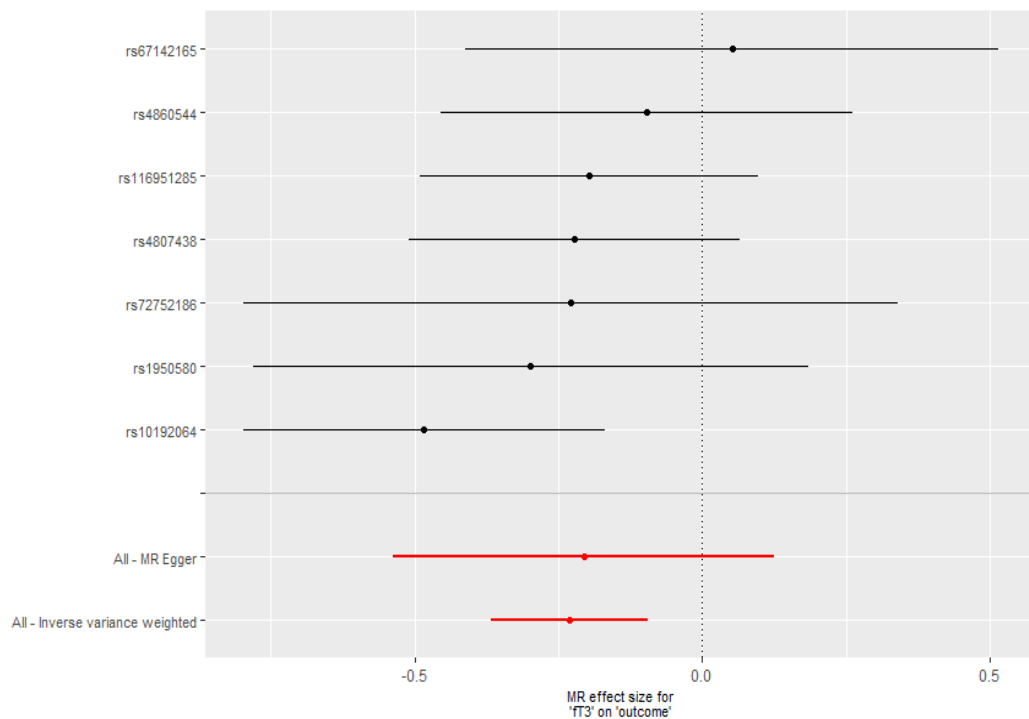


Рисунок 6.2 – Форест-график выбранных SNP, ассоциированных с уровнем свободного трийодтиронина и риском неблагоприятного функционального исхода ишемического инсульта

В ходе проведения менделевской рандомизации из 14 однонуклеотидных полиморфизмов, связанных с уровнем св. ТЗ, доступными для анализа оказались 7, так как остальные отсутствовали в базе GISCOME (рисунок 6.2).

Генетически прогнозируемое повышение уровня свТЗ было статистически значимо отрицательно связано с риском неблагоприятного функционального исхода ишемического инсульта при анализе с использованием модели линейной регрессии, взвешенной по обратным дисперсиям ($p = 0.0009377$, $b = -0.2303347$) (рис. 6.2, таблица 6.2). Результаты были сходными при анализе чувствительности, основанном на методе взвешенной медианы ($p = 0.0244777$, $b = -0.2120647$).

Таблица 6.2 – Менделевский рандомизационный анализ влияния генетически детерминированной концентрации свободного ТЗ на риск неблагоприятного функционального исхода инсульта

Метод	Количество SNP	b	se	pval
Эггеровская регрессия	7	-0.2060371	0.1693	0.2780259
Взвешенная медиана	7	-0.2120647	0.0942	0.0244777
Обратная взвешенная дисперсия	7	-0.2303347	0.0696	0.0009377
Простой режим	7	-0.2220840	0.1343	0.1494526
Взвешенный режим	7	-0.2091115	0.1247	0.1446614

Примечание: b – величина эффекта; se - общая стандартная ошибка оценки величины эффекта; pval - p-значение метаанализа с использованием коэффициентов регрессии

Для визуализации величины эффекта, рассчитанного с применением различных методов менделевского рандомизационного анализа, была построена диаграмма рассеяния (рисунок 6.3). Каждый из SNP, связанных с уровнями свТЗ, представлен черной точкой с полосами погрешности, которые изображают стандартную ошибку его связи с уровнем св. ТЗ (по горизонтали) и тяжестью инсульта (по вертикали). Эффекты представлены в виде β . Наклон линий

представляет собой причинно-следственную связь, рассчитанную с использованием различных MR методов, и обеспечивает сравнение между различными методами MR.

Был выполнен исключаящий анализ, при котором MR выполняется несколько раз, при этом по очереди из анализа исключается по одному SNP (рисунок 6.4). Анализ позволяет определить, является ли один из SNP движущим фактором ассоциации. В исключаящем анализе с использованием модели линейной регрессии, взвешенной по обратным дисперсиям, все оценки β были одинаковыми, что говорит в пользу того, что не один из SNP не является ведущим в возникновении наблюдаемого эффекта влияния концентрации свободного Т3 на функциональный исход ишемического инсульта.

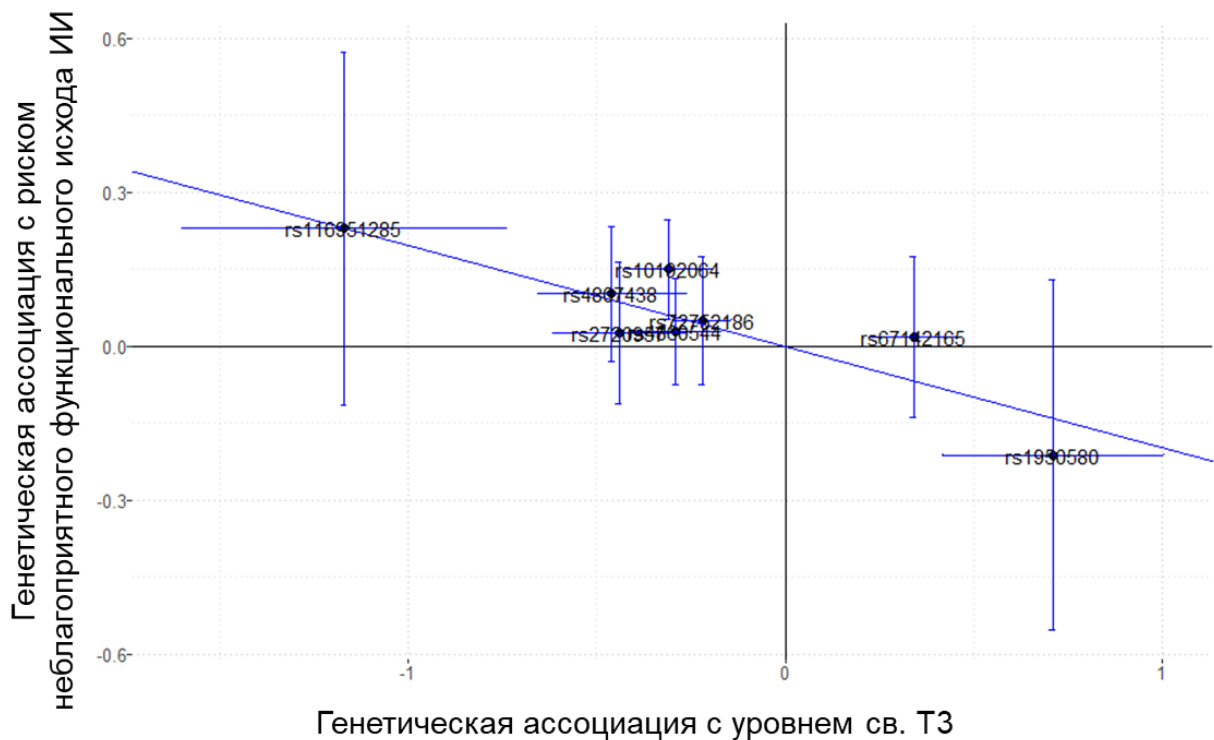


Рисунок 6.3 – Диаграмма рассеяния, показывающая взаимосвязь эффектов SNP на уровень свободного трийодтиронина с эффектами SNP, прогнозирующими неблагоприятный функциональный исход ишемического инсульта

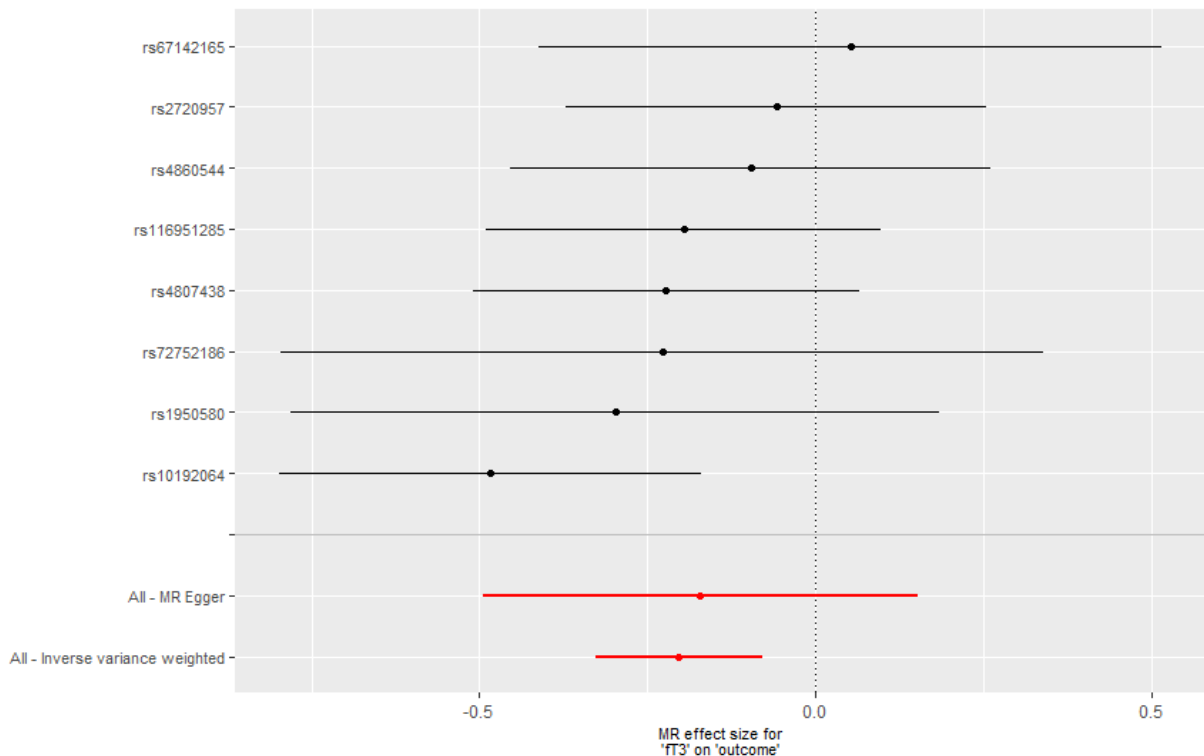


Рисунок 6.4 – Анализ чувствительности SNP, ассоциированных с уровнем свободного трийодтиронина методом исключения (с использованием модели линейной регрессии, взвешенной по обратным дисперсиям)

В ходе анализа не было выявлено признаков направленной плеiotропии ($p = 0,8810933$).

Также был проведен тест на гетерогенность, который в условиях менделевской рандомизации представляет собой статистическую оценку совместимости оценок инструментальных переменных, основанных на индивидуальных генетических вариантах. Использовалась Q-статистика Кокрана. Если Q намного больше степеней свободы (число инструментальных переменных минус 1), это свидетельствует о неоднородности и недействительных инструментах.

Для модели линейной регрессии, взвешенной по обратным дисперсиям, кокрановская статистика Q, равная 4,59, с соответствующим значением P, равным 0,59, не показала убедительных доказательств гетерогенности (таблица 6.3).

Таблица 6.3 – Тест на гетерогенность выбранных инструментальных переменных

Метод	Q	Q_df	Q_pval
Эггеровская регрессия	4.565346	5	0.4711882
Обратная взвешенная дисперсия	4.590119	6	0.5973494
Примечание: Q – Q критерий Кохрена, Q_df – число степеней свободы, Q_pval – коэффициент значимости для критерия Кохрена.			

Таким образом, результаты проведенного исследования методом менделевской рандомизации демонстрируют причинно-следственную связь между уровнем свободного трийодтиронина и функциональным исходом ишемического инсульта. Отношение шансов составляет 0.816 (95% ДИ 0.72-0.9250). Каждое генетически прогнозируемое повышение уровня св. Т3 на 1 пмоль/л ассоциировано со снижением риска неблагоприятного функционального исхода ишемического инсульта на 18%.

6.2. Анализ взаимосвязи промежуточных фенотипов, ассоциированных с апоптозом, с тиреоидным статусом и функциональным исходом ишемического инсульта

Учитывая данные многочисленных фундаментальных исследований о способности трийодтиронина изменять активность про- и антиапоптогенных путей клеточного сигналирования, был проведено менделевское рандомизационное исследование для определения возможной причинно-следственной связи между уровнем свободного трийодтиронина и активностью протеинов сыворотки, ассоциированных с процессами клеточного апоптоза.

Однонуклеотидные вариации, ассоциированные с гипотиреозом, были извлечены из базы UKBiobank при помощи системы OpenGWAS, разработанной в отделен интегративной эпидемиологии Бристольского университета [372]. Инструменты (однонуклеотидные вариации), ассоциированные с циркулирующими белками системы апоптоза были извлечены при помощи

системы IUE OpenGWAS из проекта «Геномный атлас протеома плазмы», включающего данные 1927 генетических ассоциаций с 1478 белками плазмы [187]. Был произведен поиск исследований инструментов, ассоциированных с апоптозом, по ключевым словам, «apoptosis», «MAPK», «BCL», «apoptotic protein». По результатам поиска из проекта «Геномный атлас протеома плазмы» были извлечены однонуклеотидные полиморфизмы, генетически прогнозирующие содержание в плазме следующих белков: MAPK2, Bcl-2, MAPK5, Apoptosis regulator Bcl-2, p53 и DNA damage-regulated protein 1, Tumor protein p53-inducible protein 11, Bcl-2-like protein 1, Bcl2-associated agonist of cell death, Apoptotic protease-activating factor 1, Bcl-2-like protein 2, Apoptosis-inducing factor 1 (mitochondrial). Результаты менделевского рандомизационного исследования представлены в таблице 6.4.

Таблица 6.4 – Анализ влияния генетически прогнозируемого гипотиреоза на уровень проапоптогенных белков в сыворотке

Предиктор	Зависимый показатель	Метод МР	N	Beta	Se	p
Гипотиреоз/ микседема	MAPK5	Простой режим	36	10.48	4.31	0.02
Гипотиреоз	BCL-2- ассоциированный агонист (промоутер) клеточной смерти	Обратная взвешенная дисперсия	35	3.75	1.79	0.036
Гипотиреоз	Индущирующий апоптоз фактор I, митохондриальный	Взвешенная медиана	115	1.95	0.95	0.04
Примечание: Beta – величина эффекта; Se - общая стандартная ошибка оценки величины эффекта; p - p-значение метаанализа с использованием коэффициентов регрессии, N – количество SNP						

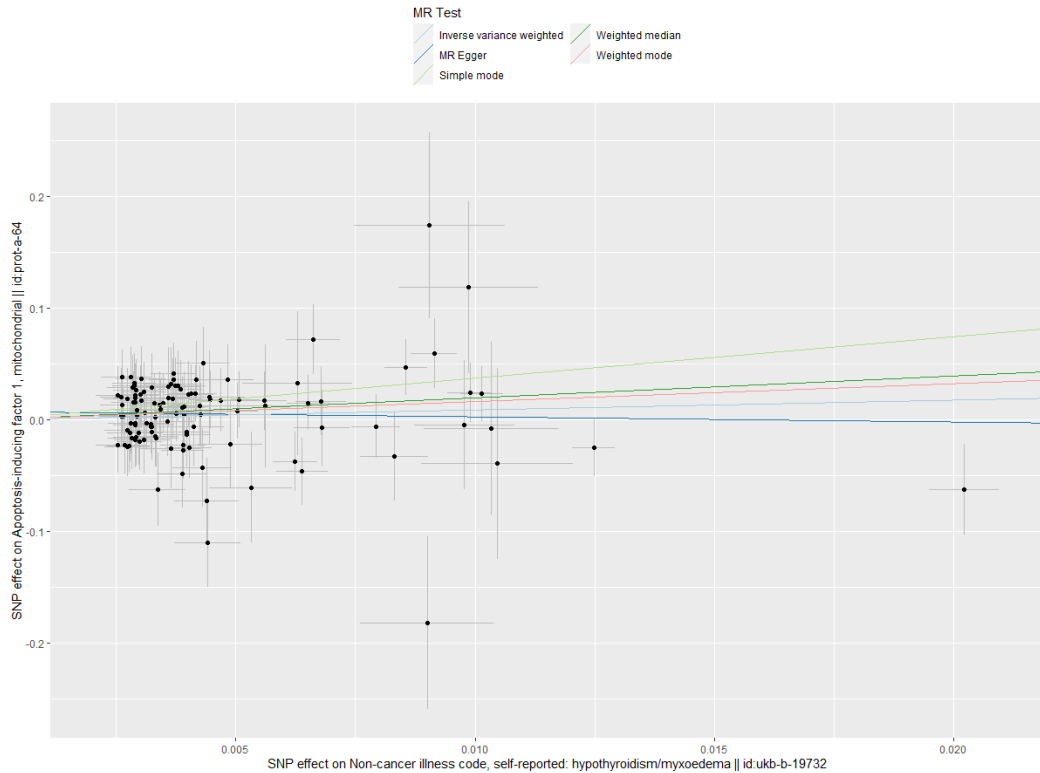


Рисунок 6.5 – Влияние генетически прогнозируемого риска гипотиреоза на содержание в сыворотке апоптоз-индуцирующего фактора-1

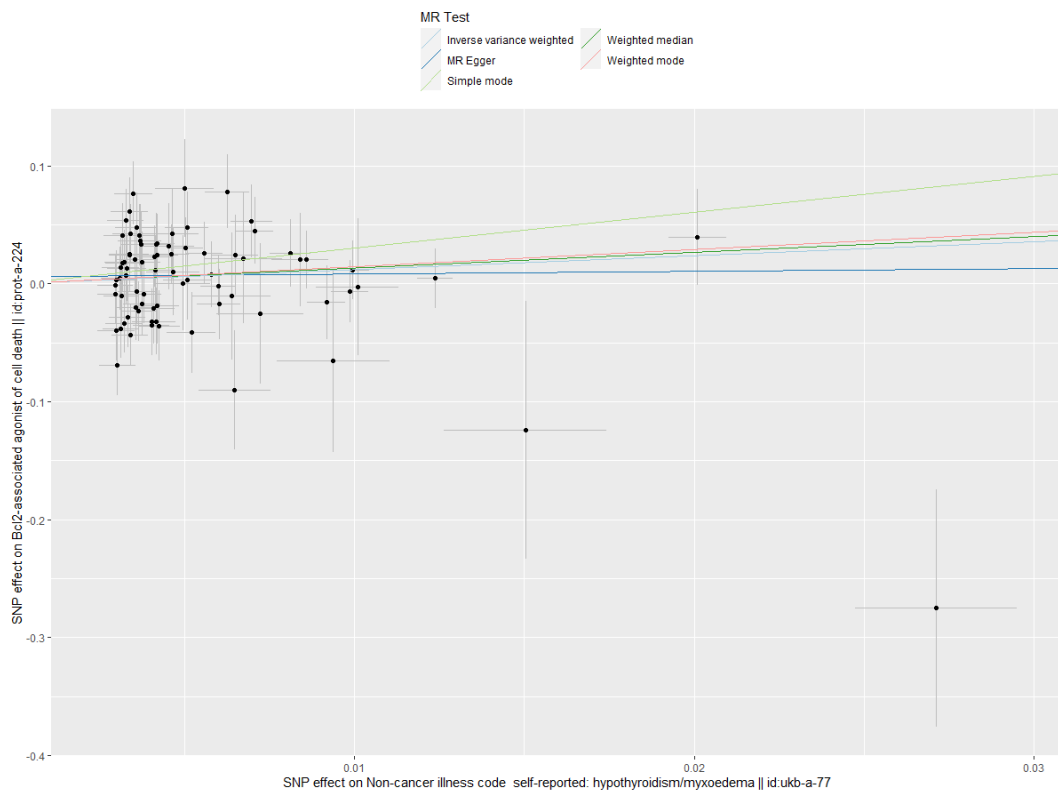


Рисунок 6.6 – Влияние генетически прогнозируемого риска гипотиреоза на содержание в сыворотке BCL-2 ассоциированного агониста клеточной смерти

Для определения влияния данных промежуточных фенотипов на риск неблагоприятного функционального исхода ишемического инсульта был проведен дальнейший анализ методом менделевской рандомизации. В качестве инструментальных переменных-предикторов были выбраны генетические вариации, ассоциированные с проапоптогенными белками, зависимость которых от гипотиреоза была идентифицирована ранее. Генетические полиморфизмы, ассоциированные с неблагоприятным функциональным исходом ишемического инсульта, были выбраны в качестве зависимых переменных. Результаты анализа представлены в таблице 6.5.

Таблица 6.5 – Влияние генетически прогнозируемых уровней проапоптогенных белков в сыворотке на риск неблагоприятного функционального исхода ишемического инсульта

Предиктор	Зависимый показатель	Метод МР	N	Beta	Se	p
MAPK5	mRs – 3-6 баллов	Обратная взвешенная дисперсия	74	0.063	0.121	0.6
BCL-2-ассоциированный агонист (промоутер) клеточной смерти	mRs – 3-6 баллов	Обратная взвешенная дисперсия	130	0.348	0.179	0.042
Фактор инициации апоптоза I (митохондриальный)	mRs – 3-6 баллов	Обратная взвешенная дисперсия	132	0.488	0.144	0.001

Как видно из таблицы 6.5, наиболее статистически значимым является влияние апоптоз индуцирующего фактора I (митохондриального) на риск неблагоприятного исхода инсульта. Полученные результаты позволяют

предположить, что активация фактора инициации апоптоза I (митохондриальный) (митохондриального) является одним из промежуточных звеньев реализации эффектов гипотиреоза на риск неблагоприятного исхода ишемического инсульта.

Апоптоз-индуцирующий фактор участвует в иницировании каспаза-независимого пути апоптоза (положительный внутренний регулятор апоптоза), вызывая фрагментацию ДНК и конденсацию хроматина [64]. Он также выступает в качестве NADH-оксидазы. Другая функция AIF - регуляция проницаемости митохондриальной мембраны при апоптозе. Обычно он находится за наружной мембраной митохондрий и, следовательно, изолирован от ядра. Однако, когда митохондрия повреждена, он перемещается в цитозоль и ядра. Инактивация AIF ведет к резистентности эмбриональных стволовых клеток к смерти после удаления факторов роста, что показывает, что он вовлечен в апоптоз [236]. Графическое изображение влияния уровня апоптоз-индуцирующего фактора на риск неблагоприятного исхода ишемического инсульта представлено на рисунке 6.7.

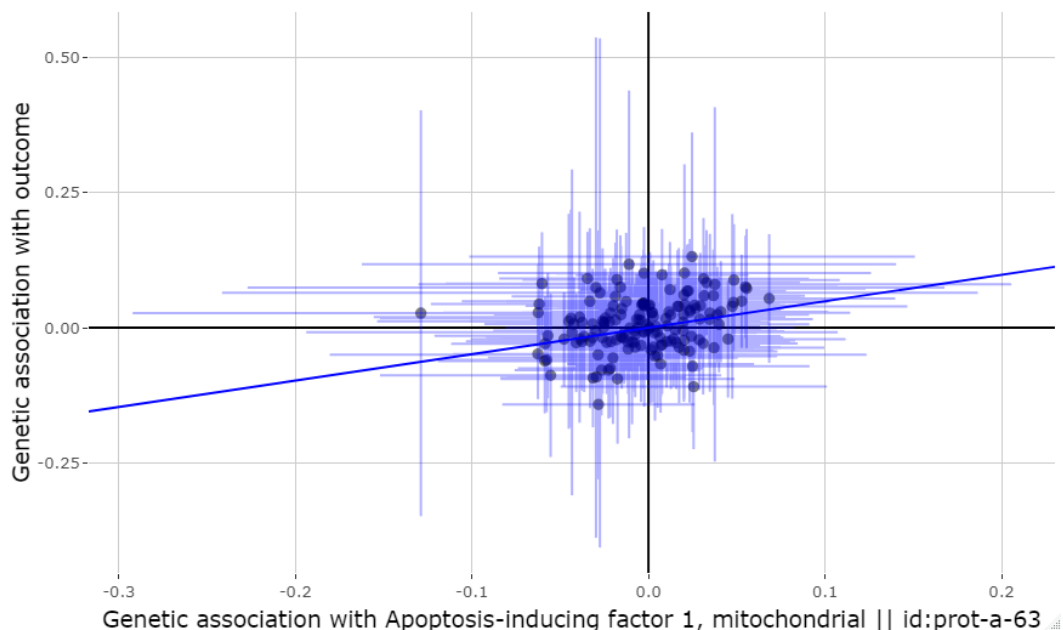


Рисунок 6.7 – Влияние генетически прогнозируемого уровня апоптоз-индуцирующего фактора-1 в сыворотке на риск неблагоприятного функционального исхода ишемического инсульта

Согласно данным опубликованных экспериментальных исследований, в дополнение к апоптозу, опосредованному цитохромом с/каспазой-3, появляется все больше доказательств, указывающих на важную роль независимых от каспазы путей запрограммированной гибели клеток [302]. Такой механизм включает группу проапоптотических белков, высвобождаемых через митохондриальные переходные поры, такие как фактор, индуцирующий апоптоз (AIF), эндонуклеаза G и белок, взаимодействующий с Bcl-2/аденовирусом E1B 19 кДа (BNIP3) [149]. Из этой группы белков AIF является более изученным. Имеются убедительные доказательства того, что AIF-индуцированные процессы гибели клеток не зависят от активности каспаз и, следовательно, могут служить альтернативным путем смерти после истощения клеточной энергии, что предотвращает активацию каспаз. Это подтверждается данными Daugas et al., которые продемонстрировали, что истощение АТФ действует как стимул для высвобождения AIF [282]. После высвобождения из митохондрий AIF перемещается в ядро и вызывает крупномасштабную фрагментацию ДНК и периферическую конденсацию ядерного хроматина, которая отличается от глобальной конденсации хроматина и фрагментации олигонуклеосомной ДНК при каспазозависимой гибели. Эти различия указывают на то, что AIF вызывает уникальный тип смерти через новый внутриклеточный путь. Вероятно, классификационное положение AIF находится на стыке апоптоза и некроптоза, а его роль особо подчеркивается при ишемическом инсульте [100]. Данный белковый фактор может представлять собой новую терапевтически молекулярную мишень для потенциальных нейропротекторов.

6.3. Взаимосвязь генетически прогнозируемого уровня селена и риска неблагоприятного исхода ишемического инсульта

В клинической части настоящего исследования было показано, что повышение уровня трийодтиронина ассоциировано с более благоприятным течением и исходом острого ишемического инсульта. При этом для тироксина

характерна тенденция к обратному эффекту. Выявленная ассоциация может быть обусловлена важной ролью активности периферической трансформации тироксина в трийодтиронин. Известно, что данная трансформация обеспечивается дейодиназами – селено-зависимыми ферментами, и нарушение их функции может быть одним из механизмов ассоциации гипотиреоза и цереброваскулярной патологии. Поскольку данные ферменты являются селенозависимыми нами было проведено исследование возможного влияния уровня селена на функциональный исход инсульта.

В ходе обсервационных исследований неоднократно сообщалось, что некоторые микроэлементы, особенно эссенциальные микроэлементы, связаны с риском ишемического инсульта [159; 196; 199]. Селен является одним из эссенциальных микроэлементов, участвующих в физиологических процессах, включая нейрональный метаболизм, антиоксидантную защиту, иммунный ответ [238]. Основными функциями селенопротеинов, основной функциональной формы селена, в нейрональных клетках являются модуляция нейрогенеза, регуляция Ca²⁺ каналов и поддержание окислительно-восстановительного баланса. Опубликованные исследования *in vitro* показывают, что селен стимулирует биогенез митохондрий и уменьшает объем инфаркта после фокальной ишемии головного мозга через механизм, зависящий от аутофагии [208; 225].

Данные обсервационных исследований показали, что уровень циркулирующего селена обратно коррелирует с некоторыми сердечно-сосудистыми исходами с возможной U-образной связью, а у пациентов с ишемическим инсультом было идентифицировано влияние на функциональный исход [208]. Однако результаты клинических испытаний были противоречивыми. В частности, результаты исследований Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT) и Nutritional Prevention of Cancer Trial (NPC) не выявили положительного влияния на заболеваемость и смертность от ишемической болезни сердца и инсульта [421]. Из-за обратной причинно-следственной связи связь между уровнем селена и риском ишемического инсульта может быть недооценена. Более того, остается неясным, оказывает ли селен влияние функциональные исходы

инсульта [225]. Учитывая большое количество кофакторов, потенциально влияющих на связь селена с исходом острого ишемического инсульта, одним из методов анализа может являться менделевская рандомизация.

В качестве инструментальных переменных, генетически предсказывающих уровень селена, использовались данные исследования, проведенного Cornelis et al. [185]. В данном исследовании был проведен мета-анализ концентрации селена в ногтях ног у 4162 мужчин и женщин, включенных в когорты четырех независимых популяционных исследований: Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA), Johnston County Osteoarthritis Project (JoCo), Nurses' Health Study (NHS) и Health Professionals Follow-up Study (HPFS). Несмотря на то, что содержание селена в плазме является валидированным биомаркером уровня селена в организме, концентрация селена в ногтях считается более точным маркером, отражающим долгосрочное насыщение селеном [185]. Выбранные однонуклеотидные вариации, генетически детерминирующие уровень селена, представлены в таблице 6.6.

Однонуклеотидные вариации, связанные с исходом ишемического инсульта, извлекали из базы данных GISCOME (Genetics of Ischaemic Stroke Functional Outcome network), содержащей данные 12 полногеномных исследований, проведенных Международным консорциумом генетики инсульта (International Stroke Genetics Consortium) и инициативой Stroke Genetics Network Национального института неврологических заболеваний (США). GISCOME включает данные о генотипе и исходе ишемического инсульта 8831 пациента [189].

Таблица 6.6 – Одиночные нуклеотидные последовательности, ассоциированные с уровнем селена [185]

Позиция	SNP	EA	NEA	EAF	Beta	Se	P-value	Ближайшие гены
82 993022	rs17498581	T	C	0.10	0.024	0.006	9.34e-6	LPHN2, TTLL7
241 584774	rs2802728	T	C	0.90	0.026	0.006	6.28e-6	SDCCAG8
143 476161	rs352889	A	G	0.39	0.016	0.004	4.16e-6	KYNU, ARHGAP15

2841906	rs7702905	A	G	0.28	-0.017	0.004	8.09e-6	IRX2, C5orf38
78 372 981	rs248381	A	G	0.50	-0.025	0.003	3.01e-13	DMGDH, ARSB, BHMT2
78 380 732	rs17823744	A	G	0.88	-0.045	0.005	9.91e-17	DMGDH, ARSB, BHMT2
78 447 080	rs7700970	T	C	0.30	0.030	0.004	2.21e-11	BHMT, BHMT2, JMY
78 452 172	rs567754	T	C	0.33	-0.018	0.004	4.80e-6	BHMT, BHMT2, JMY
78 780 798	rs6859667	T	C	0.96	-0.045	0.008	1.24e-7	HOMER1, JMY
79 178 950	rs10079417	T	C	0.23	0.018	0.004	6.10e-6	CMYA5,
133 474 474	rs756699	T	C	0.86	0.022	0.005	9.61e-6	VDAC1, TCF7
2101183	rs17685410	A	G	0.30	0.018	0.004	1.60e-6	MYOM2, CSMD1, KBTBD11, ARHGEF10
102 715 194	rs313426	A	G	0.31	-0.018	0.004	2.24e-6	DYNC2H1, DCUN1D5, PDGFD
52 561 533	rs1596370	A	G	0.21	-0.021	0.004	8.34e-7	CALCOCO1, HOXC13
103 169 535	rs7975161	T	C	0.16	-0.023	0.005	1.18e-6	TXNRD1, NFYB
21 225 855	rs6508367	T	C	0.96	-0.040	0.009	7.50e-6	ZNF521, SS18
19 690 101	rs2163813	T	G	0.74	-0.018	0.004	4.56e-6	ZNF14, ZNF101, ATP13A1

Примечание: SNP - однонуклеотидный полиморфизм; EA – эффективный аллель (кодирующий аллель); NEA – неэффективный аллель (некодирующий аллель); BETA - общая расчетная величина эффекта на уровень селена для эффективного аллеля; Se – общая стандартная ошибка оценки величины эффекта; P-value – P-значения мета-анализа с использованием коэффициентов регрессии.

Связь выбранных в качестве инструментальных переменных однонуклеотидных вариаций с промежуточными фенотипами, способными повлиять на тяжесть инсульта была исследована в системе Phenoscanner v2 [315]. Включение подобных инструментов в исследование привело бы к нарушению требований к менделевской рандомизации. Однонуклеотидная вариация rs756699, расположенная на 5 хромосоме в позиции 133446575, также была ассоциирована с гипотиреозом, однако, нами не были обнаружены данные о влиянии выбранных инструментов на промежуточные фенотипы, достоверно связанные с неблагоприятным исходом инсульта. Обращает на себя внимание, что однонуклеотидные вариации rs756699 и rs756699 также были ассоциированы с риском развития рассеянного склероза, но не ишемического инсульта, что не требовало исключения данных инструментов из анализа.

В ходе проведения менделевской рандомизации из 17 однонуклеотидных полиморфизмов, связанных с уровнем селена, доступными для анализа оказались 10, так как остальные отсутствовали в базе GISCOME (рисунок 6.6).

Генетически прогнозируемое повышение уровня селена было статистически значимо обратно связано с риском неблагоприятного исхода ишемического инсульта при анализе с использованием модели линейной регрессии, взвешенной по обратным дисперсиям ($p=0.033$, $b= -1.5989257$) Результаты представлены на рисунке 6.8 и в таблице 6.9.

Таблица 6.7 – Менделевский рандомизационный анализ влияния генетически прогнозируемой концентрации селена на риск неблагоприятного исхода ишемического инсульта

Метод	Количество SNP	b	se	pval
Эггеровская регрессия	10	-1.1236709	2.2469298	0.63047433
Взвешенная медиана	10	-1.1015003	0.9756749	0.25891369
Обратная взвешенная дисперсия	10	-1.5989257	0.7499759	0.03300935*

Простой режим	10	-0.3916476	1.5272771	0.80338039
Взвешенный режим	10	-0.7511795	1.3577126	0.59355485

Примечание: b – величина эффекта; se - общая стандартная ошибка оценки величины эффекта; $pval$ - p -значение метаанализа с использованием коэффициентов регрессии.

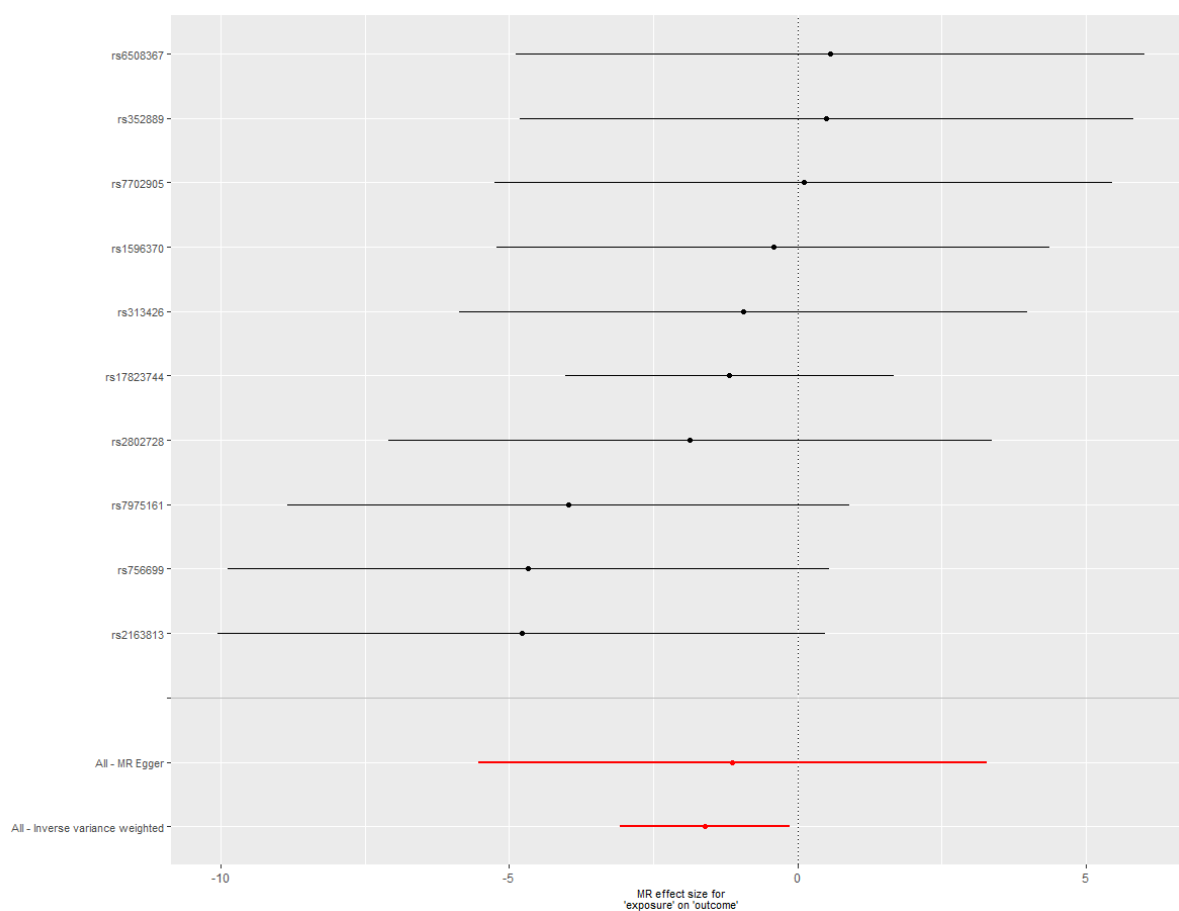


Рисунок 6.8 – Форест-график влияния на функциональный исход ишемического инсульта выбранных SNP, ассоциированных с уровнем селена

Для визуализации величины эффекта, рассчитанного с применением различных методов MR-анализа, была построена диаграмма рассеяния (рисунок 6.9). Каждый из SNP, связанных с уровнями селена представлен черной точкой с полосами погрешности, которые изображают стандартную ошибку его связи с уровнем селена (по горизонтали) и риском неблагоприятного исхода инсульта (по

вертикали). Наклон линий представляет собой причинно-следственную связь, рассчитанную с использованием различных MR методов

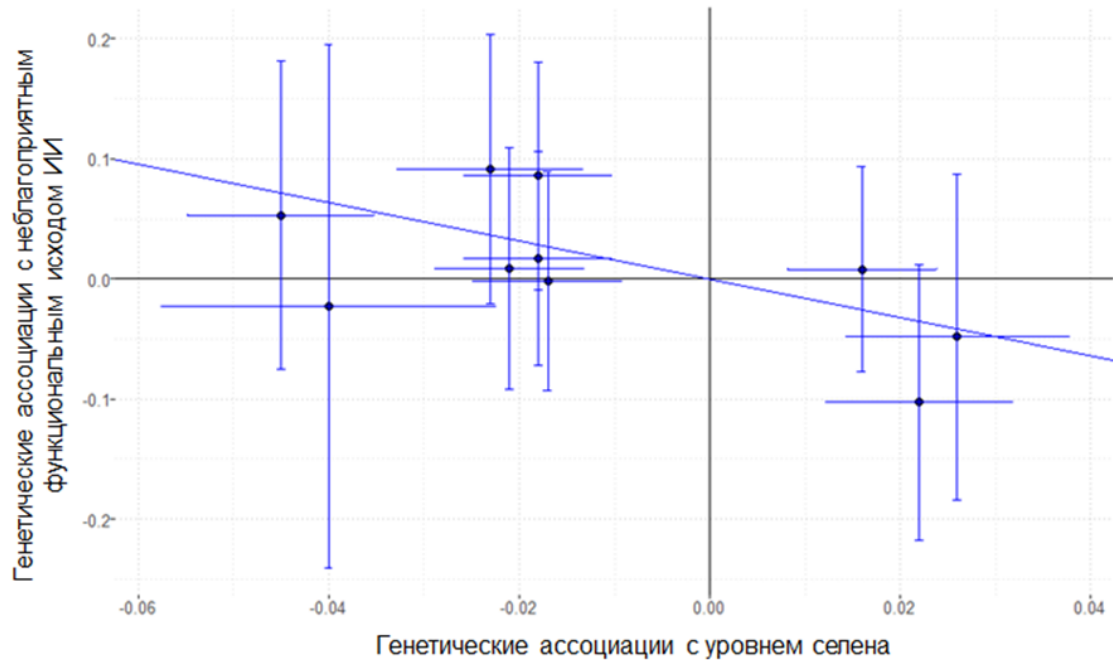


Рисунок 6.9 – Диаграмма рассеяния, демонстрирующая влияние эффектов SNP, ассоциированных с уровнем селена на эффекты SNP, ассоциированных с функциональным исходом ишемического инсульта

Был выполнен исключаящий анализ, при котором MR выполняется несколько раз, при этом по очереди из анализа исключается по одному SNP (рисунок 6.10). Анализ позволяет определить, является ли один из SNP движущим фактором ассоциации. В исключаящем анализе с использованием модели линейной регрессии, взвешенной по обратным дисперсиям, все оценки β были одинаковыми, что говорит в пользу того, что не один из SNP не является ведущим в возникновении наблюдаемого эффекта влияния концентрации селена на риск неблагоприятного исхода инсульта.

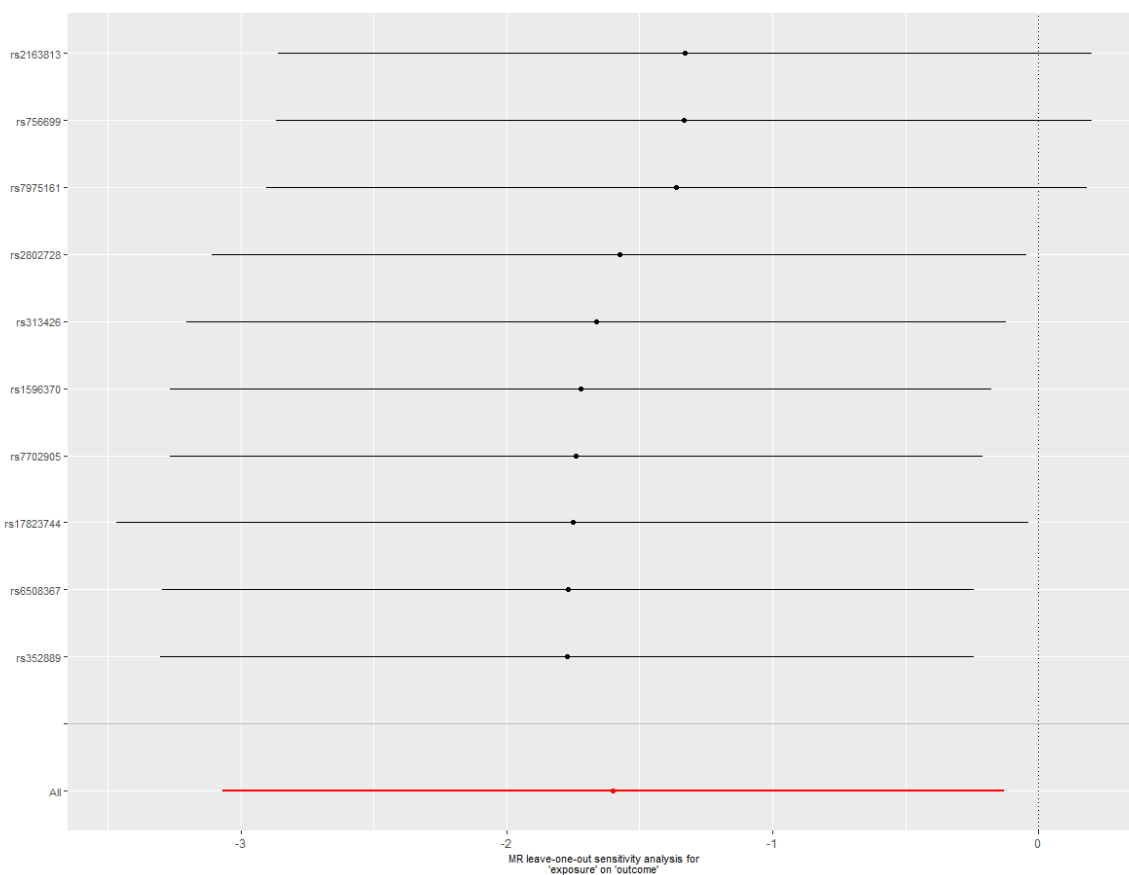


Рисунок 6.10 – Анализ чувствительности SNP, ассоциированных с уровнем селена методом исключения (с использованием модели линейной регрессии, взвешенной по обратным дисперсиям)

Тест на подверженность выявленной взаимосвязи плеiotропии не выявил статистически значимых признаков направленной плеiotропии ($p = 0,8810933$).

Также был проведен тест на гетерогенность, который в условиях менделевской рандомизации представляет собой статистическую оценку совместимости оценок инструментальных переменных, основанных на индивидуальных генетических вариантах. Использовалась Q-статистика Кокрана. Для модели линейной регрессии, взвешенной по обратным дисперсиям, кокрановская статистика Q, равная 4,54, с соответствующим значением P, равным 0,77, не показала убедительных доказательств гетерогенности.

Отношение шансов неблагоприятного исхода инсульта с каждым увеличением содержания селена на 1 мкг/г составляет 0,2 (95% ДИ 0,1-0,81).

Таким образом, результаты проведенного исследования методом менделевской рандомизации показали обратную связь между генетически детерминированным уровнем селена и риском неблагоприятного функционального исхода ишемического инсульта.

6.4. Анализ влияния экспрессии генов дейодиназ (DIO2) и рецепторов тиреоидных гормонов В (ThRB) на фенотипы, ассоциированные с апоптозом, риском и исходами ишемического инсульта

Ключевое влияние на активность тиреоидных гормонов оказывают ферменты дейодиназы. Дейодиназы йодтиронинов катализируют удаление остатка йода с внешнего или внутреннего кольца молекулы прогормона тироксина (Т4), продуцируя либо активную (Т3), либо неактивную (обратный Т3, оТ3) форму трийодтиронина. Дейодиназа 1-го типа (DIO1) катализирует обе эти реакции. Дейодиназа 2-го типа (DIO2) образует из Т4 активный Т3 внутри клетки, иницируя тем самым передачу гормонального сигнала на генетический аппарат клеток. В последнее время продемонстрирована возможная роль DIO1 в биосинтезе тиронаминов.

Инструменты (однонуклеотидные вариации), ассоциированные с экспрессией генов дейодиназ в головном мозге, были извлечены из базы данных проекта Genotype-Tissue Expression (GTEx). Проект включает в себя суммарные данные РНК-секвенирования 1641 образца из 43 различных тканей, полученных путем биопсии от 173 пациентов. Однонуклеотидные вариации, связанные с риском инсульта, полученные в ходе исследований консорциума MEGASTROKE были извлечены из крупнейшего каталога GWAS-исследований IEU OpenGWAS отдела интегративной эпидемиологии Бристольского университета отдельно для каждого подтипа ишемического инсульта (инсульт в бассейне крупной артерии: ebi-a-GCST005840, кардиоэмболический инсульт: ebi-a-GCST006910, лакунарный инсульт: ebi-a-GCST005841).

После исследования извлеченных инструментов на нарушение равновесия сцепления была отобрана одна независимая однонуклеотидная вариация (rs11625485, $r^2 < 0,001$), достигающая полногеномной значимости ($p < 10e^{-6}$) и связанная с экспрессией гена DIO2 в мозжечке. Анализ менделевской рандомизации продемонстрировал связь данной однонуклеотидной вариации с риском развития лакунарного ишемического инсульта ($\beta = -0.10752$, $p = 0.009936402$). Относительный риск развития лакунарного инсульта составил 0,89 (95% ДИ 0,82 – 0,97), при увеличении экспрессии DIO2 на 1 TMP (1 транскрипт на 1 миллион) риск развития лакунарного инсульта снижается на 11%. Полученные результаты коррелируют с другими исследованиями, в частности, J.H. Lee et al. в 2017 г. продемонстрирована связь экспрессии гена DIO2-AS1 (кодирующего антисмысловую РНК дейодиназы 2) и риска инсульта, связанного с болезнью мелких сосудов [43].

Кроме определения влияния гена, кодирующего дейодиназу-2 нами было проанализировано влияние экспрессии генов, кодирующих тиреоидные рецепторы в нервной системе, на уровне белков-маркеров апоптоза и доступные для анализа маркеры риска цереброваскулярных заболеваний. Учитывая преобладание во взрослом возрасте активности тиреоидных рецепторов-бета, нами были выбраны однонуклеотидные полиморфизмы, ассоциированные с экспрессией гена ThRB. Необходимые инструменты (однонуклеотидные вариации) были извлечены из базы данных проекта Genotype-Tissue Expression (GTEx). В ходе анализа методом менделевской рандомизации установлена причинно-следственная связь между экспрессией гена ThRB и уровнем BCL-2 протеина, митоген-ассоциированной протеинкиназы-2, а также с снижением риска кардиоэмболического и атеротромботического инсульта. Результаты исследования, включая размеры эффекта и стандартные ошибки, представлены в таблице 6.8.

Таблица 6.8 – Влияние генетически прогнозируемой экспрессии гена THRB на риск различных подтипов ишемического инсульта

Зависимый показатель	Предиктор	Метод	b	se	pval
Vcl-2	Экспрессия THRB (базальные ганглии)	Метод Вальда	0.63	0.24	0.009
МАРК2	Экспрессия THRB (базальные ганглии)	Метод Вальда	0.55	0.24	0.024
Риск неблагоприятного исхода ишемического инсульта	Экспрессия THRB (базальные ганглии)	Метод Вальда	-0.469	0.179	0.0088
Риск атеротромботического инсульта	Экспрессия THRB (гипофиз)	Метод Вальда	-0.123	0.06	0.0403
Риск кардиоэмболического инсульта	Экспрессия THRB (предсердие)	Метод Вальда	-0.104	0.05	0.042
Риск лакунарного инсульта	Экспрессия DIO2 (мозжечок)	Метод Вальда	-0.107	0.02	0.00994
Примечание: b – величина эффекта; se - общая стандартная ошибка оценки величины эффекта; pval - p-значение метаанализа с использованием коэффициентов регрессии.					

В ходе менделевского исследования удалось обнаружить статистически значимое влияние экспрессии THRB2 на функциональный исход инсульта. С увеличением экспрессии гена THRB2 (в базальных ганглиях) на 1 TPM риск развития неблагоприятного исхода ишемического инсульта уменьшается на 37% (ОШ = 0.626, 95% ДИ 0.44-0.8887, $p = 0,0088$). Однако, обнаружено статистическое влияние экспрессии гена THRB на уровень ряда белков плазмы, ассоциированных с регуляцией апоптоза. Следует отметить, что выявленные корреляции относятся к

факторам, оказывающим антиапоптогенное действие. BCL-2 является одним из главных белков системы клеточного сигналирования BCL и обладает выраженным антиапоптогенным действием. В экспериментальных исследованиях, проведенных Zhao et al. в 2003г., показано, что увеличение экспрессии Bcl-2 защищает от потери нейронов в пределах пенумбры в модели экспериментального инсульта, а также ингибирует транслокацию цитохрома c и активность каспазы-3 [75]. В дальнейшем было показано, что субстанции, усиливающие экспрессию BCL-2, такие как аликсирен и эллаговая кислота, обладают нейропротекторным действием при острой церебральной ишемии [148; 327].

Полученные данные анализа промежуточных фенотипов свидетельствуют о том, что одним из механизмов влияния тиреоидных гормонов на функциональных исход инсульта является способность ядерных рецепторов к тиреоидным гормонам осуществлять модуляцию апоптоза путем активации систем BCL-2 и MAPK.

6.5. Идентификация генов, регулируемых тиреоидными гормонами и влияющих на функциональных исход инсульта

Развитие новых технологий секвенирования генов позволило провести ряд крупномасштабных GWAS-исследований, идентифицировавших широкий спектр генов, ассоциированных с развитием ишемического инсульта. Вместе с тем, молекулярные механизмы реализации данных ассоциаций остаются неизученными. Накопленные в течение последних лет данные позволили разработать инновационный метод анализа ассоциаций между генотипом, экспрессией генов и различными фенотипами (риск или исход заболевания), основанный на исследовании локусов количественных признаков (QTL, quantitative trait loci). Широкое внедрение данных технологий привело к разработке новых статистических методов, интегрирующих результаты исследований в области протеома и транскриптома. Транскриптомные широкомасштабные ассоциативные исследования (TWAS) уже успешно применялись для анализа ассоциаций между

экспрессией генов и фенотипами, связанными с неврологическими заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера и рассеянный склероз. Интеграция данных GWAS с результатами данных QTL-исследований по экспрессии генов позволяет идентифицировать ведущие (приоритетные) гены и связанные с ними сигнальные пути, влияющие на риск и функциональный исход ишемического инсульта.

Для поиска генов, регулируемых тиреоидными гормонами и ассоциированными с функциональным исходом ишемического инсульта нами был использован метод обобщенной менделевской рандомизации (SMR, summary mendelian randomization). Аналитическая технология SMR, разработанная Zhu et al. в 2016 году, основана на определении ассоциаций между генетически обусловленными признаками, такими как экспрессия и метилирование генов, и интересующими фенотипами, такими как риск или исход заболеваний. В данном методе локусы количественных признаков представлены генетическими вариантами, которые связаны с уровнями экспрессии определенного транскрипта (eQTL) или метилирования ДНК (mQTL). Подобные локусы идентифицируются на основе измерения экспрессии генов, чаще всего с помощью секвенирования РНК, которые затем сопоставляются с данными генотипирования в GWAS-исследованиях.

Для исключения ложноположительных результатов, связанных с неравновесным сцеплением генов, нами был использован HEIDI-анализ, также разработанный Zhu et al. Данный тест позволяет различить эффекты, связанные с влиянием гена на множественные признаки (плейотропия) от эффектов, связанных с неравновесным сцеплением генов. Тест основан на имеющихся наблюдениях о том, что большая неоднородность величины эффекта, рассчитанного для всех статистически значимых локусов экспрессии генов (cis-eQTLs), предполагает большую вероятность того, что нарушение равновесия сцепления, а не причинно-следственная связь, объясняет влияние генов на фенотипические признаки.

В данном этапе исследования нами был использован массив однонуклеотидных вариантов, связанных с экспрессией генов (cis-eQTLs) в качестве предиктора и однонуклеотидные варианты, связанные с функциональным

исходом инсульта, в качестве зависимого показателя. Основу анализа составили данные cis-eQTL из консорциума BrainMeta (https://yanglab.westlake.edu.cn/data/SMR/BrainMeta_cis_eqtl_summary.tar.gz).

Набор содержит результаты сопоставления и мета-анализа локусов количественных признаков (связанных с экспрессией генов) с использованием данных РНК секвенирования 2,865 образцов коры головного мозга от 2,443 неродственных индивидуумов европейского происхождения с соответствующими однонуклеотидными вариантами по всему геному [173]. Однонуклеотидные вариации, связанные с исходом ишемического инсульта, извлекали из базы данных GISCOME (Genetics of Ischaemic Stroke Functional Outcome network), содержащей данные 12 полногеномных исследований, проведенных Международным консорциумом генетики инсульта (International Stroke Genetics Consortium) и инициативой Stroke Genetics Network Национального института неврологических заболеваний (США). GISCOME включает данные о генотипе и исходе ишемического инсульта 8831 пациента [189].

Анализ был проведен в программном пакете (SMR v1.0.3) в командной строке с использованием опций, рекомендованных Zhu et al. Параметры по умолчанию следующие: локусы экспрессии генов (cis-eQTL) выбраны на основе минимального $P = 5 \times 10^{-8}$, данные локусы включены в тест HEIDI на основе минимального $P = 1,57 \times 10^{-3}$; минимальное количество однонуклеотидных вариантов (SNP), включенных в тест HEIDI = 3, максимальное количество SNP, включенных в тест HEIDI = 20; физическое окно вокруг РНК-зонда, в пределах которого был выбран наиболее значимый локус cis-eQTL, составило 2 мегабазы. Поправка на множественные тестирования была выполнена с использованием метода Беньямини-Хохберга, для повышения чувствительности показатель частоты ложных обнаружений был установлен менее 0,2.

Результаты суммарного менделевского рандомизационного анализа демонстрируют, что экспрессия 31 гена в коре головного мозга влияет на функциональный исход ишемического инсульта. В ходе следующего этапа из перечня генов, влияющих на функциональный исход инсульта, были извлечены

гены, экспрессирующиеся в коре головного мозга и контролируемые тиреоидными гормонами. Данные о генах, экспрессия которых контролируется тиреоидными гормонами в различных органах и тканях, были получены из Атласа генов-мишеней рецепторов тиреоидных гормонов [441]. Были отобраны 10 наиболее приоритетных генов с наименьшим коэффициентом Q, отражающим вероятность ложных обнаружений. Результаты анализа представлены в таблице 6.9.

Таблица 6.9 – Приоритетные гены, влияющие на функциональный исход ишемического инсульта и контролируемые тиреоидными гормонами

Хромо-сома	Ген	Позиция в геноме (hg19)	Локус eQTL	Э А	Частота ЭА	Бета SMR	CO для Беты SMR	P SMR	P HEIDI	Q
6	АНП1	135712058	rs146147661	G	0.00994036	-0.5336	0.1902430	0.0050	0.03085	0.045
10	ADRA2A	112838726	rs4348826	T	0.13121300	-2.5992	0.9959180	0.009056103	0.0164686900	0.0458
11	SPON1	14136974	rs11022350	C	0.01988070	-0.5473	0.2124010	0.009974058		0.0458
3	CADPS	62622556	rs34460096	A	0.01093440	-0.4176	0.1941460	0.031475760		0.1973
15	PYGO1	55856114	rs57836480	A	0.04174950	4.2079	1.9748400	0.033107880	0.0330545700	0.1973
22	CHCHD10	24109090	rs4049871	G	0.01292250	0.4693	0.2215180	0.034124510	0.0515508700	0.1973
7	HDAC9	18584306	rs73063942	T	0.02087480	-2.2527	1.0818000	0.037303070	0.0637999600	0.257

Продолжение таблицы 6.9

8	TMEM 74	109709 451	rs29304 86	C	0.2127 2400	1.541 1	0.7732 950	0.046270 500	0.84770 41000	0.273
12	TMTC 1	297957 32	rs73086 277	G	0.0139 1650	- 15.13 5	7.6314 900	0.047333 510	0.04762 16900	0.273
20	PRNP	467461 6	rs60514 15	C	0.0089 4632	- 0.740 3	0.3735 790	0.047506 170	0.44278 06000	0.273

Примечание: ЭА: эффективный аллель; Бета SMR: оценка влияния каждого единичного увеличения экспрессии гена на логарифмически трансформированный риск увеличения суммы баллов по модифицированной шкале Рэнкина на 1 балл; Частота ЭА: частота эффективного аллеля; P HEIDI: P-значение для теста HEIDI; P SMR: P-значение для ассоциации SMR; CO для Беты SMR: стандартная ошибка; Q: P-значение, скорректированное на коэффициент ложных обнаружений; Лocus eQTL: лocus количественных признаков для гена с наименьшим P-значением для ассоциации.

Графическое изображение полученных данных представлено на рисунке 6.11. В ходе SMR-анализа установлено, что генетические вариации, связанные с уменьшением экспрессии генов ANI1, SPON1, ADRA2A, CADPS и ряда других генов, ассоциированы с увеличением риска более неблагоприятного функционального исхода инсульта (больше баллов по шкале mRs). Полученные данные свидетельствуют, что ряд генов, экспрессируемых в коре головного мозга под контролем тиреоидных гормонов, обладает церебропротекторным эффектом в условиях острой церебральной ишемии, и их гиперэкспрессия ассоциирована с более благоприятным функциональным исходом ишемического инсульта. Влияние генетических вариантов, расположенных в области наиболее приоритетного гена ANI1, на функциональный исход ИИ представлено на рисунке 6.12.

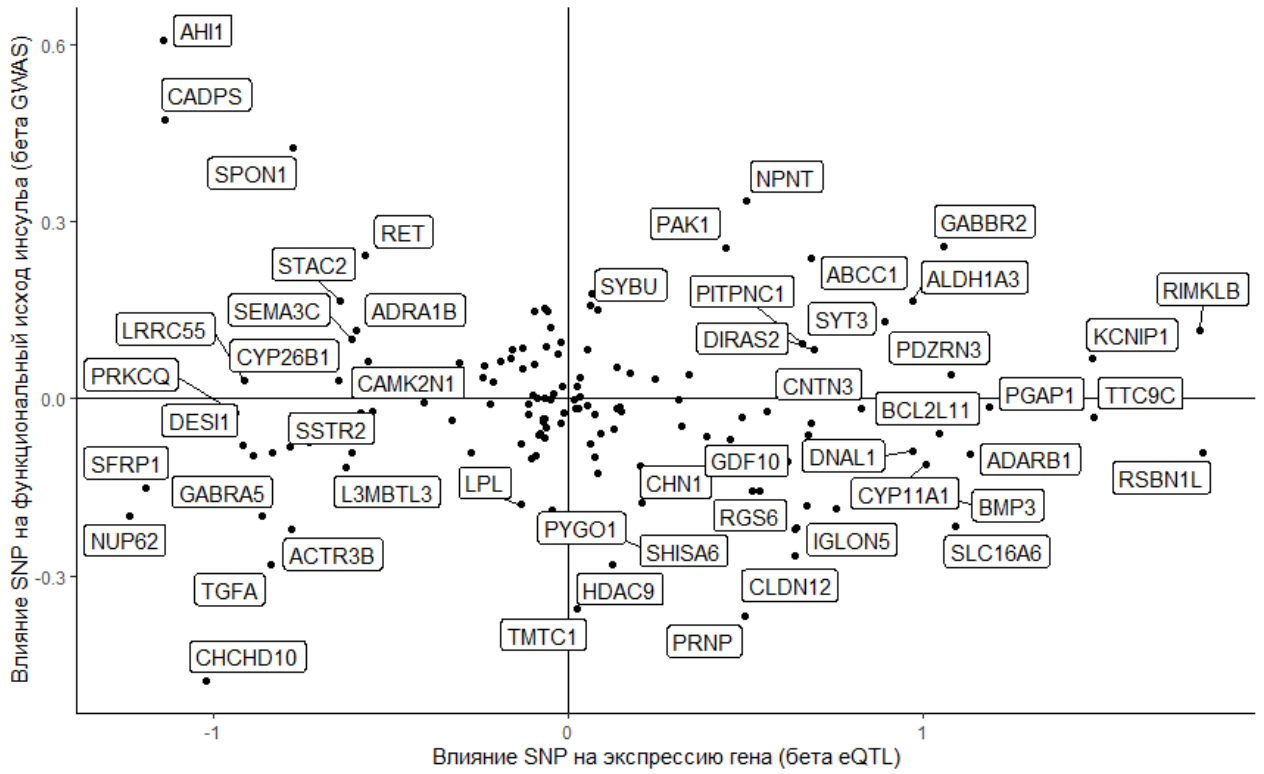


Рисунок 6.11 – Влияние на функциональный исход инсульта экспрессии в головном мозге генов, контролируемых тиреоидными гормонами

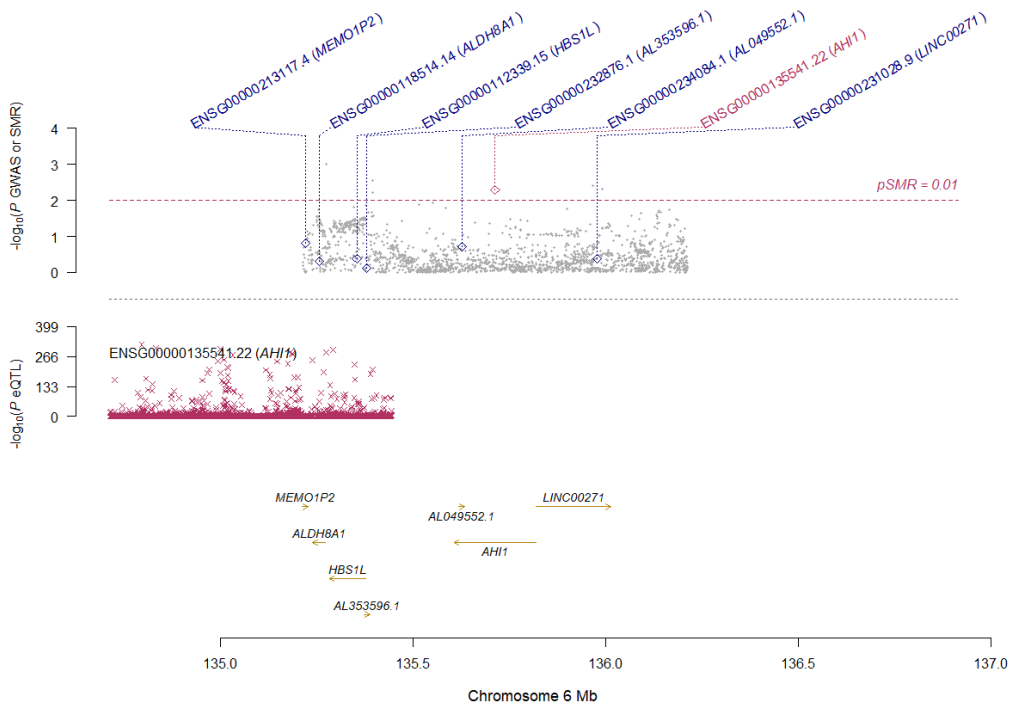


Рисунок 6.12 – Влияние однонуклеотидных вариантов в области гена АНІ1 на функциональный исход ишемического инсульта

6.6. Анализ профиля циркулирующих мРНК, ассоциированных с генами, контролируемые тиреоидными гормонами у пациентов с ишемическим инсультом

Согласно накопленным в течение последних нескольких лет экспериментальным и клиническим данным, микро-РНК и матричные РНК могут играть клинически значимую роль в развитии ишемического повреждения при остром инсульте [17; 28]. Благодаря развитию технологии микрочипов мРНК, основанной на исследовании профилей экспрессии генов, накоплен значительный массив общедоступных данных об экспрессии нескольких десятков тысяч генов при различных заболеваниях, в том числе и цереброваскулярных. Накопленные данные позволяют провести анализ взаимоотношений между генами и белками (Gene-Protein Interactions), различными белками (Protein-Protein Interactions) с помощью высокопроизводительных компьютерных технологий, что дает возможность идентифицировать приоритетные гены и сигнальные пути, ассоциированные с различной патологией. Несмотря на большое количество исследований в данной области, согласно нашим данным, анализ различно экспрессируемых генов, контролируемых тиреоидными гормонами, при ишемическом инсульте ранее не проводился.

С учетом полученных в ходе предыдущих этапов работы сведений об ассоциации тиреоидных гормонов с генами, влияющими на функциональный исход инсульта, нами был проведён анализ молекулярной дисрегуляции и активности сигнальных путей на основании данных транскриптома пациентов с острым ишемическим инсультом. Все данные, используемые в текущем этапе исследования, были получены из базы Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Основу аналитического исследования составили общедоступные результаты исследования профиля экспрессии мРНК периферической цельной крови 39 пациентов с острым ишемическим инсультом и

24 здоровых контрольных субъектов на основе платформы Affymetrix GPL6883 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE16561>) [172].

Пакет Linear Model for Microarray (LIMMA) был использован для анализа данных микрочипов с целью идентификации генов, дифференциально экспрессирующихся при инсульте. С целью повышения чувствительности логарифмическое кратное изменение в экспрессии генов более 0,5 при скорректированном (FDR) P-значении менее 0,05 считались статистически значимыми.

В ходе анализа содержания мРНК в периферической крови пациентов с острым ишемическим инсультом установлено, что из 24424 генов, представленных в базе данных GSE16561, экспрессия 773 генов статистически значимо отличается по сравнению с контрольными индивидуумами без ишемического инсульта. Данные об дифференциально экспрессируемых генах были интегрированы с результатами исследования Massolt et al., посвященному идентификации генов, экспрессия которых в периферической крови контролируется тиреоидными гормонами [397]. Исследование Massolt et al. основано на результатах РНК-секвенирования крови 8 пациентов, перенесших тироедэктомию. Анализ был выполнен дважды: сразу после тироедэктомии и через 4 недели после лечения левотироксином, что позволило идентифицировать гены, контролируемые тиреоидными гормонами.

Интеграция полученных данных с перечнем мРНК генов, контролируемых тиреоидными гормонами, позволила установить, что из 773 генов, дифференциально экспрессирующихся при ишемическом инсульте, 73 гена контролируются тиреоидными гормонами. Для идентифицированных генов был выполнен анализ генной онтологии с поиском соответствующего молекулярного процесса. Анализ генной онтологии осуществлялся с помощью базы данных Консорциума Генной Онтологии (<http://geneontology.org/>) и пакета geo2r. Наиболее статистически значимые гены представлены в таблице 6.10 и на рисунке 6.13.

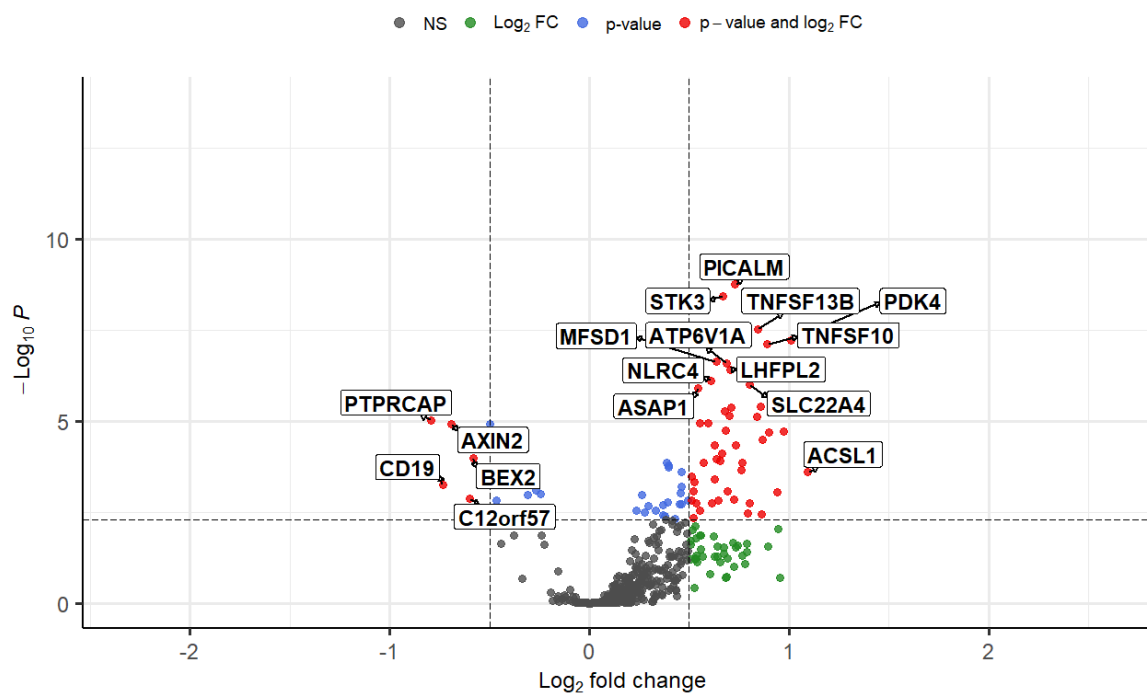
Таблица 6.10 – Различия в экспрессии в крови ТЗ-регулируемых генов при ишемическом инсульте по сравнению с контрольными индивидуумами

Название гена	Символ гена	Контролируемый геном молекулярный процесс (согласно геной онтологии)	logFC	P
Фосфатидил-инозитол-связывающий белок сборки клатрина	PICALM	пролиферация клеток /// адгезия клеток /// эндосомальный транспорт /// гомеостаз ионов железа /// импорт ионов железа в клетку /// негативная регуляция экспрессии генов /// позитивная регуляция гибели нейронов	0.7305 825	1.79548 2e-09
Серин/треониновая киназа 3	STK3	апоптотический процесс /// развитие центральной нервной системы /// развитие эндокарда /// формирование нервной трубки /// позитивная регуляция JNK каскада /// позитивная регуляция апоптотического сигнального пути через рецепторы домена смерти	0.6706 449	3.69762 5e-09
член 13b суперсемейства фактора некроза опухоли	TNFSF13B	клеточная пролиферация /// иммунный ответ /// позитивная регуляция пролиферации В-клеток /// позитивная регуляция клеточной пролиферации /// сигнальная трансдукция /// фактор некроза опухоли-опосредованный сигнальный путь	0.8420 093	3.00553 6e-08
пируватдегидрогеназа-киназа 4	PDK4	гомеостаз глюкозы /// процесс метаболизма реактивных форм кислорода /// регуляция процесса биосинтеза ацетил-КоА из пирувата	1.0078 513	6.03291 5e-08
член 10 суперсемейства фактора некроза опухоли	TNFSF10	иммунный ответ /// негативная регуляция внеклеточного апоптотического сигнального пути через рецепторы домена смерти /// позитивная регуляция I-кappaB киназы/NF-kappaB сигнализации	0.891	7.7094 1e-08

АТФаза Н ⁺ транспортирующая V1 субъединица А	АТР6V1A	Гидролиз АТФ, связанный с транспортом протонов /// процесс метаболизма АТФ /// сигнальный путь инсулинового рецептора /// ионный трансмембранный транспорт	0.6889 567	2.53603 9e-07
Кард-домен семейства NLR, содержащий домен 4	NLRC4	активация активности эндопептидазы цистеинового типа, участвующей в апоптотическом процессе /// активация врожденного иммунного ответа /// позитивная регуляция активности фактора транскрипции NF-κappaB ///	0.6097 301	7.66988 8e-07
Примечание: logFC – логарифмически трансформированное отклонение от средней экспрессии, p – коэффициент статистической значимости, скорректированный по показателю частоты ложных обнаружений				

Т3-регулируемые гены, дифференциально экспрессируемые у пациентов с ИИ

EnhancedVolcano



total = 513 variables

Рисунок 6.13 – Различия в экспрессии генов, регулируемых тиреоидными гормонами, в крови у пациентов с ишемическим инсультом по сравнению с контрольными индивидуумами

Для идентификации ведущих сигнальных путей, ассоциированных с генами, контролируруемыми тиреоидными гормонами и дифференциально экспрессирующихся при ишемическом инсульте, был использован анализ обогащения набора генов по функциональной принадлежности с применением активных подсетей. В основе данного метода лежит выявление активных связей (подсетей) в сети взаимодействий между белками, которые кодируются дифференциально экспрессируемыми генами. Метод позволяет выделить множество преаннотированных наборов (уже установленных сигнальных или метаболических путей), частота встречаемости которых во входном наборе генов (пациенты с ишемическим инсультом) статистически значимо отличается от таковой в контрольной группе (здоровые индивидуумы).

Для проведения функционального обогащения набора генов был использован пакет `pathfindR` для системы статистических вычислений R. Пакет `pathfindR` предлагает функциональные возможности для кластеризации обогащенных терминов, определения репрезентативных терминов в каждом кластере, оценки обогащенных терминов по образцу и визуализации результатов анализа. Обогащение, кластеризация и другие методы, реализованные в `pathfindR`, подробно описаны Ulgen E, Ozisik O и Sezerman OU [417].

Входные данные для функционального обогащения набора генов были представлены перечнем генов, дифференцированно экспрессирующихся при ишемическом инсульте и контролируемых тиреоидными гормонами, а также отклонением уровня экспрессии от среднего значения и скорректированным коэффициентом статистической значимости для каждого гена (всего 73 гена, приоритетные 10 генов обозначены в таблице 6.10). Поиск преаннотированных генов и сигнальных путей осуществлялся в базе данных Консорциума «Онтология генов» (Gene Ontology Consortium). Результаты анализа представлены в таблице 6.11 и на рисунке 6.14.

Таблица 6.11 – Биологические процессы и сигнальные пути, ассоциированные с генами, контролируемые тиреоидными гормонами, и дифференциально экспрессирующихся в крови при ишемическом инсульте

Биологический процесс / сигнальный путь (GO-онтология)	Степень эффекта обогащения набора генов	Коэффициент р	Позитивно регулируемые гены	Негативно регулируемые гены
интернализация рецепторов	37.126761	0.0062306	ADM, CD36, PICALM, RAB31	
негативная регуляция канонического сигнального пути Wnt	9.571743	0.0062893	SIAH2, STK3	AXIN2
положительная регуляция сигнализации NIK/NF-κappaB	12.011599	0.0062306	EIF2AK2, TLR4	
реакция на вирусы	9.376401	0.0062306	IFIT3, EIF2AK2, RSAD2	
Нурро-сигналирование	19.143486	0.0062893	CTK3	
клеточный ответ на стимуляцию частицами липопротеинов низкой плотности	25.524648	0.0062697	CD36	
клатрин-зависимый эндоцитоз	18.017398	0.0062112	PICALM	
регуляция гибели нейронов	43.756539	0.0062306	CHP1, LRRK2	
транспорт холестерина	21.878270	0.0058824	CD36	
клиренс частиц липопротеинов низкой плотности	21.878270	0.0058824	CD36	

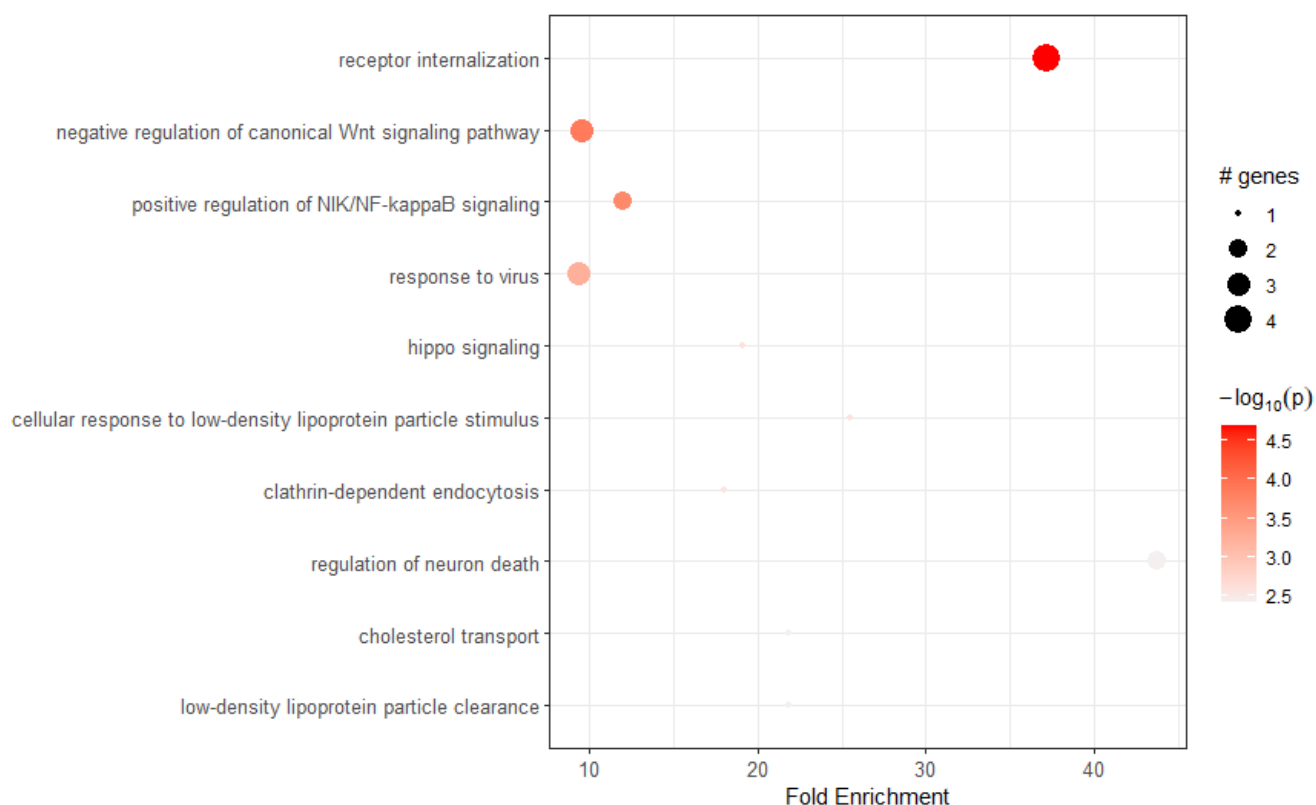


Рисунок 6.14 – Приоритетные биологические процессы и сигнальные пути, ассоциируемые с экспрессией генов, контролируемых тиреоидными гормонами, у пациентов с ишемическим инсультом

Анализ биологических процессов, ассоциированных с генами, контролируемые тиреоидными гормонами, позволяет выделить ряд механизмов, обеспечивающих защиту от ишемического повреждения. Так, тиреоидные гормоны регулируют выживаемость нейронов благодаря позитивной регуляции экспрессии генов *CHP1* и *LRRK2*. Ген *CHP1* кодирует фосфопротеин, который связывается с Na^+/H^+ -антипортером. Этот белок служит необходимым кофактором, который поддерживает физиологическую активность белков семейства Na^+/H^+ -антипортеров, может играть роль в митогенной регуляции данных белков и обеспечивает ряд важных биологических функций, таких как поддержание объёма и pH клеток. Ген *LRRK2* кодирует белок с областью повторов армдилло (ARM), областью повторов анкирина (ANK), доменом лейцин-богатых повторов (LRR), киназным доменом, доменом RAS, доменом GTPase и доменом WD40. Белок

присутствует в основном в цитоплазме, но также ассоциируется с внешней мембраной митохондрий. Мутации LRRK2 ассоциированы с гибелью нейронов коры головного мозга в экспериментальных исследованиях на мышах [101].

При анализе участия генов, контролируемых тиреоидными гормонами, в сигнальных путях с использованием технологии функционального обогащения набора генов и данных Киотской энциклопедии генов и геномов было установлено статистически значимое участие дифференциально экспрессирующихся генов в сигнальном пути, ответственным за формирование внеклеточных нейтрофильных ловушек ($p=0.0050126$, fold enrichment = 10,36). Были идентифицированы 6 генов (CYBB, FCGR1A, C5, TLR4, ITGA2B, ITGB3, CLCN3), дифференциально экспрессирующихся при ишемическом инсульте и контролируемых тиреоидными гормонами. Следует отметить, что по крайней мере три гена (TLR4, ITGA2b, ITGB3) относятся к генам, кодирующим поверхностные клеточные рецепторы адгезии на тромбоцитах, при этом ген ITGB3 кодирует рецептор integrin- α v β 3 на тромбоцитах, лигандами которого выступают фибронектин, протромбин, фактор Виллебранда. Известно, что сигнальные пути, инициируемые интегрином- α v β 3, не активируются трийодтиронином, в отличие от тироксина [144].

Полученные данные свидетельствуют о связи тироксина с процессом формирования внеклеточных нейтрофильных ловушек (нетоз), что способствует адгезии тромбоцитов и связано с риском повторного тромбообразования. Выявленная ассоциация согласуется с литературными данными о связи высокого уровня тироксина с тромботическими и эмболическими событиями [117], а также с данными нашего исследования, в котором высокий уровень тироксина был ассоциирован с риском неблагоприятного исхода инсульта.

6.7. Анализ экспрессии в плюрипотентных стволовых клетках T3-регулируемых генов, ответственных за нейрогенез, в условиях гипоксии и нормоксии

Постинсультное восстановление представляет собой сложный каскад событий, включающий клеточные, молекулярные и генетические компоненты. Достижения в области функциональной нейровизуализации и методов картирования мозга предоставляют новые данные о репаративных процессах, происходящих после инсульта. Первый период восстановления охватывает часы после инсульта, когда ведущими механизмами выступают отек, провоспалительные процессы и реакция на реперфузию. В течение второго периода, который начинается через несколько дней после развития инсульта и длится несколько недель, активируются эндогенные нейрорепаративные механизмы [65]. Данные механизмы включают продукцию факторов роста (таких как VEGF, BDNF, неуротропин-3, плацентарный фактор роста, бетацеллюлин), формирование новых аксональных связей, а также нейрональную дифференцировку перицитов из плюрипотентных стволовых клеток [12]. Считается, что спонтанный нейрогенез происходит во взрослом головном мозге после ишемического повреждения, однако, количество новых нейронов и их выживаемость недостаточны для поддержания нейропластичности [155; 192; 250; 409]. В данном контексте представляется перспективным применение экзогенных подходов для повышения выживаемости, реинтеграции и дифференцировке новых нейронов и глии, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток [310].

В течение последних нескольких лет были предложены различные стратегии экзогенной стимуляции выживаемости стволовых клеток, включающие попытки применения в клинических и доклинических исследованиях более 25 фармакологических препаратов, таких как флюоксетин [167], прогестерон [325], липо-простагландин-1 [378], 100K-bFGF-1 [248], 4-альфа-форбол-12,13-дидеконат (агонист TPRV-4 рецепторов) [411], MC-21 (антитела к бета-рецептору хемокинов) [286] и др.

С учетом молекулярных эффектов тиреоидных гормонов, нами была изучена экспрессия генов, контролируемых тиреоидными гормонами в стволовых клетках в условиях гипоксии и нормоксии, а также проведен поиск дифференциально экспрессирующихся генов, ответственных за нейрогенез. Основу исследования составили первичные данные профилирования экспрессии генов в культурах полипотентных эмбриональных стволовых клеток, поддерживаемых в нормоксических или гипоксических (5% O₂) условиях на 15-й день эксперимента. Первичная матрица экспрессии генов была извлечена из исследования Prado-Lopez S et al. [213], представленного в базе данных Gene Expression Omnibus Национального центра биотехнологической информации США (набор данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE37761>, платформа Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F).

Установлено, что из 40736 генов, представленных на микрочипе, 4539 генов дифференцированно экспрессируются в плюрипотентных стволовых клетках на 15-е сутки пребывания в условиях гипоксии по сравнению с контрольными наблюдениями в условиях нормоксии. Из перечня дифференциально экспрессирующихся генов были выбраны те, экспрессия которых контролируется тиреоидными гормонами согласно «Атласу генов-мишеней рецепторов гормонов щитовидной железы» [441], суммарное число генов для дальнейшего анализа составило 326.

Определение регулируемых геном биологических процессов проводилось путем функциональной аннотации генов в базе данных консорциума Генной Онтологии (Gene Ontology) с применением специализированного пакета clusterProfiler для среды статистических вычислений R.

Результаты анализа дифференциальной экспрессии в плюрипотентных стволовых клетках генов, регулируемых тиреоидными гормонами, в условиях гипоксии и нормоксии представлены в таблице 6.12 и на рисунке 6.15.

Таблица 6.12 – Различия в экспрессии контролируемых тиреоидными гормонами генов в плюрипотентных стволовых клетках при гипоксии по сравнению с нормоксией

Название гена	Символ гена	Контролируемый геном молекулярный процесс (согласно геной онтологии)	logFC	P
Экто-5'-нуклеотидаза	NT5E	процесс катаболизма АМР /// процесс метаболизма ДНК /// процесс биосинтеза аденозина /// развитие мозга /// дефосфорилирование /// клеточная адгезия лейкоцитов /// отрицательная регуляция воспалительного ответа /// положительная регуляция процесса биосинтеза липидов	1.9815	0.0289
Цинковый палец-2 семейства FEZ	FEZF2	Маршрутизация аксонов /// аксональная фасцикуляция /// миграция ГАМК-ергических интернейронов коры головного мозга /// негативная регуляция дифференцировки нейронов	-3.927	0.0289
Адренорецептор альфа 1В	ADRA1B	аденилатциклаза-активирующий адренергический рецепторный сигнальный путь /// аденилатциклаза-модулирующий G-белок-связанный рецепторный сигнальный путь /// клеточная пролиферация /// клеточная сигнализация /// гомеостаз глюкозы /// позитивная регуляция MAPK-каскада	1.5807	0.0289
нейропиплин 1	NRP1	VEGF-активированный нейропипиновый сигнальный путь /// ангиогенез /// отрицательная регуляция удлинения аксона /// негативная регуляция внешнего апоптотического сигнального пути /// негативная регуляция процесса апоптоза нейронов /// миграция нейронов /// структурная организация вестибулокохлеарного нерва	1.497	0.0289

регулятор кальциневрина-1	RCAN1	кровообращение /// кальциневрин-НФАТ сигнальный каскад /// развитие центральной нервной системы /// регуляция кальциневрин-НФАТ сигнального каскада /// регуляция каталитической активности	1.415	0.0289
цитохром P450, семейство 26, подсемейство В, член 1	CYP26B1	морфогенез костей /// клеточный ответ на ретиноевую кислоту /// процесс метаболизма витаминов /// процесс метаболизма ксенобиотиков	2.428	0.0289
Na ⁺ /K ⁺ -транспортная АТФаза	NKAIN2	регуляция транспорта ионов натрия	-1.29	0.0294
Крупель-подобный фактор 6	KLF6	дифференцировка В-клеток /// клеточный ответ на циклогексимид /// клеточный ответ на перекись водорода /// репарация тканей	1.227	0.0294
Примечание: log ₂ FC – логарифмически трансформированное отклонение от средней экспрессии, p – коэффициент статистической значимости, скорректированный по показателю частоты ложных обнаружений.				

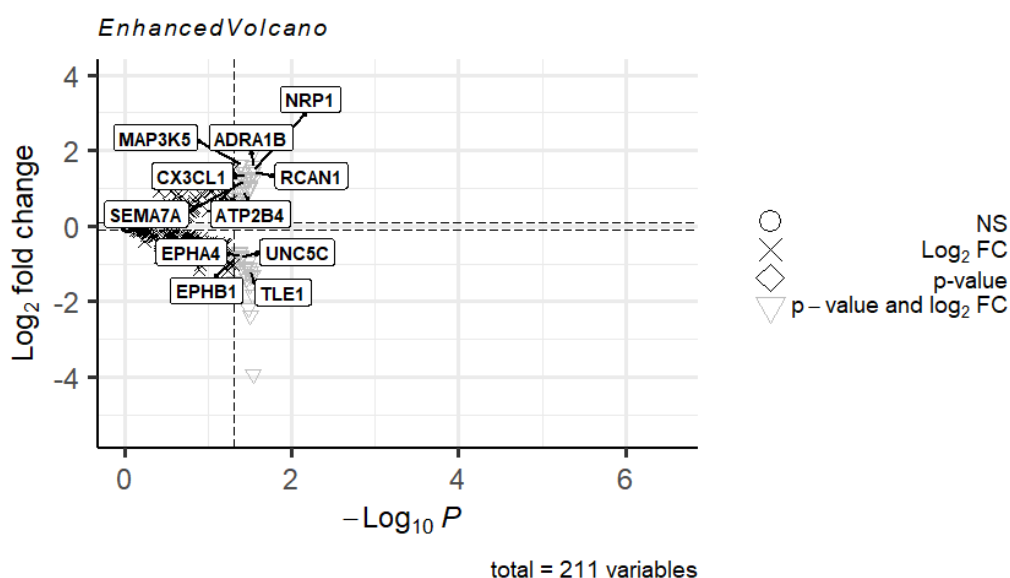


Рисунок 6.15 – Различия в экспрессии контролируемых тиреоидными гормонами генов в плюрипотентных стволовых клетках при гипоксии по сравнению с нормоксией

Для определения участия идентифицированных генов в сигнальных путях, ассоциированных с нейрогенезом, был применен анализ обогащения набора генов. Входные данные для функционального обогащения набора генов были представлены перечнем генов, дифференцированно экспрессирующихся в стволовых клетках при гипоксии и контролируемых тиреоидными гормонами, а также отклонением уровня экспрессии от среднего значения и скорректированным коэффициентом статистической значимости для каждого гена. Поиск сигнальных путей осуществлялся в базе данных «Киотская энциклопедия генов и геномов» (KEGG) с использованием пакета статистического анализа pathfinder. Результаты анализа представлены в таблице 6.13 и на рисунке 6.16.

Таблица 6.13 – Сигнальные пути, ассоциированные с контролируруемыми тиреоидными гормонами генами в стволовых клетках при гипоксии по сравнению с нормоксией

Биологический процесс / сигнальный путь (GO-онтология)	Степень эффекта обогащения набора генов	Коэффициент p	Позитивно регулируемые гены	Негативно регулируемые гены
Маршрутизация аксонов	12.466751	0.0259740	NRP1*, SEMA7A**	UNC5C*, ERNA4**, ERHB1**
Адгезия клеток	6.724490	0.0129870	PTPRJ**	
Сигнальный путь Fc-эпсилон RI	6.526711	0.0259740	VAV2**	
Сигнальный путь Notch	8.069388	0.0116279		TLE1*
Сигнальный путь HIF-1	4.147816	0.0129870	PFKFB3**	
Сигнальный путь TNF	7.996691	0.0232558	MAP3K5**, CX3CL1 **	
Сигнальный путь рецепторов В-клеток	5.617928	0.0259740	VAV2**	

Сфинголипидный сигнальный путь	3.793302	0.0232558	MAP3K5**	
Сигнальный путь нейтрофилов	3.761155	0.0179570	MAP3K5**	
Сигнальный путь тиреоидных гормонов	3.667903	0.0129870	RCAN1**	
Fc гамма R α -опосредованный фагоцитоз	4.721450	0.0129870	VAV2**	
Апоптоз	3.287528	0.0232558	MAP3K5**	
Примечание: * – гены, негативно регулируемые тиреоидными гормонами, ** – гены, позитивно регулируемые тиреоидными гормонами.				

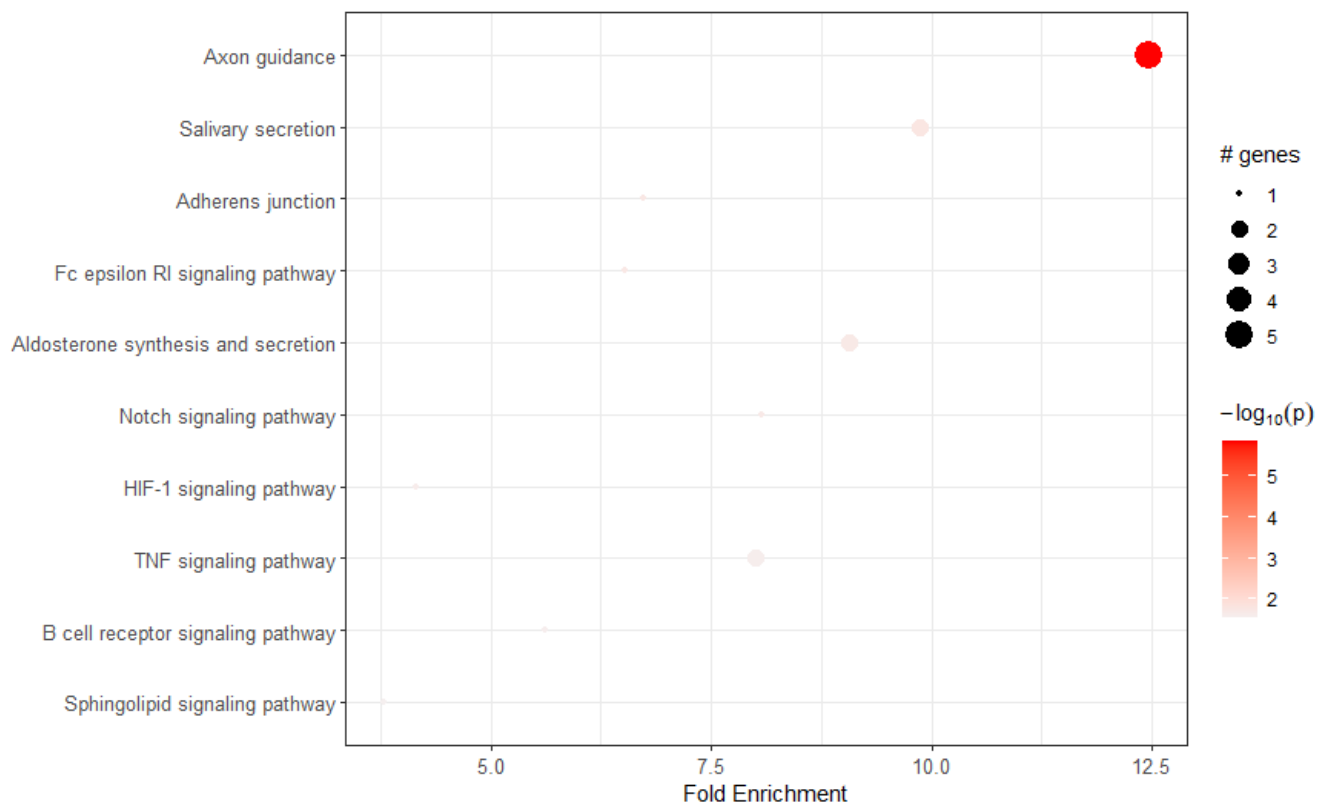


Рисунок 6.16 – Приоритетные сигнальные пути, ассоциируемые с экспрессией контролируемых тиреоидными гормонами генов в стволовых клетках при гипоксии по сравнению с нормоксией

Анализ генной онтологии и соответствующих сигнальных путей демонстрирует тесную связь Т3-регулируемых генов в условиях ишемии с процессами роста аксонов, их маршрутизации, а также выживания нейронов. Для большинства из идентифицированных генов тиреоидные гормоны являются положительными регуляторами экспрессии. Так, гены *ERNA4* и *ERNB1*, экспрессия которых стимулируется тиреоидными гормонами, относятся к системе эфринов, их функция заключается в контакт-зависимом двунаправленном сигналировании между расположенными рядом клетками, что критически необходимо для формирования новых синапсов и роста аксонов. Известно, что *ERNA4* регулирует при инсульте формирование лепто-менингеальных коллатералей (подавляя Tie-2 сигнальный путь) и способствует ремиелинизации белого вещества [152; 153]. Активизация *ERNB1*-сигналирования в свою очередь повышает нейропротекторную субпопуляцию астроцитов [45].

Одним из ведущих процессов, протекающих в первые минуты церебральной ишемии, является повышение концентрации внутриклеточного ионизированного кальция. Кальциневрин-фосфатаза представляет собой ключевую сигнальную молекулу, участвующую в модуляции воспалительных каскадов. В ходе экспериментальных исследований показана защитная роль регулятора кальциневрин-фосфатазы при церебральной ишемии у лабораторных мышей. Сверхэкспрессия *Rcan1-4* подавляла выработку маркера воспаления цикло-оксигеназы 2; при этом у мышей, лишенных *Rcan1*, наблюдалась более высокая экспрессия генов, связанных с воспалением, что приводило к увеличению объема инфаркта [334]. Ген регулятора кальциневрин-фосфатазы (*RCAN1*) относится к классическому сигнальному пути тиреоидных гормонов и, согласно проведенному нами анализу, экспрессируется в стволовых клетках на фоне гипоксии под воздействием тиреоидных гормонов.

Несмотря на то, что экспрессия значительной части генов стимулировалась тиреоидными гормонами, для ряда идентифицированных генов тиреоидные гормоны являлись отрицательными регуляторами. В частности, согласно Атласу мишеней тиреоидных гормонов, экспрессия *Nrp1* подавляется в головном мозге

под воздействием трийодтиронина. В проведенном нами анализе отмечалась гиперэкспрессия *Nrp1* в условиях ишемии. Ген *Nrp1* (нейропилин-1) играет роль в VEGF-индуцированном ангиогенезе, вместе с тем, он способствует репульсии (отталкиванию) аксонов и деструкции их конуса роста под воздействием семафорина-3А. В исследовании Jiang et al. показано, что экспрессия рецептора NRP-1 была крайне низкой в E2F1-нокаутированных нейронах, что приводило к снижению реакции на семафорин 3А-индуцированную гибель нейронов и укорочению аксонов. При этом селективный пептидный ингибитор NRP-1 обеспечивал нейропротекцию в модели кислородно-глюкозной депривации [289]. Таким образом, тироидные гормоны могут способствовать процессам выживания нейронов и маршрутизации аксонов благодаря подавлению NRP-1 сигналирования.

6.8. Анализ генетических корреляций между тиреоидным статусом и нарушениями мозгового кровообращения по геморрагическому типу

На долю внутримозговых и субарахноидальных кровоизлияний приходится 10%-15% всех случаев инсульта [134]. Установленные клинические факторы риска ВМК и САК включают артериальную гипертензию, церебральную амилоидную ангиопатию, пожилой возраст, мужской пол, ранее перенесенные инсульты, прием антикоагулянтов и хронический алкоголизм. Известно, что гипотиреоз, в том числе субклинический, может привести к развитию гипертонической болезни, гиперхолестеринемии и ишемической болезни сердца, что в целом повышает риск развития церебрального атеросклероза. В зависимости от степени дефицита щитовидной железы, гипотиреоз также может быть связан с повышенным риском кровотечений из-за гипокоагуляции, либо с повышенным риском тромбообразования. Данные нарушения гемостаза могут быть опосредованы дисфункцией тромбоцитов, факторов свертывания и изменением реологии крови [144].

Несмотря на то, что влияние тиреоидных гормонов на развитие острой или хронической церебральной ишемии окончательно не изучено (что и явилось основой для настоящей диссертационной работы), в данном направлении проведено множество фундаментальных и клинических исследований. Вместе с тем опубликованы лишь единичные исследования влияния тиреоидного статуса на риск развития и исход геморрагических типов инсульта [73; 223].

Для определения влияния тиреоидного статуса на риск развития геморрагических типов инсульта было проведено менделевское рандомизационное исследование. В качестве предикторов были использованы следующие фенотипы: уровни трийодтиронина, ТТГ, тироксина, гипотиреоз и гипертиреоз.

Инструментальные переменные, ассоциированные с уровнем тироксина, ТТГ, гипотиреозом и тиреотоксикозом были извлечены из базы данных консорциума ThyroidOMICS [180]. База данных консорциума включает в себя результаты метаанализа полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) с уровнями ТТГ, свободного тироксина, повышенного ТТГ (гипотиреоз) и сниженного ТТГ (гипертиреоз) в соответствующих гендерных группах. Мета-анализ включал исследование 8 млн. генетических вариаций у 72168 индивидуумов. Ассоциации для ТТГ и FT4 рассчитаны с использованием линейной модели после обратного нормального преобразования измерений гормонов щитовидной железы. Риск гипо- и гипертиреоза рассчитывался как анализ случай-контроль с использованием модели логистической регрессии. Наборы результатов включают в себя все генетические варианты, прошедшие фильтры окончательного контроля качества и включенные в эталонную панель 1000Gv3 для всех этнических групп.

Помимо данных консорциума ThyroidOMICS (93 однонуклеотидные вариации) в исследование были включены однонуклеотидные вариации, ассоциированные с гипотиреозом из системы UKBiobank. Анализ был проведен стандартными методиками и методом Robust Egger для небольшого количества статистически «слабых» инструментальных переменных.

Фенотипы, ассоциированные с геморрагическими видами нарушений мозгового кровообращения, были представлены субарахноидальным

внутричерепным кровоизлиянием, внутричерепными аневризмами и церебральными микрогеморрагиями. Инструментальные переменные, ассоциированные с церебральными микрогеморрагиями, были извлечены из данных исследования Knol et al., опубликованного в 2020г. [71]. Данное исследование включает анализ генетических предикторов церебральных микрогеморрагий у 25,862 индивидуумов из 11 когорт. Данные о генетических ассоциациях с интракраниальными аневризмами и субарахноидальными кровоизлияниями были извлечены из исследования Bakker et al., которое включало 10,754 пациента с аневризмами и 306,882 индивидуума группы контроля европейского и восточноазиатского происхождения [184]. Данные о генетических предикторах интрацеребрального кровоизлияния получены из исследования Woo et al., которое включало исследуемую когорту из 1,681 пациентов и контрольную когорту из 2,261 индивидуумов [273]. Результаты представлены в таблице 6.14.

Таблица 6.14 – Влияние генетически прогнозируемых уровней тиреоидных гормонов на риск развития фенотипов, ассоциированных с нарушениями мозгового кровообращения по геморрагическому типу

Предиктор	Зависимый фенотип	Метод	N	Beta	Se	p
Св. Т3	Церебральные микрогеморрагии	Эггеровская регрессия	5	-0.412	0.229	0,071
Св. Т4	Церебральные микрогеморрагии	Обратная взвешенная дисперсия	21	-0.23	0.10	0.03
Св. Т3	Субарахноидальное кровоизлияние	Усиленная эггеровская регрессия	5	-0.731	0.096	<0.0001

Св. Т3	Наличие интракраниальной аневризмы	Усиленная эггеровская регрессия	5	-0.826	0.23	<0.0001
Св. Т4	Внутричерепное кровоизлияние	Усиленная эггеровская регрессия	20	0.636	0.277	0.022

Примечание: Beta – величина эффекта; Se – общая стандартная ошибка оценки величины эффекта; p – p-значение метаанализа с использованием коэффициентов регрессии

Влияние генетически прогнозируемого уровня тироксина сыворотке на обнаружения церебральных микрогеморрагий представлено на рисунке 6.17.

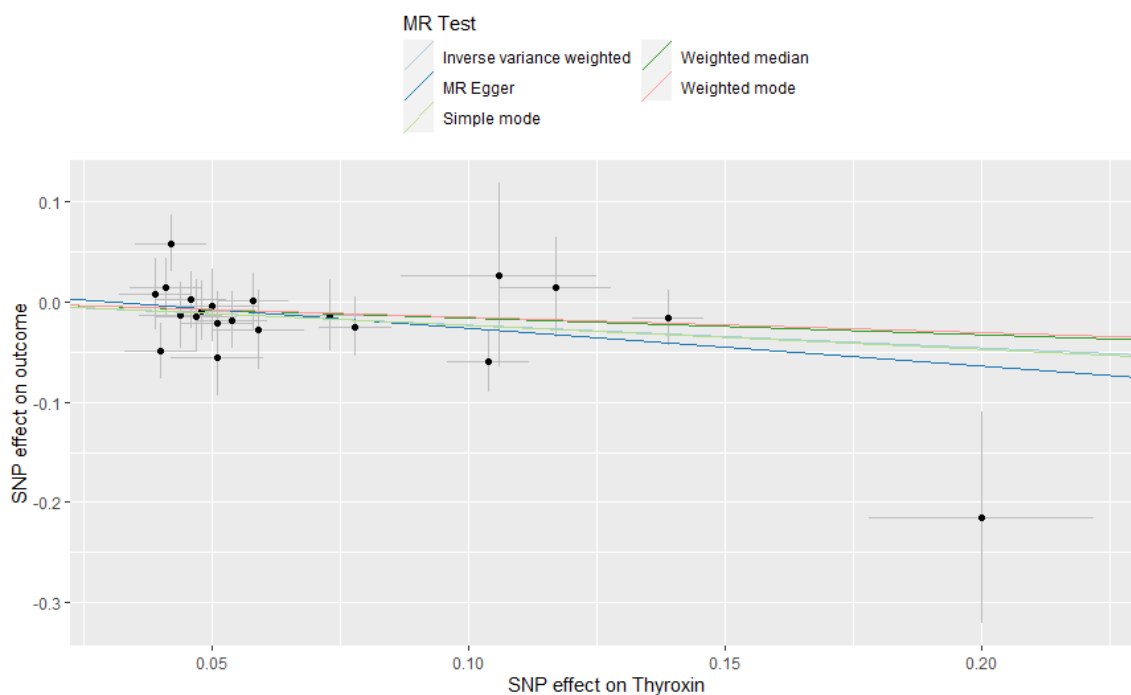


Рисунок 6.17 – Влияние генетически прогнозируемого уровня тироксина сыворотке на обнаружения церебральных микрогеморрагий

В ходе проведенного анализа не было обнаружено причинно-следственной связи между гипотиреозом (определяемом как повышение ТТГ), гипертиреозом

(определяемом как снижение ТТГ), уровнем ТТГ и какими-либо фенотипами, относящимися к геморрагическим видам нарушения мозгового кровообращения. Тем не менее, выявлены генетические ассоциации между повышением уровней Т3 и Т4, и снижением риска обнаружения церебральных микрогеморрагий, интракраниальных аневризм и развития САК.

Проведенное исследование предоставляет доказательства, что тиреоидные гормоны обладают защитным эффектом не только в отношении ишемических событий, но и являются факторами, снижающие риск развития нарушений мозгового кровообращения по геморрагическому типу. Необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение тиреоидного статуса и исхода геморрагических церебральных событий, а также на возможность применения аналогов тиреоидных гормонов в комплексной профилактике церебральных микрогеморрагий (в т.ч. при амилоидной ангиопатии).

ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одной из наиболее значимых проблем отечественной и мировой неврологии по-прежнему остается высокая заболеваемость и смертность от цереброваскулярных заболеваний. По данным многочисленных эпидемиологических исследований последних лет в мире инсульт занимает одно из ведущих мест в структуре смертности, а в ряде стран центральной и восточной Европы данные показатели ухудшаются [202; 429]. В будущем прогнозируется дальнейший рост летальности от инсульта [131].

Разработка новых терапевтических подходов к пациентам с инсультом требует детального понимания механизмов, ускоряющих восстановление утраченных неврологических функций. Гормоны щитовидной железы являются важными регуляторами пластичности нейронов, однако, их роль в механизмах восстановления после инсульта остается неизученной. Утрата прежде всего двигательных функции после ИИ является наиболее стойким и инвалидизирующим его последствием. Несмотря на многочисленные попытки найти нейрозащитные методы лечения, которые уменьшают повреждение мозга и предотвращают потерю неврологических функций, их внедрение в клиническую практику до сих пор не принесло ожидаемых результатов. В настоящее время ограничена возможность минимизировать ущерб после ИИ и существует потребность в новых терапевтических подходах, направленных на усиление нейрорепаративных процессов [196; 237; 328; 409; 433].

В ответ на потерю входного сигнала от ядра инфаркта мозга в выживших нейронах запускаются процессы самовосстановления и самоорганизации гомеостатических механизмов для стабилизации соотношения между возбуждающими и тормозными цепями, и поддержания адекватного синаптического входа [74; 109; 409]. Во-первых, восстанавливается кровоток и происходит временное разрешение нейрональной активности и метаболизма в областях, окружающих очаг инфаркта, и связанных с ним [195; 409]. Одновременно

в ответ на гибель клеток в ядре инфаркта происходит изменение нейрональных путей и реорганизация нейрональных связей. Широкое разнообразие гомеостатических механизмов способствует поддержанию общей возбудимости, включая регуляцию собственной возбудимости нейронов и синаптической передачи. Эти механизмы включают в себя изменения в экспрессии рецепторов на постсинаптическом уровне, высвобождение нейромедиаторов на пресинаптическом уровне, изменения в работе ионных каналов, в количестве и силе синапсов [369]. Процессы реорганизации нейронов и клеточные реакции на последствия ишемии развиваются в течение первых недель после инсульта и занимают до нескольких месяцев и даже лет. В первые фазы этого периода мозг очень пластичен, и факторы, способствующие восстановлению неврологических функций, могут модулироваться внешними вмешательствами [109; 111; 200; 357]. Таким образом, современные исследования направлены на понимание механизмов постинсультной пластичности, которые активируются спонтанно после инсульта.

Текущие фундаментальные исследования показывают, что передача сигналов тиреоидных гормонов связана с улучшением исходов после инсульта, хотя задействованные механизмы недостаточно изучены [48; 227; 443]. Согласно ряду исследований, ТГ вносят вклад в нейрозащиту при введении до или в течение первых часов после инсульта или черепно-мозговой травмы [62; 326; 410]. ТГ также защищают нейроны коры от повреждения, вызванного глутаматом. Однако долгосрочные эффекты ТГ во время фазы восстановления после инсульта остаются в значительной степени неизвестными. Предполагается, что тироксин и 3-трийодтиронин могут активно участвовать в процессах восстановления после инсульта, поскольку они играют важную роль в механизмах развития мозга, обеспечивая пролиферацию, миграцию и дифференцировку нейронов, рост нейритов, синаптическую пластичность, ветвление дендритов и контролируя процессы миелинизации [389; 410]. Также ТГ важны для нормального функционирования головного мозга у взрослого человека, поскольку нейрональная пластичность и нейрогенез в значительной степени зависят от уровня Т3 [125; 285].

Биологические эффекты тиреоидных гормонов не определяются лишь фактической их концентрацией в сыворотке. Тиреоидный гомеостаз – это сложная нейроэндокринная и эпигенетическая система, обладающая многоуровневой ауторегуляцией. Высокоселективное воздействие на компоненты данной системы в различные фазы острой церебральной ишемии представляется эффективным инструментом для осуществления нейропротекции, стимуляции нейропластичности и нейрореинтеграции и улучшения функциональных исходов ИИ [77; 425].

С учетом многообразия биологических эффектов тиреоидных гормонов, селективное терапевтическое воздействие на тиреоидный обмен (стимуляция или ингибирование функции тиреоидных гормонов) является перспективной потенциальной мишенью для новых подходов в лечении инсульта. Тем не менее, результаты опубликованных немногочисленных фундаментальных и клинических исследований достаточно противоречивы [226; 257; 358; 373; 381; 392]. Окончательно не известен характер влияния гипер- или гипотиреоза на течение и исход инсульта. Ряд клинических исследований подтвердил положительные эффекты назначения трийодтиронина при инфаркте миокарда, однако, у пациентов с острым церебральным инсультом такие исследования не проводились [257; 258; 434].

Учитывая неоднозначные результаты немногочисленных ранее опубликованных работ, нами было проведено собственное клиническое исследование, направленное на определение взаимосвязи между маркерами тиреоидного гомеостаза и тяжестью неврологического функционального дефицита при остром гетерогенном ишемическом инсульте.

В исследование были включены 158 пациентов с острым ишемическим инсультом. При анализе факторов риска ишемического инсульта в исследуемой когорте пациентов преобладали артериальная гипертензия III ст., фибрилляция предсердий, ИБС. Подавляющее число пациентов переносили ишемический инсульт в каротидном бассейне, ведущим подтипом гетерогенного ишемического инсульта являлся атеротромботический.

В ходе корреляционного анализа выявлена статистически значимая связь между целым рядом показателей, включая обнаруженную умеренную положительную корреляцию между уровнем св. Т3 и суммой баллов по Скандинавской шкале ($r=0,44$), отрицательную умеренную корреляцию между уровнем св. Т4 и суммой баллов по Скандинавской шкале ($r=-0,23$), умеренную положительную корреляцию между соотношением св. Т3/св. Т4 и суммой баллов по шкале MMSE ($r=0,4$), умеренную положительную корреляцию между уровнем св. Т3 и суммой баллов по шкале MMSE ($r=0,39$) и рядом других показателей.

Результаты корреляционного анализа демонстрируют, что уровень св. Т3 был ассоциирован с более высокими баллами по Скандинавской шкале, т.е. с менее тяжелым неврологическим дефицитом в острый период инсульта, а также с более высокими показателями по шкале MMSE. Для св. Т4 был характерен обратный эффект. В ходе корреляционного анализа обращало на себя внимание отсутствие корреляционной связи между уровнями ТТГ и св. Т4. В норме содержание св. Т4 в сыворотке регулируется уровнем ТТГ, в свою очередь продукция ТТГ регулируется уровнем Т4 по принципу биологической обратной связи. В опубликованных в течение последних лет исследованиях показано, что в норме изменение ТТГ на отклоняющееся значение ст. Т4 может быть не лог-линейным, а непропорционально связанным со степенью отклонения от оптимальной заданной точки, на основании данной концепции предложены новые статистические модели [103; 105]. Вместе с тем, мы не обнаружили ни корреляционного, ни регрессионного взаимоотношения между ТТГ и ст. Т4 в нашем исследовании, что может быть следствием нарушения гипоталамо-тиреоидной оси регуляции тиреоидного гомеостаза при ишемическом инсульте [194; 392].

Для оценки независимого от действия других предикторов влияния свободного трийодтиронина на тяжесть неврологического дефицита в остром периоде инсульта был проведен мультивариантный регрессионный анализ. С увеличением уровня св. Т3 на 1 пмоль/л сумма баллов по Скандинавской шкале увеличивалась на 3 балла (95% ДИ 0.15 - 5.91). При этом повышение уровня св. Т4 ассоциировано с уменьшением суммы баллов по Скандинавской шкале

(увеличение тяжести дефицита), однако, данный эффект не достигал статистической значимости ($p=0,06$). Обращает на себя внимание, что такие показатели, как ТТГ, соотношение св. Т3/св. Т4, а также ряд базисных факторов риска исключены из регрессии, как не влияющие на качество модели.

Для оценки ассоциации между высоким уровнем св. Т3 в остром периоде ишемического инсульта и его более благоприятным течением был проведен дисперсионный анализ. Тест ANOVA показал, что у пациентов с уровнем свободного трийодтиронина в IV квинтиле (≥ 5.35 пмоль/л; 95% ДИ 5,01 – 5,61) неврологический дефицит был менее выражен по сравнению с пациентами с уровнем трийодтиронина во II-III квинтилях (медиана по шкале SSS 48 баллов и 37 баллов соответственно, $p = 0,0481$) и значительно менее выражен по сравнению с пациентами, у которых уровень трийодтиронина находился в I квинтиле ($\leq 3,4050$ пмоль/л, медианы по шкале SSS 48 и 30 баллов соответственно, $p=0,0018$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что низкий уровень трийодтиронина ассоциирован с более тяжелым неврологическим дефицитом, в то время как его высокий уровень связан с более благоприятным течением инсульта. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными об ассоциации «синдрома низкого Т3» и неблагоприятного исхода инсульта [256; 257; 373]. Вместе с тем, в литературе опубликованы лишь единичные работы, в которых изучалось влияние трийодтиронина на неврологический дефицит в острейшую фазу инсульта [56; 442]. Проведенный в нашем исследовании дисперсионный анализ позволил выявить ассоциацию высоких уровней св. Т3 с более благоприятным течением инсульта в острую фазу. Следует отметить, что данная ассоциация не была ранее продемонстрирована в аналогичных исследованиях, при выполнении которых в большей степени внимание уделялось роли низких уровней св. Т3.

Через 6 месяцев с момента развития инсульта функциональные его исходы у 114 пациентов были классифицированы как неблагоприятные (3-6 баллов по модифицированной шкале Рэнкина), у 44 пациентов сохраняющийся

неинвалидизирующий дефицит позволил классифицировать исходы как с благоприятные (0-2 балла по модифицированной шкале Рэнкина).

Для определения предикторов, влияющих на функциональный исход инсульта по всему спектру шкалы mRs был использован метод порядковой логистической регрессии. Анализ результатов моделирования показал, что увеличение уровня св. Т3 на 1 пмоль/л ассоциировано со снижением шанса более тяжелого функционального исхода инсульта (больше баллов по шкале mRs) на 56% при прочих равных условиях.

С целью преодоления возможных нарушений требований к порядковой логистической регрессии нами был применён метод векторной обобщенной линейно-аддитивной модели (VGLM/VGAM). Анализ показал, что увеличение уровня св. Т3 на 1 пмоль/л ассоциировано со снижением шанса более тяжелого функционального исхода инсульта (больше баллов по шкале mRs) на 67% при прочих равных условиях. Другими факторами, влияющими на исход инсульта, помимо его изначальной тяжести, являлись возраст, систолическое артериальное давление, уровень С-реактивного белка.

Обе использованные модели демонстрируют ассоциацию высоких уровней свободного трийодтиронина с более высокими шансами благоприятного функционального исхода инсульта. Для прогнозирования исхода ишемического инсульта по дихотомизированному отклику (0-2 балла по шкале mRs против 3-6 баллов) была использована обобщенная модель бинарной регрессии (GLM).

Согласно данным пробит-регрессии, увеличение уровня св. Т3 на 1 пмоль/л ассоциировано со снижением шанса неблагоприятного функционального исхода инсульта (более 2 баллов шкале mRs) на 46% при прочих равных условиях.

Результаты статистического анализа продемонстрировали, что уровень св. Т3 является независимым фактором, оказывающим влияние на тяжесть неврологического дефицита в острый период ишемического инсульта и на его функциональный исход. Вместе с тем, практический клинический интерес представляет собой использование данной ассоциации для раннего прогнозирования функциональных исходов ишемического инсульта.

Для прогнозирования функциональных исходов ишемического инсульта с целью практического применения в клинической практике нами был разработан диагностический алгоритм на основе технологии машинного обучения. При анализе с применением тестовой когорты и построения матрицы неточностей, установлено, что предложенный алгоритм обладает точностью 92,6%, чувствительностью 88% и специфичностью 96%. Следует отметить, что предложенный алгоритм может быть легко интегрирован в клиническую практику, т.к. требует всего лишь двух лабораторных показателей и оценку неврологического дефицита по доступной Скандинавской шкале. Прогностическая эффективность и простота предложенного метода подтверждена при его внедрении в ряд клинических учреждений.

Результаты многофакторного прогностического моделирования позволяют выделить уровень свободного трийодтиронина в первые 24 часа после развития инсульта как независимый статистически значимый предиктор его функционального исхода. В ходе исследования удалось продемонстрировать влияние трийодтиронина на исход ишемического инсульта не только в рамках дихотомизированной конечной точки, но и по всему спектру модифицированной шкалы Рэнкина. Данный факт особенно важен с учетом рекомендаций Европейской организации по борьбе с инсультом (ESO) о преимуществах ординарного (порядкового) подхода в выборе конечных точек для оценки функционального исхода [305–307]. Полученные результаты дают теоретические основания предполагать, что назначение синтетических аналогов трийодтиронина пациентам с ишемическим инсультом позволит улучшить функциональные исходы, в том числе, вне пределов так называемого «благоприятного» диапазона (0-2 балла по шкале mRs).

Преимуществами настоящего исследования является выбор порядковой конечной точки (весь спектр шкалы mRs), а не только дихотомизированного подхода, при котором теряется часть статистической информации о влиянии потенциальных предикторов на исход ИИ. Также разница между данным и аналогичными исследованиями заключается в том, что в нашем исследовании с

применением различных статистических методов продемонстрирована ассоциация высоких уровней свободного трийодтиронина (в том числе выше референтного интервала) и менее выраженного неврологического дефицита в острую фазу. Применение актуальных статистических методов (тест Кохрена-Мантеля-Хэнзеля, SMH-test) позволило исключить влияние вмешивающихся факторов (таких как возраст и исходная тяжесть инсульта) на выявленную статистическую ассоциацию высоких уровней св. Т3 с более благоприятными функциональными исходами ИИ.

Полученные результаты согласуются с рядом исследований, выполненных в течение последнего времени. Согласно данным мета-анализа, представленным Jiang et al. в 2017 г., пациенты с неблагоприятным функциональным исходом ИИ имели более низкий уровень трийодтиронина и более высокий уровень тироксина [326]. Мета-анализ включал данные 3936 пациентов из 11 исследований. Lena M. O'Keefe и соавт. при обследовании 868 пациентов с гетерогенным ишемическим инсультом обнаружили, что низкий уровень трийодтиронина был связан с большей функциональной недостаточностью через 3 месяца после инсульта и с большей внутрибольничной смертностью, хотя данная ассоциация не была подтверждена в ходе мультивариантного анализа [392]. Результаты другого исследования, включавшего 833 пациента с острым ишемическим инсультом, показывают, что низкие уровни общего трийодтиронина (даже в пределах нормы) были связаны с неблагоприятным исходом ИИ [226].

Примечательно, что в нашем исследовании было отмечено разнонаправленное действие Т3 и Т4 на исход инсульта, хотя влияние Т4 не достигало статистической значимости. Гормоны Т3 и Т4 имеют схожую химическую структуру и биологическую функцию, но в данном исследовании они демонстрируют противоположные эффекты по отношению к исходам инсульта. В периферической крови большая часть Т3 (80–90%) превращается из Т4 под действием дейодиназ. Это преобразование может быть подавлено в состоянии клинического стресса.

Известно, что в течение нескольких часов после начала инсульта концентрация Т3 в плазме снижается [373]. Связь между снижением концентрации

T3 и большей тяжестью инсульта была подтверждена в недавно проведенном мета-анализе [48]. Наше исследование также показало обратную связь между концентрацией св. T3 и тяжестью неврологического дефицита в острейший период, а также в фазу последствий инсульта. Следует отметить, что по данным ряда авторов ассоциация более низкого уровня T3 и тяжести инсульта уменьшалась в пожилом возрасте, что связывалось с адаптивным снижением уровня св. T3 [48]. В нашем исследовании с применением различных методов статистического моделирования (дисперсионный, регрессионный анализ, машинное обучение) было обнаружено, что ассоциация между более низким уровнем св. T3, тяжестью неврологического дефицита и неблагоприятным исходом сохранялась даже после поправки на возраст и другие предикторы. В этом контексте наше исследование продемонстрировало, что более низкий уровень св. T3 влияет на риск неблагоприятного исхода инсульта вне зависимости от возраста. С учетом наших данных, а также имеющихся публикаций о снижении уровня трийодтиронина на фоне повышения уровня тироксина у лиц пожилого возраста, целесообразно считать возраст-ассоциированное снижение трийодтиронина дезадаптивным процессом, вероятно, связанным с нарушением периферической трансформации тироксина.

Полученные нами клинические данные коррелируют с фундаментальными исследованиями, проведенными в последние годы. В экспериментальных моделях было показано, что введение L-тироксина после преходящей церебральной ишемии способствует увеличению плотности нейронов и стимуляции ангиогенеза в ишемизированном мозге [319]. Результаты другого *in-vitro* исследования показали, что трийодтиронин может восстанавливать внутриклеточную концентрацию натрия, ионов кальция и pH [110]. Было продемонстрировано, что тироксин стимулирует синтез других нейротрофических факторов, таких как фактор роста фибробластов [285].

Тщательно проведенный анализ литературных данных позволил нам предположить, что разнонаправленное действие тироксина и трийодтиронина может быть связано с новым механизмом, представляющим еще один уровень

ауторегуляции тиреоидного гомеостаза – активностью дейодированных форм тиреоидных гормонов. Тиронамины представляют собой эндогенные молекулы, образующиеся из гормонов щитовидной железы путем дейодирования и декарбоксилирования [299]. Пик исследования этих веществ начался несколько лет назад, когда их стали рассматривать как потенциальные лиганды для нового класса G-белок-сопряженных рецепторов, получивших название TAARs (Trace amine-associated receptors). Интересно, что большинство биологических эффектов тиронаминов осуществляется посредством TAARs, GPCR и TRP рецепторов клеточных мембран, при этом не затрагиваются классические T3-рецепторы [240].

Примечательно, что в дополнение к структурным сходствам T1AM и TГ, T1AM также, как моноаминовые нейротрансмиттеры, содержит арилэтиламиновый каркас, благодаря чему, вероятно, может проявлять свойства нейромодулятора [214]. Таким образом, есть основание предполагать, что в число основных целей тиронаминов входит также и центральная нервная система [93].

Физиологические функции тиронаминов остаются окончательно неизученными. В некоторых аспектах метаболизма действие тиронаминов противоположно действию TГ, в других – синергично [399]. В 2004 г. Scanlan et al. продемонстрировали быстрое и мощное воздействие T1AM на термоэнергетический гомеостаз и метаболизм у крыс [41]. Внутривенное и внутрибрюшинное введение T1AM лабораторным животным вызывало такие эффекты, как гипотермия, гиподинамия, метаболическая депрессия, снижение частоты дыхания, снижение жировой массы, отрицательные хроно- и инотропный эффекты, кетонурия. Гипотермическое действие тиронамина T1AM и его синтетических аналогов было подтверждено целым рядом исследований [37; 93; 140; 344], при этом дейодированный вариант тиронамина T0AM изучался значительно менее интенсивно.

В проведенных экспериментальных исследованиях было показано, что тиронамин (T0AM) и T1AM присутствуют в различных тканях грызунов, при этом T1AM более распространен [121; 145]. Вероятно, поэтому, несмотря на активное

исследование физиологических эффектов 3-T1AM, роль T0AM изучалась менее интенсивно, что и послужило основанием начать экспериментальное исследование.

Для доказательства связи нейропротекторных эффектов тиреоидных гормонов с их дейодированными метаболитами – тиронаминами, был синтезирован синтетический аналог тиронамина T0AM (Ca-T0AM).

Прежде всего, следует отметить, что разработанный нами синтетический аналог тиронамина проявлял выраженный гипотермический эффект даже на фоне действия других индукторов гипотермии, что не было ранее продемонстрировано в литературных данных. Статистически значимая разница в средних показателях температуры в группе животных, которым вводился Ca-T0AM в сочетании с галотановым наркозом и контрольной группе, в которой животные были подвергнуты только воздействию галотана, отмечалась с 21-й минуты исследования ($33,47\text{ }^{\circ}\text{C}$, 95% ДИ $33,1\text{--}34,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ в экспериментальной группе и $33,97\text{ }^{\circ}\text{C}$, 95% ДИ $33,7\text{--}34,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ в контрольной группе, $p = 0,0121$) и сохранялась до конца исследования. Через 60 минут после начала эксперимента средняя температура в экспериментальной группе была по-прежнему на $1,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ниже, чем у контрольных животных ($p \leq 0,0001$).

Интерес представляет обнаруженное в ходе исследования независимое от галотана влияние тиронаминов на термогенез. Галотан также является криогеном, действие которого, по-видимому, основано на ингибировании норэпинефрин-индуцированного термогенеза в жировой ткани и непосредственном воздействии как на центральные, так и на периферические механизмы терморегуляции. Норэпинефрин, выделяясь из симпатических нервов в ответ на холодовую стимуляцию, активирует термогенез в жировой ткани, запуская целый каскад процессов, приводящих к липолизу триглицеридов с последующим выделением свободных жирных кислот. В свою очередь, свободные жирные кислоты сжигаются митохондриями без регуляторного участия дыхательного контроля из-за действия ткань-специфического белка термогенина (UCP), разобщающего дыхание и фосфорилирование. Следствием этого процесса является рассеяние избытка энергии в виде тепла. Однако применение галотана значительно угнетает

норэпинефрин-индуцированный термогенез, причем этот эффект является обратимым, дозозависимым и не представляет собой вторичное следствие гипотермии и/или гипоксии [198; 299]. Со своей стороны, тиронамин модулирует активность субмитохондриальных частиц и растворимой субъединицы F1 АТФазы, снижая потребление кислорода и усиливая продукцию перекиси водорода митохондриями. Таким образом, снижение температуры тела в ответ на введение тиронаминов реализуется прежде всего посредством подавления митохондриальных функций. Со стороны центральных механизмов терморегуляции важную роль может играть нарушение тиронаминами обратного захвата и транспортировки норэпинефрина и дофамина в синаптические пузырьки, за счет чего блокируется запуск процессов термогенеза [283].

Следует отметить, что, помимо фармакологических подходов, высокий уровень нейрозащиты был выявлен при использовании двух нефармакологических стратегий – терапевтической гипотермии и ишемического прекондиционирования [347; 440]. Механизм защиты, лежащий в основе обоих подходов, связан с подавлением клеточного и тканевого метаболизма. Многочисленные исследования показали влияние терапевтической гипотермии на снижение нейротоксичности и выработки активных форм кислорода, уменьшение отека мозга и предотвращение разрушения гематоэнцефалического барьера. Один из возможных механизмов заключается в том, что гипотермия ингибирует матриксные металлопротеиназы и защищает белки базальной мембраны после инсульта [407]. Эффект гипотермии также коррелирует с благоприятными изменениями экспрессии генов, противовоспалительными и антиапоптотическими эффектами, способствующими процессам восстановления. Многие исследования показывают, что гипотермия изменяет экспрессию ряда генов после развития ишемического повреждения головного мозга [276; 408]. В то время, как экспрессия большинства генов подавляется в условиях гипотермии, экспрессия некоторых генов, напротив, активируется. Причины дифференциальной экспрессии генов неясны, но могут быть связаны с температурной зависимостью транскрипционных факторов или усиливающей регуляцией белков холодового шока [408]. Гипотермия оказывает на

клетки антиапоптотические эффекты, такие как снижение высвобождения цитохрома С и ингибирование каспаз и проапоптотических генов [259; 274; 275].

Индукция гипотермии у человека является достаточно сложной задачей. Для снижения температуры может потребоваться несколько часов, а быстрое восстановление до исходных величин способствует усугублению отека мозга. Кроме того, гипотермия сопряжена с рядом компенсаторных, но нежелательных эффектов, таких как вазоспазм, активация дрожательного термогенеза, гиповолемия, брадикардия и др. [2]. Окончательно неясен риск осложнений при гипотермии, прежде всего пневмоний и острых васкулярных событий. Проведенное нами исследование демонстрирует, что в оптимальных дозах 50-75 мг/кг синтетический аналог тиронамина вызывает обратимую гипотермию, не сопровождающуюся ознобом, пилоэрекцией, тахикардией, двигательным возбуждением и другими нежелательными явлениями.

После подтверждения гипотермических свойств синтетического аналога тиронамина на следующем этапе работы была сформирована новая группа животных для оценки нейропротекторных свойств разработанного препарата в модели острой полушарной церебральной ишемии. На третьи сутки после ишемии у интактных животных показателей NSS-теста составил 1 балл. Это несколько выше ожидаемого показателя (0 баллов), что может быть связано с возрастом экспериментальных животных. После операции у ложнооперированных особей результаты NSS-теста не отличались от нормы (1, 3, 7 сут. – 1 балл). У крыс с ишемией на первые сутки наблюдался выраженный неврологический дефицит (3 баллов), который сохранялся вплоть до 7 суток (2 балла). У животных на фоне терапии показатель NSS-теста не отличался от нормальных значений (1 балл), а к концу наблюдений (7 сутки) даже превзошел дооперационный результат (0 баллов).

Следует также отметить, что показатели тревожности (вертикальные стойки) у животных с ишемией ухудшались в сравнении со здоровыми и ложнооперированными крысами, но лечение аналогом тиронамина приводило к улучшению этого критерий вдвое.

Влияние синтетического аналога тиронамина на когнитивные функции исследовалось путем анализа времени прохождения животными Т-лабиринта. До операции животные успешно справлялись с прохождением Т-лабиринта за 29 сек. После ложной операции время прохождения возросло до 158 сек., а число ошибок стало преобладать над правильными решениями. У крыс контрольной группы правильных решений было больше, чем ошибок, но время прохождения задания у них также увеличилось – до 104 сек. Напротив, терапия СА-Т0АМ привела к тому, что правильные решения крысами принимались за 12 сек., что однозначно указывает на улучшение когнитивных способностей под влиянием синтетического аналога тиронамина, даже в сравнении с предоперационными показателями.

Таким образом, данные анализа поведенческих реакций и тяжести неврологического дефицита демонстрируют способность синтетических аналогов тирамина улучшать функциональные исходы острой экспериментальной ишемии головного мозга, и в том числе способствовать восстановлению когнитивных функций.

Начиная с 2017 г. в литературе появляются публикации о способности тиронамина Т1АМ и его синтетического аналога SG-2 модулировать поведенческие реакции у животных в моделях различных неврологических заболеваний. Исследования Bellusci et al. демонстрируют, что при внутривенном введении мышам как Т1АМ, так и SG-2 вызывали эффекты улучшения памяти и гипералгезии, что реализуется через увеличение фосфорилирования ERK1/2 и экспрессию транскрипционного фактора *c-fos* [299]. Однако сведения о биологической роли Т0АМ практически отсутствуют. Согласно полученным в экспериментальной части настоящего исследования данным, Т0АМ является не только конечным метаболитом тиреоидных гормонов, но и обладает биологическими эффектами, сходными с Т1АМ. Учитывая проницаемость Т0АМ для гематоэнцефалического барьера, о чем свидетельствует скорость наступления биологических эффектов, синтетические аналоги данной субстанции представляются потенциальными кандидатами для разработки лекарственных форм.

Заключительным этапом диссертационной работы явилось генетическое аналитическое исследование, направленное на выявление взаимосвязи между маркерами тиреоидного статуса и ассоциированных с ними промежуточных фенотипов, и исходов острых нарушений мозгового кровообращения. Результаты анализа подтверждают наличие причинно-следственной связи между уровнем св. Т3 и функциональным исходом ишемического инсульта. Согласно полученным данным, генетически прогнозируемое повышение уровня свободного трийодтиронина на 1 пмоль/л ассоциировано со снижением риска неблагоприятного исхода ИИ на 18%. Насколько нам известно, данный этап диссертационной работы является единственным исследованием, направленным на использование менделевской рандомизации в оценки влияния фенотипов, ассоциированных с тиреоидным статусом, на функциональный исход ИИ. Вместе с тем, результаты нашего исследования согласуются с рядом клинических исследований, посвященных изучению прогностической значимости концентрации свободного Т3 в сыворотке крови больных с острым ишемическим инсультом [257; 373]. В 2018 году был проведен мета-анализ публикаций по данному вопросу в международных наукометрических базах данных. Авторы анализа пришли к выводу, что снижение уровня свободного Т3 в сыворотке крови больных после острого ишемического инсульта является достоверным прогностическим критерием, который прямо коррелирует с тяжестью последующих осложнений и вероятностью неблагоприятного исхода [326].

Возможно несколько механизмов влияния тиреоидных гормонов на тяжесть и исход ишемического инсульта.

Согласно современным представлениям, основные эффекторные механизмы тиреоидных гормонов реализуются через активацию ядерных рецепторов тиреоидных гормонов (nuclear thyroid receptor, nTR), подобно действию стероидных гормонов. Гораздо менее изученными остаются негеномные механизмы действия ТГ. Эффекты тиреоидных гормонов, не затрагивающие клеточное ядро, транскрипцию и трансляцию генов, реализуются в течение нескольких минут после активации рецепторов, расположенных на клеточной

мембране, в цитоплазме или в митохондриях. Данные рецепторы могут имеют гомологичное сходство с ЯРТГ или существенно отличаться, например, как интергерин $\alpha\upsilon\beta 3$. Регулируемые геномными и негеномными эффектами тиреоидных гормонов биологических процессы могут совпадать [246; 410].

Потенциальный нейропротекторный эффект тиреоидных гормонов может быть связан с их влиянием на процессы апоптоза. Экспериментальные модели инсульта демонстрируют, что большинство клеток в ранних периодах формирования пенумбры сохраняют свою жизнеспособность и могут выжить при своевременном восстановлении кровотока [231]. При критической кумуляции внутриклеточных повреждений клетки в зоне пенумбры вступают на путь запрограммированной (апоптоз) или незапрограммированной (некроз) клеточной смерти.

Исследование промежуточных фенотипов методом менделевской рандомизации позволило нам обнаружить влияние экспрессии гена *THRB* на уровень ряда белков плазмы, ассоциированных с регуляцией апоптоза, в частности с протеинами BCL-2 и MAPK. BCL-2 является одним из главных белков системы клеточного сигнализации BCL и обладает выраженным антиапоптогенным действием. В экспериментальных исследованиях, проведенных Zhao et al. в 2003 г., показано, что увеличение экспрессии Bcl-2 защищает от потери нейронов в пределах пенумбры в модели экспериментального инсульта, а также ингибирует транслокацию цитохрома c и активность каспазы-3 [75]. В дальнейшем было показано, что субстанции, усиливающие экспрессию BCL-2, такие как аликсирен и эллаговая кислота, обладают нейропротекторным действием при острой церебральной ишемии [148; 327].

Полученные данные анализа промежуточных фенотипов свидетельствуют о том, что одним из механизмов влияния тиреоидных гормонов на функциональный исход инсульта является способность ядерных рецепторов тиреоидных гормонов осуществлять модуляцию апоптоза путем активации систем BCL-2 и MAPK.

Обнаруженное в ходе как клинического, так и менделевского исследования разнонаправленное действие трийодтиронина и тироксина на функциональный

исход инсульта позволило предположить клинически значимую роль дейодиназ во влиянии на исход инсульта. Дополнительным подтверждением данной гипотезы является обнаруженная нами взаимосвязь экспрессии гена дейодиназы 2 типа с риском развития лакунарного инсульта. При увеличении экспрессии гена DIO2 в мозжечке на 1 ТМР (1 транскрипт на 1 миллион) риск развития лакунарного инсульта снижается на 11%. В доступных базах данных мы не идентифицировали достаточного количества инструментальных переменных для анализа непосредственного влияния дейодиназ на риск неблагоприятного исхода ишемического инсульта. Однако, поскольку дейодиназы являются селенозависимыми ферментами, мы предположили, что уровень селена может играть роль промежуточного фенотипа. В ходе исследования установлено, что генетически прогнозируемое повышение уровня содержания селена на 1 мкг/г (в ногтях нижних конечностей) ассоциировано со снижением риска неблагоприятного исхода на 80% (ОШ=0,2, 95% ДИ 0,1-0,81).

Дейодиназы (йодтиронин-5'-дейодиназы типа I и II) – ферменты, катализирующие удаление остатка йода в молекуле прогормона тироксина (Т4), превращая ее либо в активную (Т3), либо в неактивную (обратный Т3, оТ3) форму трийодтиронина. Дейодиназы являются селенсодержащими белками и синтезируются, наряду с еще несколькими селенопротеинами, в щитовидной железе – органе с высоким содержанием данного микроэлемента. Клеточное поглощение различных соединений селена в организме до конца не изучено. Один из основных механизмов поглощения селена клетками включает селенопротеин Р, секретируемый печенью и циркулирующий в крови, где на его долю приходится 70% содержания селена. Нокаутирование гена селенопротеина Р, тем не менее, не влияет на содержание селена и функцию селенопротеинов в щитовидной железе. Таким образом, поглощение селена щитовидной железой, по-видимому, не зависит от снабжения селеном, переносимым селенопротеином Р, и в большей степени зависит от локальной независимой и/или резервной системы синтеза и транспорта селенопротеинов [185].

Выраженная тканеспецифичность экспрессии дейодиназ требует более детального изучения взаимосвязи между этими ферментами и проявлением действия гормонов щитовидной железы, которое опосредовано семейством ядерных рецепторов Т3 или рецепторами и сигнальными молекулами в митохондриях, плазматической мембране и/или цитоскелете. Расположение ферментов дейодиназы либо на внутренней стороне плазматической мембраны, либо на цитозольной стороне эндоплазматического ретикулума помещает эти ферменты в стратегически важное место, позволяя им действовать в качестве привратников ядерных рецепторов. Подобно другим ферментам, участвующим в активации или инактивации соединений с гормональной или сигнальной функцией, дейодиназы являются ключевыми элементами интракринной регуляции активации гормонов в тканях-мишенях или инактивации в тканях, не являющихся мишенями. Следовательно, необходим подробный молекулярный, клеточный биологический и физиологический анализ функции, регуляции и структуры генов этих ферментов, прежде чем станет возможной разработка ткане- или фермент-специфического фармакологического вмешательства в их работу [92]. Однако, не имея возможности оказывать прямое воздействие на дейодиназы, вероятно, можно оказывать опосредованное влияние на степень их активности, регулируя уровни потребления селена.

Таким образом, есть все основания рассматривать селен как один из ключевых факторов, влияющих на ряд метаболических процессов, происходящих в щитовидной железе, в частности, на активацию тиреоидных гормонов. Это, в свою очередь, является предпосылкой для назначения препаратов селена при комплексном лечении последствий ишемического инсульта препаратами тироксина с целью улучшения исхода заболевания.

Использование современных аналитических технологий в области генома человека, таких как обобщенная менделевская рандомизация, исследование локусов количественных признаков и GWAS-исследования, позволило провести анализ влияния экспрессии большого количества генов на функциональный исход ишемического инсульта. Выполнение подобного анализа стало возможным

благодаря интеграции генетических ассоциаций, полученных в различных исследованиях и представленных в виде суммарных или индивидуальных данных в крупных генетических консорциумах, таких как GISCOME, проекты BrainMeta и 1000Genomes.

В ходе анализа влияния экспрессии генов в ткани головного мозга на функциональный исход ишемического инсульта был идентифицирован ряд приоритетных генов, экспрессия которых контролируется в головном мозге тиреоидными гормонами. Увеличение экспрессии данных генов под влиянием тиреоидных гормонов ассоциировано с уменьшением риска более тяжелого функционального исхода ишемического инсульта.

Ген ANI1 (Abelson Helper Integration Site 1) является критически важным для нормального развития как мозжечка, так и коры большой полушарий у человека [52; 162]. Мутации этого гена вызывают специфические формы расстройств, связанных с синдромом Жубера – рецессивно наследуемым нарушением развития головного мозга [230]. Ген ANI1 кодирует белки, имеющие отношение к биосинтезу и поддержанию нормального функционирования органелл, и, в частности, цилий (ресничек). Участвует в дифференцировке нейронов. Этот ген вовлечен в перенос везикул и необходим для нормального цилиогенеза, формирования первичной (неподвижной) реснички – структуры, передающей сигналы в клетку из окружающей среды, а также от окружающих клеток. Он участвует в рекрутировании гена RAB8A в базальном теле первичной реснички [72; 255]. Процесс рекрутирования генов заключается во встраивании нового гена в уже существующую регуляторную систему, что приводит к увеличению сложности генома. Ген ANI1 входит в тектоноподобный комплекса (B9-комплекс), локализованный в переходной зоне первичных ресничек и выполняющий роль барьера, препятствующего диффузии трансмембранных белков между ресничками и плазматической мембраной. Как положительный модулятор классического сигнального пути Wnt (одного из внутриклеточных сигнальных путей, регулирующих эмбриогенез, дифференцировку клеток и развитие злокачественных

опухолей), может играть решающую роль в передаче сигналов ресничек во время эмбрионального развития мозжечка [396].

Ген ADRA2A (Adrenoceptor Alpha 2A) кодирует белок, являющийся представителем альфа-2-адренергических рецепторов, входящих в суперсемейство рецепторов, сопряженных с G-белком (G protein-coupled receptor), также известных как семиспиральные, или серпантинные трансмембранные рецепторы [55; 69]. GPCR выполняют функцию активаторов внутриклеточных путей передачи сигнала. Альфа-2-адренорецепторы ингибируют аденилатциклазу. Они вовлечены в процессы регуляции высвобождения молекул нейротрансмиттеров из симпатических нервов и из адренергических нейронов в ЦНС. Исследования на мышцах показали, что оба подтипа рецепторов – альфа2A и альфа2C необходимы для высвобождения пресинаптического медиатора из симпатической нервной системы в сердце и из норадренергических нейронов ЦНС [50; 55]. Альфа-2-адренорецепторы также участвуют в передаче сигналов катехоламинов внеклеточно регулируемые сигнальными путями протеинкиназ 1 и 2 (ERK1/2). Данные пути могут быть активированы внеклеточными сигналами, такими как гормоны, факторы роста, хемокины и нейротрансмиттеры, которые распознаются соответствующими рецепторными тирозинкиназами или рецепторами, ассоциированными с G-белками. Передача сигнала по ERK-пути в конечном итоге приводит к выживанию, пролиферации и увеличению подвижности клеток. С ADRA2A ассоциирован также синдром дефицита внимания и аутизм [47]. Среди связанных с ним путей – нисходящий сигнальный путь GPCR и ответ на повышенный цитозольный Ca²⁺ тромбоцитов.

Ген PYGO1 (Pygopus Family PHD Finger 1) является протеин-кодирующим белком, обеспечивающим активность связывания метилированных гистонов. Предположительно локализован в ядре. Предполагается, что этот ген участвует в развитии почек, дифференцировке гемопоэтических клеток-предшественников и созревании сперматид. Вовлечен в сигнальную передачу Wnt [222; 272; 428; 436].

Ген CHCHD10 (Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 10) кодирует митохондриальный белок, сконцентрированный в местах соединения

крист в межмембранном пространстве. Он может играть роль в поддержании морфологии крист или принимать участие непосредственно в окислительном фосфорилировании [95; 96; 168; 288]. Также ген CHCHD10 участвует в сигнальном пути, связанном с метаболизмом липидов пероксисом. Мутации в этом гене вызывают лобно-височную деменцию, боковой амиотрофический склероз [356]. Среди других заболеваний, ассоциированных с CHCHD10, указывают изолированную митохондриальную и аутосомно-доминантную миопатию и спинальную амиотрофию Джокела [245]. Альтернативный сплайсинг этого гена приводит к образованию множественных вариантов транскриптов. Связанные с CHCHD10 псевдогены (нефункциональные аналоги структурных генов, утратившие способность кодировать белок и не экспрессирующиеся в клетке) были идентифицированы на хромосомах 7 и 19.

Ген HDAC9 (Histone Deacetylase 9) кодирует белок, последовательность которого гомологична членам семейства гистоновых деацетилаз – ферментов, родственных сиртуинам. Они катализируют удаление ацетильной группы из остатков лизина в гистонах и негистоновых белках, вызывая репрессию транскрипции [366]. Ген HDAC9 отвечает за деацетилирование остатков лизина на N-концевой части коровых гистонов (H2A, H2B, H3 и H4). Ацетилирование/деацетилирование гистонов изменяет структуру хромосом и влияет на доступ факторов транскрипции к ДНК. Деацетилирование гистонов указывает на эпигенетическую репрессию и играет важную роль в регуляции транскрипции, развитии клеток и событиях клеточного цикла. Репрессирует MEF2-зависимую транскрипцию, регулирующую экспрессию генов, участвующих в эмбриональном развитии, а в отдельных тканях взрослого организма опосредующую стресс-реакции. Репрессия эта осуществляется за счет рекрутирования генов HDAC1 и/или HDAC3. Предположительно Ген HDAC9 ингибирует скелетный миогенез и участвует в развитии сердца, а также защищает нейроны от апоптоза как за счет ингибирования фосфорилирования JUN с помощью MAPK10, так и за счет репрессии транскрипции JUN посредством рекрутирования HDAC1 на промотор JUN [70; 365; 366; 445].

Ген TMEM74 (Transmembrane Protein 74) участвует в макроаутофагии. Предположительно находится в мембране аутофагосом, цитоплазматических везикул и лизосомальной мембраны. Предполагается, что он интегрирован в клеточную мембрану. Аутофагия, индуцированная TMEM74, может включать передачу сигнала PI3K. Сигнальный путь PI3K/АКТ/mTOR — внутриклеточный сигнальный путь, центральными компонентами которого являются ферменты фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), киназы АКТ и mTOR [405]. Это один из универсальных сигнальных путей, характерных для большинства клеток человека.

Ген TMTC1 (Transmembrane O-Mannosyltransferase Targeting Cadherins 1) обеспечивает активность маннозилтрансферазы. Участвует в O-маннозилровании белка. Многие белки содержат короткие неразветвленные маннозные цепи, которые присоединены к молекуле белка при помощи O-гликозидной связи между остатком маннозы и гидроксильной группой серина или треонина [215]. Эта связь разрушается при действии слабой щелочи (β -элиминирование). O-связанные полисахаридные цепочки содержат от одного до пяти маннозильных остатков. Олигосахариды такого типа локализуются преимущественно в Ser/Thr-богатых областях белков, которые, вероятно, имеют жесткую (негибкую) и вытянутую конформацию. Ген TMTC1 переносит остатки маннозила на гидроксильную группу остатков серина или треонина. Четыре члена семейства генов TMTC представляют собой O-маннозилтрансферазы, предназначенные в первую очередь для надсемейства кадгеринов. Предположительно каждый ген играет свою роль в прикреплении к определенным областям доменов кадгерина O-связанных маннозных гликанов. Также они действуют как O-маннозилтрансфераза на другие белки, такие как PDIA3 [406]. Предполагается локализация гена TMTC1 в эндоплазматическом ретикулуме и интеграция в клеточную мембрану. С этим геном ассоциированы шизофрения и сахарный диабет 1 типа [107; 120].

Ген PRNP (Prion Protein) кодирует белок, представляющий собой мембранный гликозилфосфатидилинозитол-заякоренный гликопротеин, который имеет тенденцию к агрегации в палочковидные структуры. Кодированный белок содержит крайне нестабильную область из пяти тандемных октапептидных

повторов. Ген PRNP располагается на хромосоме 20, приблизительно на 20 килобаз выше гена, кодирующего биохимически и структурно похожий белок. Мутации в области повторов, а также в других местах этого гена ассоциированы с болезнью Крейтцфельдта-Якоба, фатальной семейной бессонницей, болезнью Герстманна-Штраусслера, болезнью Гентингтона и куру [46]. Для этого гена была обнаружена перекрывающаяся открытая рамка считывания, которая кодирует меньший по размеру структурно неродственный белок AltPrp [205]. Альтернативный сплайсинг приводит к формированию множественных вариантов транскриптов. Ген PRNP является важным для процессов развития нервной системы. Хотя его основная физиологическая функция неясна, но предполагается участие в развитии нейронов и обеспечении синаптической пластичности, поддержания функционирования миелиновой оболочки нейронов. Возможно, он необходим для обеспечения гомеостаза миелина, действуя как агонист рецептора ADGRG6, важного для процессов миелинизации и демиелинизации [432]. Растворимые олигомеры белка, кодируемого PRNP, токсичны для культивируемых клеток нейробластомы и индуцируют апоптоз *in vitro*. Он предположительно участвует в селективном и нековалентном связывании идентичных белков и шаперонов (белков, восстанавливающих правильную нативную третичную или четвертичную структуру белков, а также отвечающих за образование и диссоциацию белковых комплексов). Есть предположение, что ген PRNP входит в сеть глипикана-1, принимая участие в делении и регуляции роста клеток. Вероятна и его роль в процессах захвата и метаболизма железа, предоставлении $\text{Cu}(2+)$ или $\text{Zn}(2+)$ для опосредованной аскорбатом дезаминазной деградации боковых цепей гепарансульфата GPC1, участвующего в процессах клеточного деления и регуляции роста клеток [322].

Полученные нами данные в ходе исследования дифференциально экспрессирующихся генов в клетках периферической крови путем анализа первичного массива данных РНК-зондов при ишемическом инсульте позволили установить, что тиреоидные гормоны могут регулировать биологические процессы, имеющие как положительное, так и отрицательное влияние при

ишемическом инсульте. С одной стороны, трийодтиронин увеличивает экспрессию генов *CHP1* и *LRRK2*, регулирующих выживаемость нейронов. Вместе с тем, данные нашего анализа свидетельствуют о роли тироксина в положительной регуляции генов, ответственных за процесс формирования внеклеточных нейтрофильных ловушек – новый механизм тромбообразования и воспаления, имеющий существенное значение в патогенезе ишемического инсульта.

Ранее считалось, что к формированию тромбов приводит нарушение свертываемости крови и активация тромбоцитов, однако, данные ряда исследований убедительно свидетельствуют, что в этот процесс вовлекаются и другие компоненты крови, в том числе моноциты и нейтрофилы. Для обозначения взаимодействия между факторами коагуляции, тромбоцитами и врожденным иммунитетом предложены термины иммунотромбоз и тромбовоспаление [78; 264; 380]. Считается, что это часть нормального врожденного иммунитета, направленная на снижение распространения возбудителей в кровотоке и приводящая к образованию нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET). NET представляют собой решетки внеклеточного хроматина, образующиеся при чрезмерной активации нейтрофилов и предназначенные для захвата микроорганизмов.

Известны два механизма формирования NET – суицидальный и витальный (прижизненный) нетоз [332]. Суицидальный нетоз возникает в ответ на химическую стимуляцию нейтрофилов и занимает несколько часов. Индуктор (перекись водорода, кристаллы урата, интерлейкин-8, пептиды, аутоантитела, сигаретный дым и др.) взаимодействует с рецептором на мембране гранулоцита, активируя каскад, приводящий к высвобождению ионов кальция из эндоплазматического ретикула. Эти процессы сопровождаются снижением конденсации хроматина. В деконденсации хроматина важная роль принадлежит цитруллинанию гистонов (например, H3, H3Cit). Ядра увеличиваются в размерах, а затем распадаются. Кариоплазма соединяется с цитоплазмой и антибактериальными пептидами. Последние в итоге абсорбируются на негативно заряженных фибриллах хроматина, из которого и формируется так называемый

скелет ловушки. После разрушения клеточной мембраны NET выходит в межклеточное пространство [298].

Витальный нетоз запускается при раздражении гранулоцитов бактериальными агентами и происходит быстрее, поскольку не требует лизиса клеток. Нейтрофил сохраняет свою способность как к фагоцитозу, так и к хемотаксису. ДНК переносится во внеклеточное пространство с помощью везикул, позволяя избежать повреждения мембраны.

Доказано участие NET в механизмах венозного и артериального тромбоза [5]. В первом случае как тромбоциты, так и нейтрофилы привлекаются факторами, которые выделяет активированный эндотелий (P-селектин, фактор фон Виллебранда) [265]. Активация тромбоцитов индуцирует активацию гранулоцитов, выделяющих наружу ловушки, служащие каркасом для формирования тромба и адгезии новых тромбоцитов [21]. Во втором случае речь идет о спонтанном нетозе, который может возникнуть при контакте нейтрофила с кристаллами холестерина. Как результат, происходит формирование атеросклеротической бляшки и активация свертываемости крови.

Было выявлено, что NET могут захватывать в свои сети не только патологические микроорганизмы, но и другие клетки крови. Маркеры NET были обнаружены у пациентов с ишемическим инсультом (ИИ), а сами ловушки выявлены в тромбах головного мозга мышей и пациентов, умерших вследствие ИИ. Так, F. Denorme et al (2022) показали, что негистоновый белок тромбоцитов HMGB1 выступает в роли потенциального медиатора индуцированного тромбоцитами образования NET и усугубляет исход ишемического инсульта. Была выявлена положительная корреляция между уровнями NET в тромбах и неблагоприятными исходами ИИ [296]. Согласно результатам этого исследования, неспецифические маркеры NET (внеклеточная ДНК и нуклеосомы) связаны с худшими исходами через год после ИИ. Кроме того, в плазме пациентов с инсультом выявляется пониженная активность ДНКазы по сравнению с плазмой соответствующих здоровых доноров. ДНКазы являются частью эндогенной системы деградации NET и помогают поддерживать целостность тканей во время

воспаления. Вероятно, при инсульте нарушается баланс между образованием и деградацией NET.

NET образуются не только в ответ на инфекции, но и при патологиях, связанных со стерильным воспалением, возникающим при травмах или ишемии ткани. Когда тромб перекрывает мозговой кровоток, нервные клетки, лишенные питательных веществ, быстро высвобождают DAMP (Damage-associated molecular patterns), в том числе HMGB1, которые привлекают иммунные клетки к очагу ишемии [113]. В то же время гипоксия активирует эндотелиальные клетки, дополнительно способствуя рекрутированию иммунных клеток и тромбоцитов. Согласно ряду данных, тромбоциты опосредуют повреждение головного мозга при ИИ за счет взаимодействия тромбоцитов с иммунными клетками. Тромбоциты рекрутируют нейтрофилы непосредственно в мозг, параллельно выделяя DAMP и тем самым дополнительно стимулируя воспалительные процессы в ишемизированном мозге [297].

NET, по всей вероятности, обеспечивает общую стабильности тромба и может вызывать резистентность к фибринолитической терапии. HMGB1 играет важную роль в разрешении воспаления, усиливает индуцированный t-PA фибринолиз и защищает от нейротоксичности, связанной с t-PA. Фермент ДНКазы 1 улучшает опосредованное t-PA растворение тромбов, извлеченных у пациентов с инсультом, *ex vivo*. Кроме того, при растворении тромбов, образовавшихся в присутствии активированных нейтрофилов, *in vitro*, оказалось, что богатые фибрином тромбы, содержащие ДНК и гистоны, более устойчивы к тромболитической терапии, и для их растворения необходима одновременная активность как t-PA, так и ДНКазы. Реña-Martínez et al. показали, что добавление ДНКазы 1 увеличивало *in vitro* эффективность опосредованного t-PA растворения коронарных тромбов. Эти данные являются предпосылкой для дальнейшего изучения терапевтических стратегий тромболитического лечения ишемического инсульта с использованием ДНКазы 1 [312].

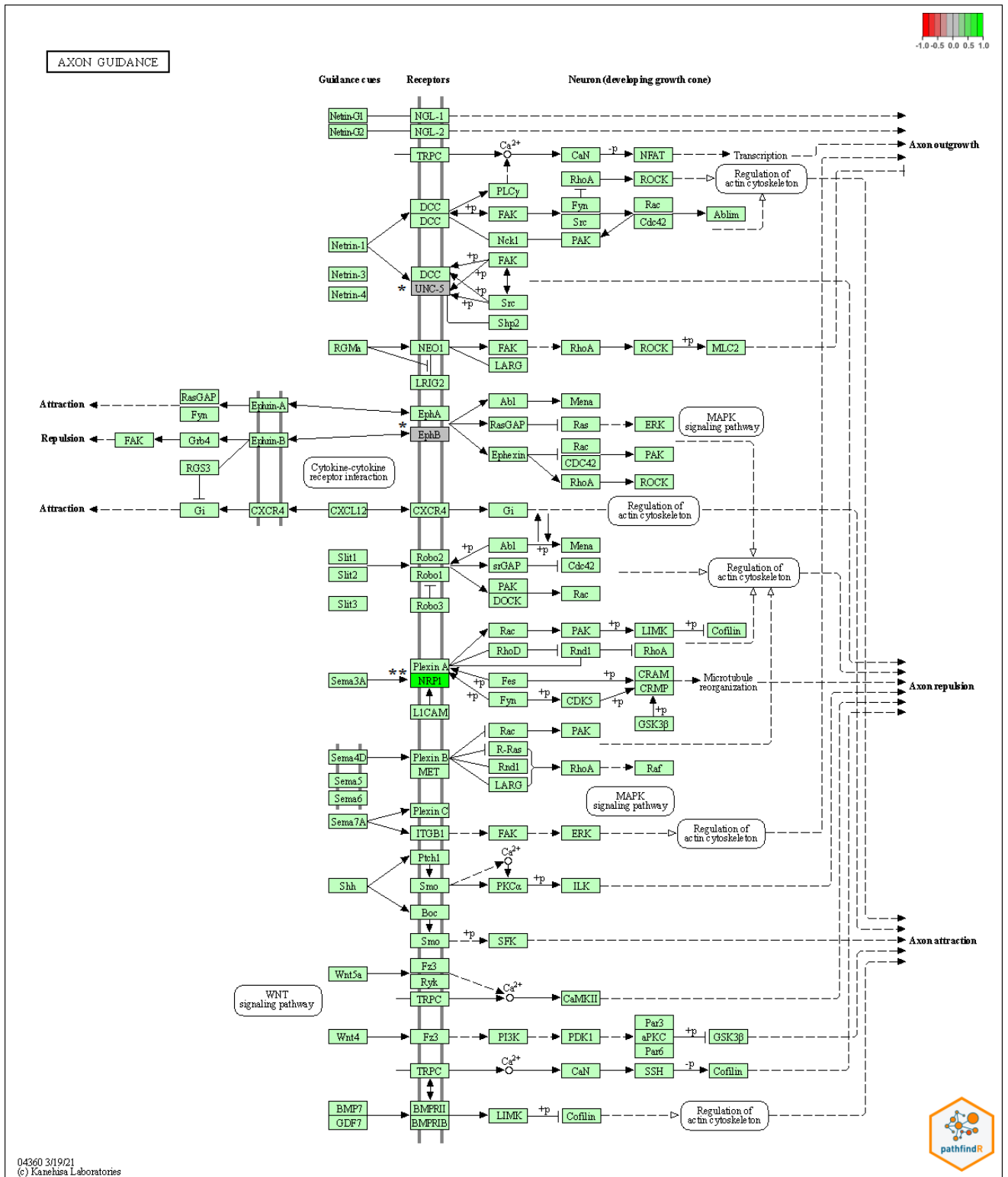
Согласно данным проведенного нами исследования, гены *CYBB*, *FCGR1A*, *C5*, *TLR4*, *ITGA2B*, *ITGB3*, *CLCN3*, управляемые тиреоидным гормоном и

непосредственно участвующее в процессе нетоза, гиперэкспрессируются у пациентов с острым ишемическим инсультом. Выявленные различия в экспрессии могут быть обусловлены предшествующей инсульту хронической сосудистой патологией. Следует отметить, что данные гены относятся, преимущественно, к системе интегринов и регулируются исключительно тироксином, как лигандом $\alpha v\beta 3$ -интегриновых рецепторов.

Полученные нами данные предоставляют одно из возможных объяснений ассоциации высоких уровней тироксина и повышенного риска тромбоэмболических состояний [117]. В клинической части диссертационного исследования было продемонстрировано негативное влияние уровня св. Т4 на функциональный исход инсульта, что также может быть обусловлено процессами нетоза и тромбовоспаления. В недавно проведенном исследовании Davis et al. идентифицировали связь тироксина и риска цитокинового шторма при COVID-19, а также предложили использовать деаминированную молекулу Т4 для блокирования рецепторов $\alpha v\beta 3$ -интегрина с целью уменьшения выраженности цитокинового шторма [108].

Таким образом, при коррекции тиреоидных нарушений у пациентов с тромботическими состояниями, в том числе и с нарушениями мозгового кровообращения, предпочтительно использовать аналоги трийодтиронина вместо тироксина, в случае невозможности такого подхода необходим тщательный мониторинг показателей системы гемостаза.

В ходе анализа дифференциальной экспрессии генов в стволовых клетках в условиях гипоксии впервые идентифицирован характер изменения экспрессии генов, регулируемых тиреоидными гормонами и ответственными за процессы нейrogenеза. Участие Т3-регулируемых генов в сигнальных путях, ассоциированных с аксоногенезом, представлено на рисунке 7.1.



Примечание: * - гены UNC-5 и EphB, позитивно регулируемые тиреоидными гормонами.
** - ген NRP1, негативно регулируемый тиреоидными гормонами.

Рисунок 7.1 – Роль ТЗ-регулируемых генов в сигнальных путях, ответственных за маршрутизацию аксонов (интеграция полученных нами данных с Киотской энциклопедией генов и геномов в системе pathfinder)

Проведенный анализ дифференциальной экспрессии генов в стволовых клетках в условиях нормоксии и гипоксии показал, что при гипоксии происходит снижение экспрессии генов *UNC-5* и *EphB*, при этом тиреоидные гормоны повышают уровень их экспрессии. Данные гены относятся к системе эфринов и нетринов – внеклеточных сигнальных молекул, критически необходимых для роста и интеграции аксонов. В то же время, согласно полученным данным, тиреоидные гормоны подавляют гиперэкспрессируемый в условиях ишемии ген *NRP1*, способствующий прекращению роста аксонов и отталкиванию конуса роста. Ранее проведенные исследования демонстрируют, что высокий уровень экспрессии *NRP1* играет существенную роль в патогенезе тяжелого неврологического дефицита при инсульте, развитии окислительного стресса и формировании тромбозов при COVID-19 [339].

Помимо большого количества данных, полученных в ходе настоящего исследования, свидетельствующих об ассоциации тиреоидного гомеостаза и особенностей течения ишемических нарушений мозгового кровообращения, проводилось исследование данных ассоциаций и с геморрагическими фенотипами.

В ходе проведенного анализа не было обнаружено причинно-следственной связи между гипотиреозом (определяемом как повышение ТТГ), гипертиреозом (определяемом как снижение ТТГ), уровнем ТТГ и какими-либо фенотипами, относящимися к геморрагическим видам нарушения мозгового кровообращения. Тем не менее, выявлены генетические ассоциации между повышением уровней Т3 и Т4, и снижением риска обнаружения церебральных микрогеморрагий, интракраниальных аневризм и развития САК. Проведенное исследование предоставляет доказательства, что тиреоидные гормоны обладают защитным эффектом не только в отношении ишемических событий, но и являются факторами, снижающие риск развития нарушений мозгового кровообращения по геморрагическому типу. Необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение тиреоидного статуса и исхода геморрагических церебральных событий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цереброваскулярные заболевания остаются одной из наиболее значимых проблем современной медицины, несмотря на определенные успехи в совершенствовании профилактических и терапевтических подходов. Многочисленные исследования последних лет позволили выявить целый спектр факторов, влияющих на риск развития сосудистых заболеваний головного мозга, однако, факторы, влияющие на функциональный исход цереброваскулярных заболеваний, окончательно не изучены.

Тщательный анализ литературных данных и клинических наблюдений позволил предложить научную концепцию, заключающуюся в возможности терапевтического воздействия на эндогенные гомеостатические механизмы, связанные с тиреоидной системой, с целью улучшения исходов цереброваскулярных заболеваний, что требовало изучения влияния тиреоидного гомеостаза на тяжесть неврологического дефицита в острый период цереброваскулярной патологии и ее функциональный исход

В многоэтапном диссертационном исследовании, которое было представлено клинической частью, экспериментальным моделированием инсульта и изучением биологической активности тиронаминов, менделевской рандомизацией с исследованием влияния различных фенотипов на цереброваскулярные исходы, доказано воздействие тиреоидного гомеостаза на тяжесть и исходы острой цереброваскулярной патологии. Данное воздействие является многоуровневым и многокомпонентным. Наиболее значимым фактором в данной системе является трийодтиронин. Именно данный фактор имеет наибольшее клиническое значение, как независимый предиктор, влияющий на тяжесть неврологического дефицита и исход ишемического инсульта. Выполненный в диссертационном исследовании анализ с применением различных методов статистического моделирования доказывает, что высокий уровень трийодтиронина в первые 24 часа с момента развития ишемического инсульта независимо ассоциирован с более благоприятным течением и функциональным исходом инсульта. Результаты

подтверждаются мета-анализом генетических ассоциаций (менделевская рандомизация), выполненным в крупных когортах пациентов. Традиционно исследуемый с целью скрининга тиреоидной патологии тироксин, является кофактором и имеет противоположное воздействие – его высокий уровень ассоциирован с более тяжелым течением инсульта, а также с экспрессией генов, влияющих на риск тромбозов.

В ходе экспериментальной части исследования доказано, что нейропротекторные механизмы тиреоидных гормонов связаны с биологическим действием их дейодированных метаболитов – тиронаминов. Введение синтетических аналогов тиронаминов лабораторным животным в экспериментальной модели ишемического инсульта приводит к более выраженному функциональному восстановлению. Доказана способность синтетических аналогов тиронаминов уменьшать выраженность окислительного стресса в ишемизированной ткани головного мозга.

Мета-анализ генетических ассоциаций позволил определить, что на уровне модуляции клеточных сигнальных путей влияние тиреоидных гормонов на цереброваскулярные исходы реализуется через подавление проапоптогенных факторов (таких как индуцирующий апоптоз митохондриальный фактор 1) и активацию антиапоптогенных сигнальных путей (BCL-2, MAPK2). Доказано, что на функциональный исход ишемического инсульта влияет экспрессия в головном мозге ряда генов, контролируемых тиреоидными гормонами. Анализ генной онтологии свидетельствует, что идентифицированные гены связаны с процессами стимуляции нейрогенеза и подавления апоптоза.

Полученные данные свидетельствуют о том, что тиреоидные гормоны, прежде всего – трийодтиронин и его de-novo метаболит тиронамин, являются перспективными нейропротекторами. Результаты диссертационного исследования данные дают основания инициировать пилотные клинические исследования и клиническую апробацию назначения синтетических аналогов трийодтиронина (таких, как лиотиронин) с целью улучшения функциональных исходов ишемического инсульта.

ВЫВОДЫ

В диссертационной работе выполнено теоретическое обобщение и предложено решение актуальной научной проблемы, которая состояла в поиске новых факторов, влияющих на тяжесть течения и исход цереброваскулярных заболеваний, необходимости внедрения новых методов прогнозирования исходов ишемического инсульта, а также в идентификации новых молекулярных мишеней для разработки методов терапии, направленных на улучшение исходов цереброваскулярной патологии. В ходе диссертационного исследования доказано влияние ряда факторов, формирующих тиреоидный гомеостаз, на течение и исход ишемического инсульта, а также обоснована возможность применения тиреоидных гормонов и их метаболитов с целью нейропротекции.

1. В ходе клинической части исследования установлено, что уровень свободного трийодтиронина в течение первых 24 часов с момента развития симптомов острого ишемического инсульта является независимым фактором, влияющим на тяжесть неврологического дефицита. С каждым увеличением уровня свободного трийодтиронина на 1 пмоль/л сумма баллов по Скандинавской шкале увеличивается на 3 балла (95% ДИ 0.15 - 5.91).

2. Согласно данным дисперсионного анализа, высокие уровни свободного трийодтиронина, определяемые как таковые в пределах IV квартиля, в том числе и уровни, превышавшие верхнюю границу лабораторного референтного интервала, измеренные в первые 24 часа с момента развития симптомов острого ишемического инсульта ассоциированы с менее выраженным неврологическим дефицитом. При этом не выявлено данных в пользу ассоциации высоких уровней свободного трийодтиронина со смертью, развитием фибрилляции предсердий или каких-либо других нежелательных явлений.

3. Уровень свободного трийодтиронина, измеренный в первые 24 часа от развития симптомов ишемического инсульта, является независимым фактором, влияющим на функциональный исход инсульта через 6 месяцев с момента его

развития, дихотомизированный как «благоприятный» и «неблагоприятный». Увеличение уровня свободного трийодтиронина на 1 пмоль/л ассоциировано со снижением шансов неблагоприятного функционального исхода инсульта (более 2 баллов по модифицированной шкале Рэнкина) на 46% при прочих равных условиях. Моделирование с применением векторно-аддитивного метода показало, что уровень увеличение уровня свободного трийодтиронина на 1 пмоль/л ассоциировано с повышением шансов наступления более легкого функционального исхода инсульта через 6 месяцев (на 1 балл меньше по модифицированной шкале Рэнкина при прочих равных условиях) на 67%.

4. Уровень свободного тироксина, измеренный в первые 24 часа от развития симптомов ишемического инсульта, является кофактором, оказывающим влияние на эффекты трийодтиронина в отношении тяжести и функциональных исходов острого ишемического инсульта. Уровень свободного тироксина не обладает независимым влиянием на тяжесть и функциональный исход ишемического инсульта. Тем не менее, результаты различных методов регрессионного моделирования демонстрируют более тяжелое течение острого ишемического инсульта с увеличением уровня свободного тироксина.

5. В ходе исследования идентифицирована обратная связь между уровнями свободного трийодтиронина и С-реактивного белка, измеренными в течение 24 часов с момент появления симптомов инсульта. При этом причинный эффект воздействия направлен от уровня свободного трийодтиронина к уровню С-реактивного белка. Полученные данным свидетельствуют об активации системного воспалительного ответа вследствие гипотиреоза при остром ишемическом инсульте.

6. В ходе экспериментальной части исследования в модели ишемического инсульта у лабораторных животных установлено, что синтетический аналог тиронамина Т0АМ (лиганд ТААР-рецепторов) обладает нейропротекторными эффектами. Введение синтетического аналога тиронамина лабораторным животным в модели острой церебральной ишемии индуцирует обратимую транзиторную гипотермию, связанную с воздействием тиронамина на

контрольную точку термогенеза, и не сопровождающуюся в диапазоне оптимальных доз 50-75 мг/кг нежелательными системными эффектами. Разработанный синтетический аналог тиронамина ТОАМ является фармакологическим индуктором гипотермии.

7. Введение синтетического аналога тиронамина лабораторным животным в модели ишемического инсульта препятствует снижению уровня супероксиддисмутазы (SOD) и повышению продуктов перекисного окисления липидов в ткани ишемизированного полушария по сравнению с интактным. Полученные данные свидетельствуют, что путь ТААР-сигналирования, инициируемый метаболитами трийодтиронина, запускает эндогенные антиоксидантные механизмы в условиях острой церебральной ишемии. Результаты экспериментальной части исследования свидетельствуют, что активация ТААР-рецепторов приводит к различным биологическим эффектам в разные стадии острой церебральной ишемии. Введение синтетического аналога тиронамина лабораторным животным в модели ишемического инсульта вызывает в первые сутки транзиторный седативный эффект, при этом на третьи и седьмые у животных, получавших синтетический аналог тиронамина, отмечается менее выраженный неврологический дефицит. Также введение тиронамина в условиях острой церебральной ишемии приводит к нормализации поведенческих показателей, отвечающих за уровень тревожности у лабораторных животных, улучшению показателей рабочей памяти и обучаемости по сравнению с контрольными животными, что отражает влияние процессов, активируемых ТААР-рецепторами, на механизмы постишемического нейровосстановления.

8. Проведенное менделевское рандомизационное исследование подтверждает причинно-следственное влияние уровня свободного трийодтиронина на функциональный исход ишемического инсульта, реализуемое через генетические механизмы. Генетически прогнозируемое повышение уровня свободного трийодтиронина на 1 пмоль/л ассоциировано со снижением риска неблагоприятного исхода инсульта (3-6 баллов по модифицированной шкале Рэнкина) на 18%. Анализ промежуточных фенотипов методом менделевской

рандомизации демонстрирует, что одним из механизмов влияния гипотиреоза на функциональный исход инсульта является активация проапоптогенных сигнальных путей, а именно, повышение уровней индуцирующего апоптоз митохондриального фактора-1 и апоптогенных белков семейства BCL-2. Согласно анализу генетических корреляций, эти же факторы ассоциированы с неблагоприятным исходом ишемического инсульта. При этом экспрессия гена ядерного рецептора тиреоидных гормонов В влияет на активность антиапоптогенных факторов BCL-2 и MAPK2, имеющих большое значение в выживаемости нейронов.

9. Генетически прогнозируемое повышение уровня содержания селена на 1 мкг/г (в ногтях нижних конечностей) ассоциировано со снижением риска неблагоприятного исхода на 80% (ОШ=0,2, 95% ДИ 0,1-0,81). Данная ассоциация свидетельствует о роли активности дейодиназ в реализации влияния тиреоидного гомеостаза на функциональный исход ишемического инсульта.

10. В ходе исследования выявлены генетические ассоциации между повышением уровней трийодтиронина, тироксина и снижением риска обнаружения церебральных микрогеморрагий, интракраниальных аневризм и развития субарахноидальных кровоизлияний.

11. Тиреоидные гормоны, прежде всего – трийодтиронин и его de-novo метаболит тиронамин, представляются перспективными нейропротекторами. Необходимы доклинические и пилотные клинические исследования, направленные на изучение возможности применения тиреоидных гормонов и их метаболитов для улучшения функциональных исходов инсульта.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Традиционно выполняемое исследование тиреотропного гормона и свободного тироксина для скрининга нарушений тиреоидного статуса не является достаточно информативным у пациентов с острым ИИ. Выполняемая в таком случае диагностическая панель должна включать исследование уровня свободного трийодтиронина.

2. Исследование уровня свободного трийодтиронина может быть использовано в целях прогнозирования функционального исхода ИИ.

3. Разработанный на основе технологии машинного обучения алгоритм прогнозирования функционального исхода инсульта обладает достаточной точностью, чувствительностью и простотой, так как включает в себя лишь два лабораторных маркера – уровни свободного трийодтиронина и свободного тироксина, а также такие клинические данные, как возраст пациента и сумма баллов по Скандинавской шкале тяжести инсульта.

4. Учитывая установленное влияние низкого трийодтиронина на развитие системного воспалительного ответа при ИИ, пациентам с выявленным снижением уровня трийодтиронина, переносящим ишемический инсульт в острой фазе, целесообразно рекомендовать терапию статинами высокой интенсивности.

5. Синтетические аналоги трийодтиронина представляются оптимальными фармакологическими агентами для коррекции нарушений тиреоидного статуса у пациентов с ишемическим инсультом в острой фазе. В случае необходимости назначения L-тироксина для коррекции нарушений тиреоидного статуса у пациентов с ишемическим инсультом целесообразно сочетать применение L-тироксина с препаратами селена (200 мкг в сутки) для повышения активности дейодиназ. Следует отметить, что имеется ассоциация между высоким уровнем свободного тироксина в сыворотке и тяжелым течением ишемического инсульта, что необходимо учитывать при назначении высоких доз L-тироксина.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Прежде всего, полученные в ходе диссертационного исследования результаты дают существенные основания для начала непосредственных клинических рандомизированных исследований, направленных на изучение безопасности и эффективности синтетических аналогов трийодтиронина для улучшения функциональных исходов ишемического инсульта. Высокий профиль безопасности и потенциальная эффективность аналогов трийодтиронина была продемонстрирована при инфаркте миокарда и также в ходе пилотных исследований при некоторых демиелинизирующих заболеваниях ЦНС. Подобные исследования в контексте ишемического инсульта ранее не проводились. Вместе с тем, в данном диссертационном исследовании в ходе клинического, экспериментального и аналитического этапов приведены данные, позволяющие считать что синтетические аналоги трийодтиронина станут безопасным и эффективным нейропротектором при ишемическом инсульте.

Учитывая идентифицированные нейропротекторные эффекты селективных лигандов TAAR-рецепторов, необходимы дальнейшие работы по молекулярному дизайну и синтезу новых гетероциклических соединений – потенциальных лигандов TAAR- и AMPA- рецепторов на основе азотсодержащих гетероциклов с ядром тиронамина, азепина, диазепина, а также поиск и идентификация среди них соединений-лидеров по выраженности нейропротекторного эффекта. Обладая гипотермическим эффектом, синтетические аналоги тиронамина потенциально могут быть эффективны не только при ишемическом инсульте, но и при любых критических состояниях с вторичным поражением головного мозга, в качестве универсальных церебральных цитопротекторов.

В ходе менделевского рандомизационного исследования выявлены новые молекулярные мишени для потенциальных нейропротекторных препаратов, такие как подавление активности иницирующего апоптоз фактора-1, BCL-2-ассоциированного агониста клеточной смерти. Необходимо и дальнейшее изучение антиапоптогенных

молекулярных мишеней, таких как MAPK2, BCL-2, с целью поиска возможностей их модуляции при ишемическом инсульте.

Наконец, необходимы клинические исследования влияния тиреоидных гормонов на исходы геморрагических типов нарушений мозгового кровообращения, а также важен поиск механизмов, лежащих в основе выявленных при менделевском исследовании ассоциаций между тиреоидным статусом и фенотипами, ассоциированными с внутримозговыми гемorragиями.

Крайне перспективным в контексте проведенного исследования является новое направление в фармакологии – тераностика, создание фармакологических агентов с лечебными и диагностическими свойствами.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2SMR	– менделевская рандомизация по двум выборкам (two sample mendelian randomization)
AIF	– апоптоз-индуцирующий фактор (apoptosis inducing factor)
BCL	– В-клеточная лимфома, семейство белков (B-cell lymphoma, protein family)
eQTL	– expression quantitative trait loci (локусы, контролирующие экспрессию генов)
GAD	– глутаминовая кислота
GWAS	– полногеномный поиск ассоциаций (genome-wide association studies)
MAPK	– митоген-ассоциированная протеинкиназа (mitogen associated protein kinase)
MCAO	– окклюзия средней мозговой артерии (middle cerebral artery occlusion)
MR	– менделевская рандомизация (mendelian randomization)
NET	– neutrophils extracellular traps (внеклеточные ловушки нейтрофилов)
PV	– парвальбумин
SNP	– однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism)
SNV	– однонуклеотидный вариант (single nucleotide variant)
TAAR	– рецептор, ассоциированный со следовыми аминами
tPA	– тканевой активатор плазминогена
TR	– рецептор к тиреоидным гормонам (thyroid receptor)
TRPV1	– активатор переменного рецепторного потенциала ванилоидного семейства-1
АРК	– арахидоновая кислота

ГАМК	–	гамма-аминомасляная кислота
ГБ	–	гипертоническая болезнь
ГЭБ	–	гематоэнцефалический барьер
ДИ	–	доверительный интервал
ИБС	–	ишемическая болезнь сердца
ИИ	–	ишемический инсульт
МДА	–	малоновый диальдегид
ОНМК	–	острое нарушение мозгового кровообращения
ОШ	–	отношение шансов
СА-Т0АМ	–	синтетический аналог тиронамина Т0АМ
Св. Т3	–	свободный трийодтиронин
Св. Т4	–	свободный тироксин
СРБ	–	С-реактивный белок
СРО	–	свободно-радикальное окисление
Т0АМ	–	тиронамин
Т1АМ	–	3-йодтиронамин
ТБК	–	тиобарбитуровая кислота
ТГ	–	тиреоидные гормоны
ТТГ	–	тиреотропный гормон
ЦНС	–	центральная нервная система
ЯРТГ	–	ядерный рецептор тиреоидных гормонов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Когнитивные нарушения у пациентов, страдающих гипотиреозом, перенесших ишемический инсульт в бассейне левой внутренней сонной артерии / О. Н. Быкова, В. И. Гузева, В. В. Гузева [и др.] // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2016. – Т. 2. – № 54. – С. 108-110.
2. Альтшулер Н. Э. Центральный гипотиреоз при проведении управления температурой тела / Н. Э. Альтшулер, М. Б. Куцый, Н. М. Кругляков // Анестезиология и реаниматология (Медиа Сфера). – 2022. – № 2. – С. 60-65.
3. Басаева А. Г. Изучение про- и антиоксидантного статуса в условиях экспериментального гипотиреоза / А. Г. Басаева, Е. В. Сордонова // Фундаментальные и прикладные исследования в современном мире. – 2017. – Т. 18. – № 1. – С. 162-166.
4. Валидация модифицированной шкалы Рэнкина (The Modified Rankin Scale, MRS) в России / Н. А. Супонева, Д. Г. Юсупова, Е. С. Жирова [и др.] // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2018. – Т. 10. – № 4. – С. 36-39.
5. Воробьева Н. В. Нетоз: молекулярные механизмы, роль в физиологии и патологии / Н. В. Воробьева, Б. В. Черняк // Биохимия. – 2020. – Т. 85. – № 10. – С. 1383-1397.
6. Глутаматные биомаркеры в комплексной диагностике острой и хронической ишемии головного мозга / Г. В. Пономарев, И. А. Вознюк, М. А. Идзуми, А. А. Скоромец // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2020. – Т. 14. – № 4. – С. 15-22.
7. Глушаков Р. И. Роль тиреоидных гормонов в регуляции ангиогенеза, клеточной пролиферации и миграции / Р. И. Глушаков, С. Н. Прошин, Н. И. Тапильская // Гены & Клетки. – 2011. – Т. 6. – № 4. – С. 26-33.

8. Городецкая И. В. Периферические механизмы стресс-протекторного эффекта йодсодержащих гормонов щитовидной железы / И. В. Городецкая, Е. А. Гусакова, О. В. Евдокимова // Вестник Витебского государственного медицинского университет. – 2016. – Т. 15. – № 6. – С. 41-53.
9. Диагностические особенности уровня антител к NR2пептиду у пациентов с хронической ишемией мозга / И. А. Вознюк, Г. В. Пономарев, Т. В. Харитоновна, А. . Скоромец // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2021. – Т. 15. – № 2. – С. 5-12.
10. Евдокимова О. В. Влияние йодсодержащих гормонов щитовидной железы на синтез белков теплового шока в мозге крыс при стрессе и адаптации / О. В. Евдокимова, И. В. Городецкая // Вестник ВГМУ. – 2014. – Т. 14. – № 2. – С. 18-25.
11. Ишемический инсульт и транзиторная ишемическая атака у взрослых : Клинические рекомендации / Р. Г. Акжигитов, Б. Г. Алесян, В. В. Алферова, А. А. Скоромец. – Москва : Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2021. – 181 с.
12. Королева Е. С. Механизмы нейрогенеза и ангиогенеза при ишемическом инсульте: обзор литературы / Е. С. Королева, В. М. Алифирова // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2021. – Т. 15. – № 3. – С. 62-71.
13. Криштоп В. В. Нейропротекторный эффект гормонов щитовидной железы при церебральной гипоперфузии / В. В. Криштоп, Т. А. Румянцева, В. Г. Никонорова // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2021. – Т. 1. – С. 6-25.
14. Криштоп В. В. Типологические и половые особенности морфологии щитовидной железы при длительной субтотальной гипоксии головного мозга у крыс / В. В. Криштоп, Т. А. Румянцева, В. Г. Никонорова // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2019. – Т. 9. – № 4. – С. 30-38.

15. Максимова М. Ю. Факторы риска развития ишемического инсульта в артериях каротидной системы у мужчин и женщин / М. Ю. Максимова, А. С. Москвичева, А. О. Чечеткин // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2018. – Т. 12. – № 1. – С. 5-11.
16. Мануйлова Ю. А. Новости мировой тиреоидологии / Ю. А. Мануйлова, А. Е. Шведова // *Клиническая и экспериментальная тиреоидология*. – 2014. – Т. 10. – № 3. – С. 28-35.
17. МикроРНК как значимые биомаркеры атеросклеротической цереброваскулярной патологии / А. А. Раскуражев, А. А. Шабалина, П. И. Кузнецова, М. М. Танащян // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2022. – Т. 16. – № 1. – С. 5-13.
18. Новый подход к профилактике инсульта в России / В. Л. Фейгин, Ю. Я. Варакин, М. А. Кравченко [и др.] // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2017. – Т. 9. – № 4. – С. 19-23.
19. Окислительный стресс – индикатор метаболических нарушений в патогенезе мозгового инсульта / М. А. Луцкий, А. М. Земсков, В. В. Разуваева [и др.] // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски*. – 2016. – Т. 116. – № 8-1. – С. 24-29.
20. Организация помощи пациентам с инсультом в России. Итоги 10 лет реализации Комплекса мероприятий по совершенствованию медицинской помощи пациентам с острыми нарушениями мозгового кровообращения / В. И. Скворцова, И. М. Шетова, Е. П. Какорина [и др.] // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2018. – Т. 12. – № 3. – С. 5-12.
21. Охтова Ф. Р. Молекулы адгезии при тяжелом течении атеротромботического инсульта / Ф. Р. Охтова, В. Н. Михальченко, М. Ю. Максимова // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2018. – Т. 12. – № 1. – С. 24-30.
22. Павлова Т. В. Влияние патологии щитовидной железы на течение беременности и родов. Литературный обзор / Т. В. Павлова, Е. А. Малютина, В. А. Петрухин // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – Т. 3. – С. 15-21.

23. Парфенов В. А. Нервные болезни / В. А. Парфенов, Н. Н. Яхно, Н. Н. Зиновьева. – Москва : ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2021. – 264 с.
24. Пилипович А. А. Персонализированная превентивная медицина и неврология / А. А. Пилипович, А. Б. Данилов // Терапия. – 2018. – Т. 7-8(25-26). – С. 20-24.
25. Пирадов М. А. Инсульт: пошаговая инструкция. Руководство для врачей – 2-е изд., перераб. и доп. / М. А. Пирадов, М. Ю. Максимова, М. М. Танашян. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 288 с.
26. Прогнозирование исхода острого периода ишемического инсульта: роль маркеров апоптоза / С. П. Сергеева, А. А. Савин, В. В. Архипов [и др.] // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2017. – Т. 11. – № 1. – С. 21-27.
27. Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами: новая мишень для разработки антиаддиктивных средств? / Н. С. Бортников, О. А. Драволина, И. М. Суханов [и др.] // Вопросы наркологии. – 2021. – Т. 203. – № 8. – С. 52-72.
28. Роль длинных некодирующих РНК в ишемическом инсульте / Л. Б. Новикова, И. Ф. Гареев, А. А. Раскуражев [и др.] // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2020. – Т. 14. – № 1. – С. 70-77.
29. Роль мультиомиксных технологий и генетического анализа в диагностике и прогнозировании сердечно-сосудистых заболеваний / Е. И. Усова, А. С. Алиева, А. Н. Яковлев [и др.] // Российский журнал персонализированной медицины. – 2022. – Т. 2. – № 2. – С. 6-16.
30. Румянцева Т. А. Качественная морфофункциональная характеристика щитовидной железы крыс при острой гипоксии головного мозга в ранние сроки / Т. А. Румянцева, В. В. Криштоп, О. С. Ленчер // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2016. – Т. 6. – № 3. – С. 102-106.

31. Селективные модуляторы рецепторов тиреоидных гормонов / Е. Н. Карева, С. Ю. Сереброва, В. А. Булгакова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т. 82. – № 9. – С. 26-35.
32. Селен и щитовидная железа / Е. А. Шабалина, Т. Б. Моргунова, С. В. Орлова, И. А. Ольховский // Клиническая и экспериментальная тиреодология. – 2010. – Т. 7. – № 2. – С. 7-18.
33. Сергеев Д. В. Нейропротекция при ишемическом инсульте: оправданы ли надежды? / Д. В. Сергеев // РМЖ. – 2010. – Т. 18. – № 26. – С. 1521-1525.
34. Танащян М. М. Современная нейропротекция в комплексном лечении пациентов в остром и раннем восстановительном периоде ишемического инсульта / М. М. Танащян, М. А. Домашенко, М. Ю. Максимова // Нервные болезни. – 2017. – № 3. – С. 36-41.
35. Тапбергенов С. О. Сравнительная оценка эффектов физиологических доз тироксина на активность некоторых ферментов митохондрий при нейрогенном и радиационном стрессе / С. О. Тапбергенов, В. Ганн // Успехи соврем. естествознания. – 2013. – Т. 5. – С. 51-53.
36. Эркенова Л. Д. Морфологические изменения головного мозга при гипотиреозе / Л. Д. Эркенова // Кубанский научный медицинский вестник. – 2012. – Т. 1. – № 130. – С. 197-199.
37. 3-Iodothyroacetic acid lacks thermoregulatory and cardiovascular effects in vivo / C. S. Hoefig, S. F. Jacobi, A. Warner [et al.] // British Journal of Pharmacology. – 2015. – Vol. 172. – № 13. – P. 3426-3433.
38. 3-Iodothyronamine: A modulator of the hypothalamus-pancreas-thyroid axes in mice / M. E. Manni, G. De Siena, A. Saba [et al.] // British Journal of Pharmacology. – 2012. – Vol. 166. – № 2. – P. 650-658.
39. 3-Iodothyronamine acting through an anti-apoptotic mechanism is neuroprotective against spinal cord injury in rats / J. Lv, J. Liao, W. Tan [et al.] // Annals of Clinical and Laboratory Science. – 2018. – Vol. 48. – № 6. – P. 736-742.

40. 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone / T. S. Scanlan, K. L. Suchland, M. E. Hart [et al.] // *Nature Medicine*. – 2004. – Vol. 10. – № 6. – P. 638-642.
41. 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone / T. S. Scanlan, K. L. Suchland, M. E. Hart [et al.] // *Nature Medicine*. – 2004. – Vol. 10. – № 6. – P. 638-642.
42. A correction for sample overlap in genome-wide association studies in a polygenic pleiotropy-informed framework / M. LeBlanc, V. Zuber, W. K. Thompson [et al.] // *BMC Genomics*. – 2018. – Vol. 19. – № 1. – P. 1-15.
43. A genome-wide association study links small-vessel ischemic stroke to autophagy / T. H. Lee, T. M. Ko, C. H. Chen [et al.] // *Scientific Reports* 2017 7:1. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-7.
44. A global reference for human genetic variation / A. Auton, G. R. Abecasis, D. M. Altshuler [et al.] // *Nature* 2015 526:7571. – 2015. – Vol. 526. – № 7571. – P. 68-74.
45. A neuroprotective astrocyte state is induced by neuronal signal EphB1 but fails in ALS models / G. E. Tyzack, C. E. Hall, C. R. Sibley [et al.] // *Nature Communications* 2017 8:1. – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. 1-17.
46. A Novel PRNP Y218N mutation in gerstmann-sträussler-scheinker disease with neurofibrillary degeneration / A. Alzualde, B. Indakoetxea, I. Ferrer [et al.] // *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. – 2010. – Vol. 69. – № 8. – P. 789-800.
47. A preliminary study of pharmacogenetic biomarkers for individuals with autism and gastrointestinal dysfunction / A. E. Shindler, E. L. Hill-Yardin, S. Petrovski [et al.] // *Research in Autism Spectrum Disorders*. – 2020. – Vol. 71.
48. A prognostic role for Low tri-iodothyronine syndrome in acute stroke patients: A systematic review and meta-analysis / N. Lamba, C. Liu, H. Zaidi [et al.] // *Clinical Neurology and Neurosurgery*. – 2018. – Vol. 169. – № February. – P. 55-63.
49. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses / F. K. M. Chan, J. Shisler, J. G.

- Bixby [et al.] // *The Journal of biological chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 51. – P. 51613-51621.
50. Abnormal Regulation of the Sympathetic Nervous System in α 2A-Adrenergic Receptor Knockout Mice / J. D. Altman, A. U. Trendelenburg, L. Macmillan [et al.] // *Molecular Pharmacology*. – 1999. – Vol. 56. – № 1. – P. 154-161.
51. Acosta J. N. Mendelian Randomization in Stroke: A Powerful Approach to Causal Inference and Drug Target Validation. / J. N. Acosta, N. Szejko, G. J. Falcone // *Frontiers in genetics*. – 2021. – Vol. 12.
52. AHI1, a pivotal neurodevelopmental gene, and C6orf217 are associated with susceptibility to schizophrenia / D. Amann-Zalcenstein, N. Avidan, K. Kanyas [et al.] // *European Journal of Human Genetics*. – 2006. – Vol. 14. – № 10. – P. 1111-1119.
53. Alanazi E. M. Predicting Risk of Stroke From Lab Tests Using Machine Learning Algorithms: Development and Evaluation of Prediction Models. / E. M. Alanazi, A. Abdou, J. Luo // *JMIR formative research*. – 2021. – Vol. 5. – № 12. – P. e23440.
54. Alexandrova M. L. Oxidative stress during the chronic phase after stroke / M. L. Alexandrova, P. G. Bochev // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2005. – Vol. 39. – № 3. – P. 297-316.
55. Alpha2A adrenergic receptor genetic variation contributes to hyperglycemia after myocardial infarction / A. Adefurin, L. Darghosian, C. Okafor [et al.] // *International Journal of Cardiology*. – 2016. – Vol. 215. – P. 482-486.
56. Alteration of Thyroid Hormone among Patients with Ischemic Stroke visiting a Tertiary Care Hospital: A Descriptive Cross-sectional Study. / S. Bashyal, M. P. Gorkhaly, R. Devkota [et al.] // *JNMA; journal of the Nepal Medical Association*. – 2021. – Vol. 59. – № 240. – P. 779-782.
57. Amphetamines signal through intracellular TAAR1 receptors coupled to G α 13 and G α S in discrete subcellular domains / S. M. Underhill, P. D. Hullihen, J. Chen [et al.] // *Molecular Psychiatry* 2019 26:4. – 2019. – Vol. 26. – № 4. – P. 1208-1223.
58. An online solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to study the presence of thyronamines in plasma and tissue

- and their putative conversion from 13C6-thyroxine / M. T. Ackermans, L. P. Klieverik, P. Ringeling [et al.] // *Journal of Endocrinology*. – 2010. – Vol. 206. – № 3. – P. 327-334.
59. Analysis of the Incidence of Euthyroid Sick Syndrome in Comprehensive Intensive Care Units and Related Risk Factors / J. Guo, Y. Hong, Z. Wang, Y. Li // *Frontiers in Endocrinology*. – 2021. – Vol. 0. – P. 538.
60. Anderson G. W. Molecular Aspects of Thyroid Hormone-Regulated Behavior / G. W. Anderson, C. N. Mariash // *Hormones, Brain and Behavior: Third Edition*. – 2017. – Vol. 3. – P. 111-129.
61. Andrews G. D. Methylphenidate increases cortical excitability via activation of alpha-2 noradrenergic receptors / G. D. Andrews, A. Lavin // *Neuropsychopharmacology*. – 2006. – Vol. 31. – № 3. – P. 594-601.
62. Anti-edema action of thyroid hormone in MCAO model of ischemic brain stroke: Possible association with AQP4 modulation / P. Sadana, L. Coughlin, J. Burke [et al.] // *Journal of the Neurological Sciences*. – 2015. – Vol. 354. – № 1-2. – P. 37-45.
63. Anti-inflammatory treatments for stroke: from bench to bedside. / A. Drieu, D. Levard, D. Vivien, M. Rubio // *Therapeutic advances in neurological disorders*. – 2018. – Vol. 11.
64. Apoptosis-inducing factor downregulation increased neuronal progenitor, but not stem cell, survival in the neonatal hippocampus after cerebral hypoxia-ischemia / Y. Sun, Y. Zhang, X. Wang [et al.] // *Molecular Neurodegeneration*. – 2012. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-10.
65. Application of Stem Cells in Stroke: A Multifactorial Approach / M. Singh, P. K. Pandey, A. Bhasin [et al.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2020. – Vol. 14. – P. 473.
66. Artykbaeva G. M. Role of type 1 and 2 deiodinases in thyroid metabolism (review) / G. M. Artykbaeva // *Problemy Endokrinologii*. – 2016. – Vol. 62. – № 2. – P. 46-51.

67. Aspects correlates with Scandinavian Stroke Scale for predicting early neurological impairment / G. J. Luvizutto, M. G. Gabriel, G. P. Braga [et al.] // *Arquivos de neuro-psiquiatria*. – 2015. – Vol. 73. – № 5. – P. 450-453.
68. Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia / M. Balkaya, J. M. Kröber, A. Rex, M. Endres // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2013. – Vol. 33. – № 3. – P. 330.
69. Association between common genetic variants of $\alpha 2A$ -, $\alpha 2B$ -, and $\alpha 2C$ -adrenergic receptors and ischemic stroke / S. H. Oh, K. T. Min, Y. J. Jeon [et al.] // *Clinical neurology and neurosurgery*. – 2013. – Vol. 115. – № 1. – P. 26-31.
70. Association between rs2107595 HDAC9 gene polymorphism and advanced carotid atherosclerosis in the Slovenian cohort. / E. Grbić, N. Gorkič, A. Pleskovič [et al.] // *Lipids in health and disease*. – 2020. – Vol. 19. – № 1. – P. 71.
71. Association of common genetic variants with brain microbleeds: A genome-wide association study / M. J. Knol, D. Lu, M. Traylor [et al.] // *Neurology*. – 2020. – Vol. 95. – № 24. – P. e3331-e3343.
72. Association of common variants in the Joubert syndrome gene (AHI1) with autism / A. I. Alvarez Retuerto, R. M. Cantor, J. G. Gleeson [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 2008. – Vol. 17. – № 24. – P. 3887-3896.
73. Association of Hypothyroidism with Hypertensive Intracerebral Hemorrhage: A Case-Control Study / S. Hu, Q. Ma, B. Li [et al.] // *World Neurosurgery*. – 2020. – Vol. 134. – P. e8-e11.
74. Azad T. D. Neurorestoration after stroke / T. D. Azad, A. Veeravagu, G. K. Steinberg // *Neurosurgical focus*. – 2016. – Vol. 40. – № 5. – P. E2-E2.
75. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity / H. Zhao, M. A. Yenari, D. Cheng [et al.] // *Journal of neurochemistry*. – 2003. – Vol. 85. – № 4. – P. 1026-1036.
76. Bernal J. Thyroid hormone regulated genes in cerebral cortex development / J. Bernal // *Journal of Endocrinology*. – 2017. – Vol. 232. – № 2. – P. R83-R97.

77. Beyond classic concepts in thyroid homeostasis: Immune system and microbiota. / V. Fernández-García, S. González-Ramos, P. Martín-Sanz [et al.] // *Molecular and cellular endocrinology*. – 2021. – Vol. 533.
78. Beyond Hemostasis: Platelet Innate Immune Interactions and Thromboinflammation. / J. Mandel, M. Casari, M. Stepanyan [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 7. – P. 3868.
79. BFGF plays a neuroprotective role by suppressing excessive autophagy and apoptosis after transient global cerebral ischemia in rats / D. Sun, W. Wang, X. Wang [et al.] // *Cell Death and Disease*. – 2018. – Vol. 9. – № 2.
80. Binding characteristics of the thyroid hormone receptor homo- and heterodimers to consensus AGGTCA repeat motifs / G. M. Wahlström, M. Sjöberg, M. Andersson [et al.] // *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*. – 1992. – Vol. 6. – № 7. – P. 1013-1022.
81. Bioenergetic Aspects of Mitochondrial Actions of Thyroid Hormones / F. Cioffi, A. Giacco, F. Goglia, E. Silvestri // *Cells* 2022, Vol. 11, Page 997. – 2022. – Vol. 11. – № 6. – P. 997.
82. Biosynthesis of 3-iodothyronamine from T4 in murine intestinal tissue / C. S. Hoefig, T. Wuensch, E. Rijntjes [et al.] // *Endocrinology*. – 2015. – Vol. 156. – № 11. – P. 4356-4364.
83. Boyle K. An historical and contemporary review of endovascular therapy for acute ischemic stroke / K. Boyle, R. A. Joundi, R. I. Aviv // *Neurovascular Imaging*. – 2017. – Vol. 3. – № 1. – P. 1.
84. Bradley D. J. Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system / D. J. Bradley, H. C. Towle, W. S. Young // *Journal of Neuroscience*. – 1992. – Vol. 12. – № 6. – P. 2288-2302.
85. Brain GABA⁺ changes in primary hypothyroidism patients before and after levothyroxine treatment: A longitudinal magnetic resonance spectroscopy study / B. Liu, Z. Wang, L. Lin [et al.] // *NeuroImage: Clinical*. – 2020. – Vol. 28. – P. 102473.

86. Bridging versus Direct Mechanical Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke: A Subgroup Pooled Meta-Analysis for Time of Intervention, Eligibility, and Study Design / S. Vidale, M. Romoli, D. Consoli, E. C. Agostoni // *Cerebrovascular diseases* (Basel, Switzerland). – 2020. – Vol. 49. – № 2. – P. 223-232.
87. Bunevicius A. Neuroprotective actions of thyroid hormones and low-T3 syndrome as a biomarker in acute cerebrovascular disorders / A. Bunevicius, G. Iervasi, R. Bunevicius // *Expert Review of Neurotherapeutics*. – 2015. – Vol. 15. – № 3. – P. 315-326.
88. Bylicky M. A. Mechanisms of Endogenous Neuroprotective Effects of Astrocytes in Brain Injury / M. A. Bylicky, G. P. Mueller, R. M. Day // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2018. – Vol. 2018. – P. 1-16.
89. Cano-Gamez E. From GWAS to Function: Using Functional Genomics to Identify the Mechanisms Underlying Complex Diseases / E. Cano-Gamez, G. Trynka // *Frontiers in Genetics*. – 2020. – Vol. 11. – P. 424.
90. Cardiac effects of trace amines: Pharmacological characterization of trace amine-associated receptors / S. Frascarelli, S. Ghelardoni, G. Chiellini [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2008. – Vol. 587. – № 1-3. – P. 231-236.
91. Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy / A. Datta, D. Sarmah, L. Mounica [et al.] // *Translational Stroke Research* 2020 11:6. – 2020. – Vol. 11. – № 6. – P. 1185-1202.
92. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling / B. Gereben, A. M. Zavacki, S. Ribich [et al.] // *Endocrine Reviews*. – 2008. – Vol. 29. – № 7. – P. 898-938.
93. Central effects of thyronamines on glucose metabolism in rats / L. P. Klieverik, E. Foppen, M. T. Ackermans [et al.] // *Journal of Endocrinology*. – 2009. – Vol. 201. – № 3. – P. 377-386.
94. Chatonnet F. A temporary compendium of thyroid hormone target genes in brain / F. Chatonnet, F. Flamant, B. Morte // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. – 2015. – Vol. 1849. – № 2. – P. 122-129.

95. CHCHD2 and CHCHD10: Future therapeutic targets in cognitive disorder and motor neuron disorder / T. Jiang, Y. Wang, X. Wang, J. Xu // *Frontiers in Neuroscience*. – 2022. – Vol. 16. – P. 1413.
96. CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: A genome-wide linkage and sequencing study / M. Funayama, K. Ohe, T. Amo [et al.] // *The Lancet Neurology*. – 2015. – Vol. 14. – № 3. – P. 274-282.
97. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury / A. Degtarev, Z. Huang, M. Boyce [et al.] // *Nature chemical biology*. – 2005. – Vol. 1. – № 2. – P. 112-119.
98. Cheng S. Y. Molecular Aspects of Thyroid Hormone Actions / S. Y. Cheng, J. L. Leonard, P. J. Davis // *Endocrine Reviews*. – 2010. – Vol. 31. – № 2. – P. 139.
99. Cherella C. E. Congenital hypothyroidism: insights into pathogenesis and treatment. / C. E. Cherella, A. J. Wassner // *International journal of pediatric endocrinology*. – 2017. – Vol. 2017. – № 1. – P. 11.
100. Cho B. B. Caspase-independent programmed cell death following ischemic stroke / B. B. Cho, L. H. Toledo-Pereyra // *Journal of Investigative Surgery*. – 2008. – Vol. 21. – № 3. – P. 141-147.
101. Cho H. J. AGE-induced neuronal cell death is enhanced in G2019S LRRK2 mutation with increased RAGE expression / H. J. Cho, C. Xie, H. Cai // *Translational Neurodegeneration*. – 2018. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-8.
102. Cichero E. New insights into the structure of the trace amine-associated receptor 2: Homology modelling studies exploring the binding mode of 3-iodothyronamine / E. Cichero, M. Tonelli // *Chemical Biology and Drug Design*. – 2017. – Vol. 89. – № 5. – P. 790-796.
103. Clinical Parameters Are More Likely to Be Associated with Thyroid Hormone Levels than with Thyrotropin Levels: A Systematic Review and Meta-Analysis / S. P. Fitzgerald, N. G. Bean, H. Falhammar, J. Tuke // *Thyroid*. – 2020. – Vol. 30. – № 12. – P. 1695-1709.

104. Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development / K. Jepsen, O. Hermanson, T. M. Onami [et al.] // *Cell*. – 2000. – Vol. 102. – № 6. – P. 753-763.
105. Complex relationship between free thyroxine and TSH in the regulation of thyroid function / R. Hoermann, W. Eckl, C. Hoermann, R. Larisch // *European Journal of Endocrinology*. – 2010. – Vol. 162. – № 6. – P. 1123-1129.
106. Congenital Hypothyroidism: A 2020-2021 Consensus Guidelines Update - An ENDO-European Reference Network Initiative Endorsed by the European Society for Pediatric Endocrinology and the European Society for Endocrinology. Vol. 31 / P. Van Trotsenburg, A. Stoupa, J. Léger [et al.]. – Mary Ann Liebert, Inc., publishers 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 2021.
107. Conserved sequence motifs in human TMTC1, TMTC2, TMTC3, and TMTC4, new O-mannosyltransferases from the GT-C/PMT clan, are rationalized as ligand binding sites / B. Eisenhaber, S. Sinha, C. K. Jadalanki [et al.] // *Biology Direct*. – 2021. – Vol. 16. – № 1. – P. 1-18.
108. Coronaviruses and Integrin $\alpha\beta3$: Does Thyroid Hormone Modify the Relationship? / P. J. Davis, H. Y. Lin, A. Hercbergs [et al.] // *Endocrine research*. – 2020. – Vol. 45. – № 3. – P. 210-215.
109. Cramer S. C. Treatments to Promote Neural Repair after Stroke / S. C. Cramer // *Journal of Stroke*. – 2018. – Vol. 20. – № 1. – P. 57.
110. Critical role of TRPC1 in thyroid hormone-dependent dopaminergic neuron development / C. Chen, Q. Ma, P. Deng [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2017. – Vol. 1864. – № 10. – P. 1900-1912.
111. Crofts A. Imaging Functional Recovery Following Ischemic Stroke: Clinical and Preclinical fMRI Studies / A. Crofts, M. E. Kelly, C. L. Gibson // *Journal of Neuroimaging*. – 2020. – Vol. 30. – № 1. – P. 5-14.
112. Cryptogenic Stroke / S. Yaghi, R. A. Bernstein, R. Passman [et al.] // *Circulation Research*. – 2017. – Vol. 120. – № 3. – P. 527-540.
113. Damps and nets in sepsis / N. L. Denning, M. Aziz, S. D. Gurien, P. Wang // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – № OCT. – P. 2536.

114. Davies N. M. Reading Mendelian randomisation studies: a guide, glossary, and checklist for clinicians / N. M. Davies, M. V. Holmes, G. Davey Smith // *BMJ*. – 2018. – Vol. 362. – P. 601.
115. Davis P. Thyroid Hormone-Induced Angiogenesis / P. Davis, F. Davis, S. Mousa // *Current Cardiology Reviews*. – 2009. – Vol. 5. – № 1. – P. 12-16.
116. Davis P. J. Nongenomic actions of thyroid hormone: The integrin component / P. J. Davis, S. A. Mousa, H. Y. Lin // *Physiological Reviews*. – 2021. – Vol. 101. – № 1. – P. 319-352.
117. Davis P. J. New Interfaces of Thyroid Hormone Actions With Blood Coagulation and Thrombosis / P. J. Davis, S. A. Mousa, G. P. Schechter // *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. – 2018. – Vol. 24. – № 7. – P. 1014-1019.
118. Deconstructing Synaptotagmin-1's Distinct Roles in Synaptic Vesicle Priming and Neurotransmitter Release / B. Bouazza-Arostegui, M. Camacho, M. M. Brockmann [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2022. – Vol. 42. – № 14. – P. 2856-2871.
119. Deficits in motor and cognitive functions in an adult mouse model of hypoxia-ischemia induced stroke / L. Feng, C. X. Han, S. Y. Cao [et al.] // *Scientific Reports* 2020 10:1. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-13.
120. Deletion of *Tmtc4* activates the unfolded protein response and causes postnatal hearing loss / J. Li, O. Akil, S. L. Rouse [et al.] // *J Clin Invest*. – 2018. – Vol. 128. – № 11. – P. 5150-5162.
121. Delivery of Thyronamines (TAMs) to the Brain: A Preliminary Study. / N. di Leo, S. Moscato, M. Borso' [et al.] // *Molecules (Basel, Switzerland)*. – 2021. – Vol. 26. – № 6.
122. Dendritic Cells Exposed to Triiodothyronine Deliver Pro-Inflammatory Signals and Amplify IL-17-Driven Immune Responses / V. A. Alamino, M. Del Mar Montesinos, M. F. Soler [et al.] // *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. – 2019. – Vol. 52. – № 2. – P. 354-367.

123. Design, Synthesis, and Evaluation of Thyronamine Analogues as Novel Potent Mouse Trace Amine Associated Receptor 1 (m TAAR1) Agonists / G. Chiellini, G. Nesi, M. Digiacomo [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2015. – Vol. 58. – № 12. – P. 5096-5107.
124. Design, Synthesis, and Evaluation of Thyronamine Analogues as Novel Potent Mouse Trace Amine Associated Receptor 1 (mTAAR1) Agonists / G. Chiellini, G. Nesi, M. Digiacomo [et al.] // *Journal of medicinal chemistry*. – 2015. – Vol. 58. – № 12. – P. 5096-5107.
125. Developmental and cell type-specific expression of thyroid hormone transporters in the mouse brain and in primary brain cells / D. Braun, A. Kinne, A. U. Brauer [et al.] // *Glia*. – 2011. – Vol. 59. – № 3. – P. 463-471.
126. Diabetes Mellitus, Glycemic Traits, and Cerebrovascular Disease: A Mendelian Randomization Study / M. K. Georgakis, E. L. Harshfield, R. Malik [et al.] // *Neurology*. – 2021. – Vol. 96. – № 13. – P. e1732-e1742.
127. Disparate Effects of Thyroid Hormone on Actions of Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor- α Are Mediated by 3',5'-Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate-Dependent Protein Kinase II / A. Shih, S. Zhang, H. J. Cao [et al.] // *Endocrinology*. – 2004. – Vol. 145. – № 4. – P. 1708-1717.
128. Distribution of exogenous [^{125}I]-3-iodothyronamine in mouse in vivo: Relationship with trace amine-associated receptors / G. Chiellini, P. Erba, V. Carnicelli [et al.] // *Journal of Endocrinology*. – 2012. – Vol. 213. – № 3. – P. 223-230.
129. Dobrzyńska M. M. Antioxidants modulate thyroid hormone- and noradrenaline-induced DNA damage in human sperm / M. M. Dobrzyńska, A. Baumgartner, D. Anderson // *Mutagenesis*. – 2004. – Vol. 19. – № 4. – P. 325-330.
130. Does the aromatic l-amino acid decarboxylase contribute to thyronamine biosynthesis? / C. S. Hoefig, K. Renko, S. Piehl [et al.] // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2012. – Vol. 349. – № 2. – P. 195-201.

131. Donkor E. S. Stroke in the 21st Century: A Snapshot of the Burden, Epidemiology, and Quality of Life. / E. S. Donkor // Stroke research and treatment. – 2018. – Vol. 2018. – P. 3238165.
132. Dratman M. B. Transport of iodothyronines from bloodstream to brain: contributions by blood:brain and choroid plexus:cerebrospinal fluid barriers / M. B. Dratman, F. L. Crutchfield, M. B. Schoenhoff // Brain Research. – 1991. – Vol. 554. – № 1-2. – P. 229-236.
133. Dual effects of thyroid hormone on neurons and neurogenesis in traumatic brain injury. / C. Lin, N. Li, H. Chang [et al.] // Cell death & disease. – 2020. – Vol. 11. – № 8. – P. 671.
134. Economic burden of stroke across Europe: A population-based cost analysis / R. Luengo-Fernandez, M. Violato, P. Candio, J. Leal // European Stroke Journal. – 2020. – Vol. 5. – № 1. – P. 17-25.
135. Effect of atorvastatin on expression of TLR4 and NF- κ B in stroke rats and its protective effect on brain / H. Y. Wang, Y. Hou, J. Sun [et al.] // European review for medical and pharmacological sciences. – 2020. – Vol. 24. – № 20. – P. 10799-10805.
136. Effect of Experimental Thyrotoxicosis onto Blood Coagulation: A Proteomics Study / B. Engelmann, J. Bischof, A.-L. Dirk [et al.] // European Thyroid Journal. – 2015. – Vol. 4. – № Suppl. 1. – P. 119-124.
137. Effect of sub-clinical hypothyroidism on clinical severity in first-ever acute ischemic stroke. / O. Oshinaike, A. Ogbera, A. Azenabor [et al.] // Nigerian quarterly journal of hospital medicine. – 2015. – Vol. 25. – № 2. – P. 95-98.
138. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues / P. Venditti, M. Balestrieri, S. Di Meo, T. De Leo // Journal of Endocrinology. – 1997. – Vol. 155. – № 1. – P. 151-157.
139. Effective Cellular Uptake and Efflux of Thyroid Hormone by Human Monocarboxylate Transporter 10 / E. C. H. Friesema, J. Jansen, J. W. Jachtenberg [et al.] // Molecular Endocrinology. – 2008. – Vol. 22. – № 6. – P. 1357-1369.

140. Effects of acute microinjections of the thyroid hormone derivative 3-iodothyronamine to the preoptic region of adult male rats on sleep, thermoregulation and motor activity / T. D. James, S. X. Moffett, T. S. Scanlan, J. V Martin // *Hormones and Behavior*. – 2013. – Vol. 64. – № 1. – P. 81-88.
141. Effects of Acute Triiodothyronine Treatment in Patients with Anterior Myocardial Infarction Undergoing Primary Angioplasty: Evidence from a Pilot Randomized Clinical Trial (ThyRepair Study). / C. I. Pantos, A. G. Trikas, E. G. Pissimisis [et al.] // *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. – 2022. – Vol. 32. – № 6. – P. 714-724.
142. Effects of the thyroid hormone derivatives 3-iodothyronamine and thyronamine on rat liver oxidative capacity / P. Venditti, G. Napolitano, L. Di Stefano [et al.] // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2011. – Vol. 341. – № 1-2. – P. 55-62.
143. Effects of tumour necrosis factor on cardiovascular disease and cancer: A two-sample Mendelian randomization study. / S. Yuan, P. Carter, M. Bruzelius [et al.] // *EBioMedicine*. – 2020. – Vol. 59. – P. 102956.
144. Elbers L. P. B. The influence of thyroid function on the coagulation system and its clinical consequences / L. P. B. Elbers, E. Fliers, S. C. Cannegieter // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. – 2018. – Vol. 16. – № 4. – P. 634-645.
145. Electrochemical sensing of the thyroid hormone thyronamine (T0AM) via molecular imprinted polymers (MIPs) / J. G. Pacheco, P. Rebelo, F. Cagide [et al.] // *Talanta*. – 2019. – Vol. 194. – P. 689-696.
146. Elevated platelet-derived growth factor AB/BB is associated with a lower risk of recurrent vascular events in stroke patients / K. Narasimhalu, L. Ma, D. A. De Silva [et al.] // *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*. – 2015. – Vol. 10. – № 1. – P. 85-89.
147. Eligibility and predictors for acute revascularization procedures in a stroke center / P. Vanacker, D. Lambrou, A. Eskandari [et al.] // *Stroke*. – 2016. – Vol. 47. – № 7. – P. 1844-1849.

148. Ellagic acid protects against neuron damage in ischemic stroke through regulating the ratio of Bcl-2/Bax expression / Q. S. Liu, R. Deng, S. Li [et al.] // *Appl Physiol Nutr Metab.* – 2017. – Vol. 42. – № 8. – P. 855-860.
149. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death / S. Elmore // *Toxicologic pathology.* – 2007. – Vol. 35. – № 4. – P. 495-516.
150. Endo H. Mitochondrial translocation of p53 underlies the selective death of hippocampal CA1 neurons after global cerebral ischaemia / H. Endo, A. Saito, P. H. Chan // *Biochemical Society Transactions.* – 2006. – Vol. 34. – № 6. – P. 1283-1286.
151. Endogenous IFN- β signaling exerts anti-inflammatory actions in experimentally induced focal cerebral ischemia / A. R. Inácio, Y. Liu, B. H. Clausen [et al.] // *Journal of Neuroinflammation.* – 2015. – Vol. 12. – № 1. – P. 1-18.
152. EphA4/Tie2 crosstalk regulates leptomeningeal collateral remodeling following ischemic stroke / B. Okyere, W. A. Mills, X. Wang [et al.] // *The Journal of clinical investigation.* – 2020. – Vol. 130. – № 2. – P. 1024-1035.
153. EphA4 regulates white matter remyelination after ischemic stroke through Ephexin-1/RhoA/ROCK signaling pathway / C. Liu, S. Han, J. Zheng [et al.] // *Glia.* – 2022. – Vol. 70. – № 10. – P. 1971-1991.
154. Evidence for extrathyroidal formation of 3-iodothyronamine in humans as provided by a novel monoclonal antibody-based chemiluminescent serum immunoassay / C. S. Hoefig, J. Köhrle, G. Brabant [et al.] // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* – 2011. – Vol. 96. – № 6. – P. 1864-1872.
155. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain / K. Jin, X. Wang, L. Xie [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 103. – № 35. – P. 13198-202.
156. Evolutionary Conservation of 3-Iodothyronamine as an Agonist at the Trace Amine-Associated Receptor 1 / M. Cöster, H. Biebermann, T. Schöneberg, C. Stäubert // *European Thyroid Journal.* – 2015. – Vol. 4. – № 1. – P. 9-20.

157. Exogenous T3 administration provides neuroprotection in a murine model of traumatic brain injury / R. Crupi, I. Paterniti, M. Campolo [et al.] // *Pharmacological Research*. – 2013. – Vol. 70. – № 1. – P. 80-89.
158. Factors Associated With Hearing Impairment in Patients With Congenital Hypothyroidism Treated Since the Neonatal Period: A National Population-Based Study / L. Lichtenberger-Geslin, S. Dos Santos, Y. Hassani [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2013. – Vol. 98. – № 9. – P. 3644-3652.
159. Fang Y.-Z. Free radicals, antioxidants, and nutrition / Y.-Z. Fang, S. Yang, G. Wu // *Nutrition*. – 2002. – Vol. 18. – № 10. – P. 872-879.
160. Favorable functional outcomes in acute ischemic stroke patients with subclinical hypothyroidism / F. H. Akhondi, A. Ghorbani, A. Soltani, A. Meysamie // *Neurology*. – 2011. – Vol. 77. – № 4. – P. 349-354.
161. Favorable influence of subclinical hypothyroidism on the functional outcomes in stroke patients / J. H. Baek, P. W. Chung, Y. B. Kim [et al.] // *Endocrine journal*. – 2010. – Vol. 57. – № 1. – P. 23-29.
162. Ferland R. J. Joubert Syndrome / R. J. Ferland, C. A. Walsh // *Encyclopedia of Neuroscience*. – 2010. – P. 249-256.
163. Ferroptosis—A Novel Mechanism With Multifaceted Actions on Stroke / X. L. Fang, S. Y. Ding, X. Z. Du [et al.] // *Frontiers in Neurology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 711.
164. Festjens N. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response / N. Festjens, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele // *Biochimica et biophysica acta*. – 2006. – Vol. 1757. – № 9-10. – P. 1371-1387.
165. Fingolimod enhances the efficacy of delayed alteplase administration in acute ischemic stroke by promoting anterograde reperfusion and retrograde collateral flow / D. C. Tian, K. Shi, Z. Zhu [et al.] // *Annals of Neurology*. – 2018. – Vol. 84. – № 5. – P. 717.

166. Flamant F. Genetic Investigation of Thyroid Hormone Receptor Function in the Developing and Adult Brain / F. Flamant, K. Gauthier, S. Richard // *Current Topics in Developmental Biology*. – 2017. – Vol. 125. – P. 303-335.
167. Fluoxetine Enhances Neurogenesis in Aged Rats with Cortical Infarcts, but This is not Reflected in a Behavioral Recovery / X. Sun, Z. Zhou, T. Liu [et al.] // *Journal of molecular neuroscience : MN*. – 2016. – Vol. 58. – № 2. – P. 233-242.
168. Foo J. N. CHCHD2 and Parkinson's disease / J. N. Foo, J. Liu, E. K. Tan // *The Lancet Neurology*. – 2015. – Vol. 14. – № 7. – P. 681-682.
169. Forman H. J. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy / H. J. Forman, H. Zhang // *Nature Reviews Drug Discovery* 2021 20:9. – 2021. – Vol. 20. – № 9. – P. 689-709.
170. Gagliano Taliun S. A. Ten simple rules for conducting a mendelian randomization study / S. A. Gagliano Taliun, D. M. Evans // *PLOS Computational Biology*. – 2021. – Vol. 17. – № 8. – P. e1009238.
171. Gan L. Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases / L. Gan, J. A. Johnson // *Biochimica et biophysica acta*. – 2014. – Vol. 1842. – № 8. – P. 1208-1218.
172. GC O. Stroke-associated pattern of gene expression previously identified by machine-learning is diagnostically robust in an independent patient population / O. GC, C. PD, B. TL // *Genomics data*. – 2017. – Vol. 14.
173. Genetic control of RNA splicing and its distinct role in complex trait variation / T. Qi, Y. Wu, H. Fang [et al.] // *Nature Genetics* 2022 54:9. – 2022. – Vol. 54. – № 9. – P. 1355-1363.
174. Genetic determinants of blood lipids and cerebral small vessel disease: role of high-density lipoprotein cholesterol / M. K. Georgakis, R. Malik, C. D. Anderson [et al.] // *Brain*. – 2020. – Vol. 143. – № 2. – P. 597-610.
175. Genetic Imbalance Is Associated with Functional Outcome after Ischemic Stroke / D. Pfeiffer, B. Chen, K. Schlicht [et al.] // *Stroke*. – 2019. – Vol. 50. – № 2. – P. 298-304.

176. Genetic predictors of testosterone and their associations with cardiovascular disease and risk factors: A Mendelian randomization investigation / C. M. Schooling, S. Luo, S. L. Au Yeung [et al.] // *International journal of cardiology*. – 2018. – Vol. 267. – P. 171-176.
177. Genetically determined blood pressure, antihypertensive drug classes, and risk of stroke subtypes / M. K. Georgakis, D. Gill, A. J. S. Webb [et al.] // *Neurology*. – 2020. – Vol. 95. – № 4. – P. E353-E361.
178. Genetically Predicted Blood Pressure Across the Lifespan: Differential Effects of Mean and Pulse Pressure on Stroke Risk / M. K. Georgakis, D. Gill, R. Malik [et al.] // *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. – 2020. – Vol. 76. – № 3. – P. 953-961.
179. Genetics of ischaemic stroke in young adults / E. Terni, N. Giannini, M. Brondi [et al.] // *BBA Clinical*. – 2015. – Vol. 3. – P. 96-106.
180. Genome-wide analyses identify a role for SLC17A4 and AADAT in thyroid hormone regulation / A. Teumer, L. Chaker, S. Groeneweg [et al.] // *Nature Communications* 2018 9:1. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 1-14.
181. Genome-Wide Analysis Identifies Two Susceptibility Loci for Positive Thyroid Peroxidase and Thyroglobulin Antibodies / A. Matana, T. Boutin, V. Torlak [et al.] // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2020. – Vol. 105. – № 3.
182. Genome-wide association meta-analysis of functional outcome after ischemic stroke / M. Söderholm, A. Pedersen, E. Lorentzen [et al.] // *Neurology*. – 2019. – Vol. 92. – № 12. – P. e1271-e1283.
183. Genome-wide association studies / E. Uffelmann, Q. Q. Huang, N. S. Munung [et al.] // *Nature Reviews Methods Primers* 2021 1:1. – 2021. – Vol. 1. – № 1. – P. 1-21.
184. Genome-wide association study of intracranial aneurysms identifies 17 risk loci and genetic overlap with clinical risk factors / M. K. Bakker, R. A. A. van der Spek, W. van Rheenen [et al.] // *Nature genetics*. – 2020. – Vol. 52. – № 12. – P. 1303.
185. Genome-wide association study of selenium concentrations / M. C. Cornelis, M. Fornage, M. Foy [et al.] // *Human molecular genetics*. – 2015. – Vol. 24. – № 5. – P. 1469-1477.

186. Genome-wide meta-analysis identifies novel gender specific loci associated with thyroid antibodies level in Croatians / A. Matana, M. Popović, T. Boutin [et al.] // *Genomics*. – 2019. – Vol. 111. – № 4. – P. 737-743.
187. Genomic atlas of the human plasma proteome / B. B. Sun, J. C. Maranville, J. E. Peters [et al.] // *Nature* 2018 558:7708. – 2018. – Vol. 558. – № 7708. – P. 73-79.
188. Gilsbach R. Are the pharmacology and physiology of α 2adrenoceptors determined by α 2-heteroreceptors and autoreceptors respectively? / R. Gilsbach, L. Hein // *British Journal of Pharmacology*. – 2012. – Vol. 165. – № 1. – P. 90-102.
189. GISCOME - Genetics of Ischaemic Stroke Functional Outcome network: A protocol for an international multicentre genetic association study / J. M. Maguire, S. Bevan, T. M. Stanne [et al.] // *European stroke journal*. – 2017. – Vol. 2. – № 3. – P. 229-237.
190. Global, Regional, and Country-Specific Lifetime Risks of Stroke, 1990 and 2016 // *New England Journal of Medicine*. – 2018. – Vol. 379. – № 25. – P. 2429-2437.
191. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 / N. J. Kassebaum, M. Arora, R. M. Barber [et al.] // *The Lancet*. – 2016. – Vol. 388. – № 10053. – P. 1603-1658.
192. Göritz C. Neural stem cells and neurogenesis in the adult / C. Göritz, J. Frisén // *Cell Stem Cell*. – 2012. – Vol. 10. – № 6. – P. 657-9.
193. Govan L. Categorizing stroke prognosis using different stroke scales / L. Govan, P. Langhorne, C. J. Weir // *Stroke*. – 2009. – Vol. 40. – № 10. – P. 3396-3399.
194. Grande L. A. C. De. A Fresh Look at the Relationship between TSH and Free Thyroxine in Cross-Sectional Data / L. A. C. De Grande, K. Van Uytvanghe, L. M. Thienpont // *European Thyroid Journal*. – 2015. – Vol. 4. – № 1. – P. 69-70.
195. Grefkes C. Recovery from stroke: current concepts and future perspectives / C. Grefkes, G. R. Fink // *Neurological Research and Practice* 2020 2:1. – 2020. – Vol. 2. – № 1. – P. 1-10.
196. Guidelines for Adult Stroke Rehabilitation and Recovery / C. J. Winstein, J. Stein, R. Arena [et al.] // *Stroke*. – 2016. – Vol. 47. – № 6. – P. e98-e169.

197. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. / W. N. Kernan, B. Ovbiagele, H. R. Black [et al.] // *Stroke; a journal of cerebral circulation*. – 2014. – Vol. 45. – № 7. – P. 2160-236.
198. Halothane Selectively Inhibits Nonshivering Thermogenesis / A. Dicker, K. B. E. Ohlson, L. Johnson [et al.] // *Anesthesiology*. – 1995. – Vol. 82. – № 2. – P. 491-501.
199. Hankey G. J. Nutrition and the risk of stroke / G. J. Hankey // *The Lancet Neurology*. – 2012. – Vol. 11. – № 1. – P. 66-81.
200. Harnessing cortical plasticity via gabapentinoid administration promotes recovery after stroke / A. Tedeschi, M. J. E. Larson, A. Zouridakis [et al.] // *Brain*. – 2022. – Vol. 145. – № 7. – P. 2378-2393.
201. Hayashi H. Endogenous Neuroprotective Molecules and Their Mechanisms in the Central Nervous System / H. Hayashi, N. Takagi // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2015. – Vol. 38. – № 8. – P. 1104-1108.
202. Heart Disease and Stroke Statistics - 2021 Update: A Report From the American Heart Association / S. S. Virani, A. Alonso, H. J. Aparicio [et al.] // *Circulation*. – 2021. – Vol. 143. – № 8. – P. E254-E743.
203. Helios M. Package “pwr” Title Basic Functions for Power Analysis. – URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/pwr/pwr.pdf> (date accessed: 05.06.2022). – Text : electronic.
204. Histamine mediates behavioural and metabolic effects of 3-iodothyroacetic acid, an endogenous end product of thyroid hormone metabolism / C. Musilli, G. De Siena, M. E. Manni [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. – 2014. – Vol. 171. – № 14. – P. 3476-3484.
205. Homozygous R136S mutation in PRNP gene causes inherited early onset prion disease / T. Ximelis, A. Marín-Moreno, J. C. Espinosa [et al.] // *Alzheimer’s Research and Therapy*. – 2021. – Vol. 13. – № 1. – P. 1-13.

206. Howden R. Nrf2 and cardiovascular defense. / R. Howden // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 104308.
207. Hu F. A mechanism to enhance cellular responsiveness to hormone action: Krüppel-like factor 9 promotes thyroid hormone receptor- β autoinduction during postembryonic brain development / F. Hu, J. R. Knoedler, R. J. Denver // *Endocrinology*. – 2016. – Vol. 157. – № 4. – P. 1683-1693.
208. Hu X. F. Circulating Selenium Concentration Is Inversely Associated With the Prevalence of Stroke: Results From the Canadian Health Measures Survey and the National Health and Nutrition Examination Survey / X. F. Hu, S. Stranges, L. H. M. Chan // *Journal of the American Heart Association*. – 2019. – Vol. 8. – № 10.
209. Human urinary kallidinogenase in treating acute ischemic stroke patients: analyses of pooled data from a randomized double-blind placebo-controlled phase IIb and phase III clinical trial / Y. Dong, J. Qu, Z. Zhang [et al.] // *Neurological research*. – 2020. – Vol. 42. – № 4. – P. 286-290.
210. Hunyadi A. The mechanism(s) of action of antioxidants: From scavenging reactive oxygen/nitrogen species to redox signaling and the generation of bioactive secondary metabolites / A. Hunyadi // *Medicinal Research Reviews*. – 2019. – Vol. 39. – № 6. – P. 2505-2533.
211. Hypothyroidism as a protective factor in acute stroke patients / M. Alevizaki, M. Syntetou, K. Xynos [et al.] // *Clinical Endocrinology*. – 2006. – Vol. 65. – № 3. – P. 369-372.
212. Hypothyroidism impairs antioxidant defence system and testicular physiology during development and maturation / D. K. Sahoo, A. Roy, S. Bhanja, G. B. N. Chainy // *General and comparative endocrinology*. – 2008. – Vol. 156. – № 1. – P. 63-70.
213. Hypoxia promotes efficient differentiation of human embryonic stem cells to functional endothelium / S. Prado-Lopez, A. Conesa, A. Armiñán [et al.] // *Stem cells (Dayton, Ohio)*. – 2010. – Vol. 28. – № 3. – P. 407-418.

214. Ianculescu A. G. 3-Iodothyronamine (T 1AM): A new chapter of thyroid hormone endocrinology? / A. G. Ianculescu, T. S. Scanlan // *Molecular BioSystems*. – 2010. – Vol. 6. – № 8. – P. 1338-1344.
215. Identification of a novel synaptic protein, TMTC3, involved in periventricular nodular heterotopia with intellectual disability and epilepsy / S. M. K. Farhan, K. C. J. Nixon, M. Everest [et al.] // *Hum Mol Genet*. – 2017. – Vol. 26. – № 21. – P. 4278-4289.
216. Importance of Thyroid Hormone level and Genetic Variations in Deiodinases for Patients after Acute Myocardial Infarction: A Longitudinal Observational Study / N. Kazukauskienė, D. Skiriute, O. Gustiene [et al.] // *Scientific reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1.
217. Improvement of blood inflammatory marker levels in patients with hypothyroidism under levothyroxine treatment / R. C. Marchiori, L. A. F. Pereira, A. A. Naujorks [et al.] // *BMC Endocrine Disorders*. – 2015. – Vol. 15. – № 1. – P. 1-9.
218. Imran R. Acute Reperfusion Therapies for Acute Ischemic Stroke / R. Imran, G. A. Mohamed, F. Nahab // *Journal of Clinical Medicine*. – 2021. – Vol. 10. – № 16. – P. 3677.
219. In the brain of mice, 3-iodothyronamine (T1AM) is converted into 3-iodothyroacetic acid (TA1) and it is included within the signaling network connecting thyroid hormone metabolites with histamine / A. Laurino, G. De Siena, A. Saba [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2015. – Vol. 761. – P. 130-134.
220. In vivo effects of repeated thyronamine administration in male C57BL/6J mice / L. Harder, N. Schanze, A. Sarsenbayeva [et al.] // *European Thyroid Journal*. – 2018. – Vol. 7. – № 1. – P. 3-12.
221. Indirect estimation of age-related reference limits of thyroid parameters: A cross-sectional study of outpatients' results / N. Milinković, S. Ignjatović, M. Žarković [et al.] // *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. – 2014. – Vol. 74. – № 5. – P. 378-384.

222. Induction of the Wnt inhibitor, Dickkopf-1, is associated with neurodegeneration related to temporal lobe epilepsy / C. L. Busceti, F. Biagioni, E. Aronica [et al.] // *Epilepsia*. – 2007. – Vol. 48. – № 4. – P. 694-705.
223. Intracerebral hemorrhage with hypothyroidism / A. Czap, J. P. Shoup, J. Winkler [et al.] // *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. – 2013. – Vol. 22. – № 8.
224. Intravenous minocycline in acute stroke: A randomized, controlled pilot study and meta-analysis / E. Kohler, D. A. Prentice, T. R. Bates [et al.] // *Stroke*. – 2013. – Vol. 44. – № 9. – P. 2493-2499.
225. Is Selenium Supplementation Beneficial in Acute Ischemic Stroke? / M. Ramezani, L. Simani, S. Abedi, H. Pakdaman // *Neurologist*. – 2022. – Vol. 27. – № 2. – P. 51-55.
226. Ischemic Stroke and Impact of Thyroid Profile at Presentation: A Systematic Review and Meta-analysis of Observational Studies / R. Dhital, D. R. Poudel, N. Tachamo [et al.] // *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. – 2017. – Vol. 26. – № 12. – P. 2926-2934.
227. Ischemic stroke functional outcomes are independently associated with C-reactive protein concentrations and cognitive outcomes with triiodothyronine concentrations: A pilot study / A. Bunevicius, H. Kazlauskas, N. Raskauskiene [et al.] // *Endocrine*. – 2014. – Vol. 45. – № 2. – P. 213-220.
228. Ischemic stroke outcome: A review of the influence of post-stroke complications within the different scenarios of stroke care / A. Bustamante, T. García-Berrocso, N. Rodriguez [et al.] // *European Journal of Internal Medicine*. – 2016. – Vol. 29. – P. 9-21.
229. Jelinek M. Oxidative Stress in the Brain: Basic Concepts and Treatment Strategies in Stroke / M. Jelinek, M. Jurajda, K. Duris // *Antioxidants* 2021, Vol. 10, Page 1886. – 2021. – Vol. 10. – № 12. – P. 1886.
230. Joubert syndrome (and related disorders) (OMIM 213300) / M. A. Parisi, D. Doherty, P. F. Chance, I. A. Glass // *European Journal of Human Genetics* 2007 15:5. – 2007. – Vol. 15. – № 5. – P. 511-521.

231. Kanyal N. The science of ischemic stroke: Pathophysiology & Pharmacological treatment / Kanyal N // International Journal of Pharma Research & Review. – 2015. – Vol. 4. – № 10. – P. 65-84.
232. Katyare S. S. Influence of thyroid hormone treatment on the respiratory activity of cerebral mitochondria from hypothyroid rats. A critical re-assessment / S. S. Katyare, R. R. Rajan // Experimental Neurology. – 2005. – Vol. 195. – № 2. – P. 416-422.
233. Keap1/Nrf2 Signaling: A New Player in Thyroid Pathophysiology and Thyroid Cancer / C. O. Renaud, P. G. Ziros, D. V. Chartoumpekis [et al.] // Frontiers in Endocrinology. – 2019. – Vol. 10. – P. 510.
234. Kippersluis H. Van. Pleiotropy-robust Mendelian randomization / H. Van Kippersluis, C. A. Rietveld // International Journal of Epidemiology. – 2018. – Vol. 47. – № 4. – P. 1279-1288.
235. Klein J. R. The immune system as a regulator of thyroid hormone activity / J. R. Klein // Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.). – 2006. – Vol. 231. – № 3. – P. 229-236.
236. Koehler R. C. Targeting Parthanatos in Ischemic Stroke / R. C. Koehler, V. L. Dawson, T. M. Dawson // Frontiers in Neurology. – 2021. – Vol. 12. – P. 622.
237. Koh S. H. Neurogenesis in Stroke Recovery / S. H. Koh, H. H. Park // Translational Stroke Research. – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. 3-13.
238. Köhrle J. Selenium and the thyroid / J. Köhrle // Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity. – 2013. – Vol. 20. – № 5. – P. 441-448.
239. Köhrle J. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action / J. Köhrle // Cellular and molecular life sciences : CMLS. – 2000. – Vol. 57. – № 13-14. – P. 1853-1863.
240. Köhrle J. Thyroid hormones and derivatives: Endogenous thyroid hormones and their targets / J. Köhrle // Methods in Molecular Biology. – 2018. – Vol. 1801. – P. 85-104.

241. L-Thyroxine Attenuates Pyramidal Neuron Excitability in Rat Acute Prefrontal Cortex Slices / J. H. Cao, J. Pan, H.-Y. Lin [et al.] // *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*. – 2012. – Vol. 11. – № 3. – P. 152-156.
242. Lanculescu A. G. Identification and characterization of 3-iodothyronamine intracellular transport / A. G. Lanculescu, K. M. Giacomini, T. S. Scanlan // *Endocrinology*. – 2009. – Vol. 150. – № 4. – P. 1991-1999.
243. Langhorne P. Organised inpatient (stroke unit) care for stroke / P. Langhorne // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2013. – Vol. 2013. – № 9.
244. Larsen P. R. Role of the Iodothyronine Deiodinases in the Physiology and Pathophysiology of Thyroid Hormone Action / P. R. Larsen, A. M. Zavacki // *European Thyroid Journal*. – 2012. – P. 232-242.
245. Late onset spinal motor neuronopathy is caused by mutation in CHCHD10 / S. Penttilä, M. Jokela, H. Bouquin [et al.] // *Annals of neurology*. – 2015. – Vol. 77. – № 1. – P. 163-172.
246. Laurino A. Thyroid Homeostasis: An Intricate Network of Production, Transport, Metabolism and Receptors Interaction / A. Laurino, L. Raimondi // *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 6751. – 2022. – Vol. 23. – № 12. – P. 6751.
247. Li B. From GWAS to Gene: Transcriptome-Wide Association Studies and Other Methods to Functionally Understand GWAS Discoveries / B. Li, M. D. Ritchie // *Frontiers in Genetics*. – 2021. – Vol. 12.
248. Li Y. C. Intraventricular infusion of a low fraction of serum enhances neurogenesis and improves recovery in a rodent stroke model / Y. C. Li, L. K. Tsai, T. H. Young // *Neuroscience letters*. – 2016. – Vol. 611. – P. 14-20.
249. Liegro I. Di. Thyroid hormones and the central nervous system of mammals (Review) / I. Di Liegro // *Molecular Medicine Reports*. – 2008. – Vol. 1. – № 3. – P. 279-295.
250. Lindvall O. Neurogenesis following Stroke Affecting the Adult Brain / O. Lindvall, Z. Kokaia // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2015. – Vol. 7. – № 11. – P. a019034.

251. Linkermann A. Necroptosis / A. Linkermann, D. R. Green // *The New England journal of medicine*. – 2014. – Vol. 370. – № 5. – P. 455-465.
252. Lipoxin A4 regulates microglial M1/M2 polarization after cerebral ischemia-reperfusion injury via the Notch signaling pathway / Q. Q. Li, D. H. Ding, X. Y. Wang [et al.] // *Experimental Neurology*. – 2021.
253. Liu S. Targeting ischemic penumbra Part I: from pathophysiology to therapeutic strategy / S. Liu, S. R. Levine, H. R. Winn // *Journal of Experimental Stroke and Translational Medicine*. – 2010. – Vol. 3. – № 1. – P. 47-55.
254. Losi G. Nongenomic regulation of glutamatergic neurotransmission in hippocampus by thyroid hormones / G. Losi, G. Garzon, G. Puia // *Neuroscience*. – 2008. – Vol. 151. – № 1. – P. 155-163.
255. Loss of Ahi1 Affects Early Development by Impairing BM88/Cend1-Mediated Neuronal Differentiation / L. Weng, Y. F. Lin, A. L. Li [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2013. – Vol. 33. – № 19. – P. 8172-8184.
256. Low free triiodothyronine levels are related to poor prognosis in acute ischemic stroke / W. Ambrosius, R. Kazmierski, V. Gupta [et al.] // *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. – 2011. – Vol. 119. – № 3. – P. 139-143.
257. Low free triiodothyronine predicts poor functional outcome after acute ischemic stroke / S. Suda, K. Muraga, T. Kanamaru [et al.] // *Journal of the Neurological Sciences*. – 2016. – Vol. 368. – P. 89-93.
258. Low T3 syndrome predicts severe neurological deficits of cerebral infarction inpatients with large artery atherosclerosis in internal carotid artery system / G. H. Wu, F. Z. Kong, Q. Z. Cheng [et al.] // *Neuroendocrinology Letters*. – 2014. – Vol. 35. – № 2. – P. 149-153.
259. Luo C. The pathways by which mild hypothermia inhibits neuronal apoptosis following ischemia/reperfusion injury / C. Luo, S. Y. Pan // *Neural Regeneration Research*. – 2015. – Vol. 10. – № 1. – P. 153.
260. Machine learning methods for functional recovery prediction and prognosis in post-stroke rehabilitation: a systematic review / S. Campagnini, C. Arienti, M.

- Patrini [et al.] // *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*. – 2022. – Vol. 19. – № 1. – P. 1-22.
261. Mainali S. Machine Learning in Action: Stroke Diagnosis and Outcome Prediction / S. Mainali, M. E. Darsie, K. S. Smetana // *Frontiers in Neurology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 2153.
262. Majid A. Neuroprotection in Stroke: Past, Present, and Future / A. Majid // *ISRN Neurology*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1-17.
263. Mann G. E. Introduction to Special Issue on 'Nrf2 Regulated Redox Signaling and Metabolism in Physiology and Medicine / G. E. Mann, H. J. Forman // *Free radical biology & medicine*. – 2015. – Vol. 88. – № Pt B. – P. 91-92.
264. Martinod K. Immunothrombosis and thromboinflammation in host defense and disease / K. Martinod, C. Deppermann // *Platelets*. – 2021. – Vol. 32. – № 3. – P. 314-324.
265. Martinod K. Thrombosis: tangled up in NETs / K. Martinod, D. D. Wagner // *Blood*. – 2014. – Vol. 123. – № 18. – P. 2768.
266. Maternal thyroid hormone deficiency affects the fetal neocortico-genesis by reducing the proliferating pool, rate of neurogenesis and indirect neurogenesis / V. Mohan, R. A. Sinha, A. Pathak [et al.] // *Experimental neurology*. – 2012. – Vol. 237. – № 2. – P. 477-488.
267. Mendelian randomisation and experimental medicine approaches to interleukin-6 as a drug target in pulmonary arterial hypertension / M. Toshner, C. Church, L. Harbaum [et al.] // *European Respiratory Journal*. – 2022. – Vol. 59. – № 3.
268. Mendelian randomization: using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology. / D. A. Lawlor, R. M. Harbord, J. A. C. Sterne [et al.] // *Statistics in medicine*. – 2008. – Vol. 27. – № 8. – P. 1133-1163.
269. Mendelian randomization / E. Sanderson, M. M. Glymour, M. V. Holmes [et al.] // *Nature Reviews Methods Primers* 2022 2:1. – 2022. – Vol. 2. – № 1. – P. 1-21.
270. Mendelian randomization integrating GWAS and eQTL data reveals genetic determinants of complex and clinical traits / E. Porcu, S. Rüeger, K. Lepik [et al.] // *Nature Communications* 2019 10:1. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-12.

271. MendelianRandomization v0.5.0: updates to an R package for performing Mendelian randomization analyses using summarized data. / J. R. Broadbent, C. N. Foley, A. J. Grant [et al.] // Wellcome open research. – 2020. – Vol. 5. – P. 252.
272. Menet R. Wnt Pathway: An Emerging Player in Vascular and Traumatic Mediated Brain Injuries / R. Menet, S. Lecordier, A. ElAli // Frontiers in Physiology. – 2020. – Vol. 11. – P. 1149.
273. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies 1q22 as a susceptibility locus for intracerebral hemorrhage / D. Woo, G. J. Falcone, W. J. Devan [et al.] // American journal of human genetics. – 2014. – Vol. 94. – № 4. – P. 511-521.
274. Mild hypothermia after intravenous thrombolysis in patients with acute stroke: A randomized controlled trial / K. Piironen, M. Tiainen, S. Mustanoja [et al.] // Stroke. – 2014. – Vol. 45. – № 2. – P. 486-491.
275. Mild hypothermia reduces endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and improves neuronal functions after severe traumatic brain injury / C. F. Wang, C. C. Zhao, Y. He [et al.] // Brain and Behavior. – 2019. – Vol. 9. – № 4. – P. e01248.
276. Mild Therapeutic Hypothermia Protects the Brain from Ischemia/Reperfusion Injury through Upregulation of iASPP / X. Liu, S. Wen, S. Zhao [et al.] // Aging and Disease. – 2018. – Vol. 9. – № 3. – P. 401.
277. Minocycline and tissue-type plasminogen activator for stroke: assessment of interaction potential. / L. S. Machado, I. Y. Sazonova, A. Kozak [et al.] // Stroke; a journal of cerebral circulation. – 2009. – Vol. 40. – № 9. – P. 3028-3033.
278. Minocycline to Improve Neurologic Outcome in Stroke (MINOS): A dose-finding study / S. C. Fagan, J. L. Waller, F. T. Nichols [et al.] // Stroke. – 2010. – Vol. 41. – № 10. – P. 2283-2287.
279. Mitochondrial DNA Copy Number as a Marker and Mediator of Stroke Prognosis: Observational and Mendelian Randomization Analyses / M. R. Chong, S. Narula, R. Morton [et al.] // Neurology. – 2022. – Vol. 98. – № 5. – P. E470-E482.

280. Mitochondrial Dysfunction in Stroke: Implications of Stem Cell Therapy / D. Sarmah, H. Kaur, J. Saraf [et al.] // *Translational stroke research*. – 2018. – Vol. 10. – № 2. – P. 121-136.
281. Mitochondrial F₀F₁-ATP synthase is a molecular target of 3-iodothyronamine, an endogenous metabolite of thyroid hormone / S. Cumero, F. Fogolari, R. Domenis [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. – 2012. – Vol. 166. – № 8. – P. 2331-2347.
282. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis / E. Daugas, S. A. Susin, N. Zamzami [et al.] // *The FASEB Journal*. – 2000. – Vol. 14. – № 5. – P. 729-739.
283. Mittag J. More Than Fever - Novel Concepts in the Regulation of Body Temperature by Thyroid Hormones / J. Mittag // *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. – 2020. – Vol. 128. – № 6-07. – P. 428-431.
284. Molecular Basis for Certain Neuroprotective Effects of Thyroid Hormone / H.-Y. Lin, F. B. Davis, M. K. Luidens [et al.] // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2011. – Vol. 4. – P. 29.
285. Molecular Basis for Certain Neuroprotective Effects of Thyroid Hormone / H.-Y. Lin, F. B. Davis, M. K. Luidens [et al.] // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2011. – Vol. 4. – № October. – P. 1-6.
286. Monocyte depletion early after stroke promotes neurogenesis from endogenous neural stem cells in adult brain / C. Laterza, S. Wattananit, N. Uoshima [et al.] // *Experimental neurology*. – 2017. – Vol. 297. – P. 129-137.
287. Multiancestry genome-wide association study of 520,000 subjects identifies 32 loci associated with stroke and stroke subtypes / R. Malik, G. Chauhan, M. Traylor [et al.] // *Nature Genetics* 2018 50:4. – 2018. – Vol. 50. – № 4. – P. 524-537.
288. Mutation in the novel nuclear-encoded mitochondrial protein CHCHD10 in a family with autosomal dominant mitochondrial myopathy / S. Ajroud-Driss, F. Fecto, K. Ajroud [et al.] // *Neurogenetics*. – 2015. – Vol. 16. – № 1. – P. 1-9.

289. Neuropilin-1 Is a Direct Target of the Transcription Factor E2F1 during Cerebral Ischemia-Induced Neuronal Death In Vivo / S. X. Jiang, M. Sheldrick, A. Desbois [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. – 2007. – Vol. 27. – № 5. – P. 1696.
290. Neuroprotection by Exogenous and Endogenous Neuregulin-1 in Mouse Models of Focal Ischemic Stroke / J. M. Noll, Y. Li, T. J. Distel [et al.] // *Journal of Molecular Neuroscience* 2019 69:2. – 2019. – Vol. 69. – № 2. – P. 333-342.
291. Neuroprotection in Acute Ischemic Stroke: A Battle Against the Biology of Nature / S. Ghozy, A. Reda, J. Varney [et al.] // *Frontiers in neurology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 870141.
292. Neuroprotection in stroke: the importance of collaboration and reproducibility / A. A. Neuhaus, Y. Couch, G. Hadley, A. M. Buchan // *Brain*. – 2017. – Vol. 140. – № 8. – P. 2079-2092.
293. Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton / U. Laufs, M. Endres, N. Stagliano [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2000. – Vol. 106. – № 1. – P. 15-24.
294. Neurovascular pathophysiology in cerebral ischemia, dementia and the ageing brain - current trends in basic, translational and clinical research. / J. Boltze, C. Kleinschnitz, K. G. Reymann [et al.] // *Experimental & translational stroke medicine*. – 2012. – Vol. 4. – № 1. – P. 14.
295. Neurovascular protection by post-ischemic intravenous injections of the lipoxin A4 receptor agonist, BML-111, in a rat model of ischemic stroke / K. E. Hawkins, K. M. DeMars, J. Singh [et al.] // *Journal of Neurochemistry*. – 2014.
296. Neutrophil extracellular traps regulate ischemic stroke brain injury / F. Denorme, I. Portier, J. L. Rustad [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2022. – Vol. 132. – № 10.
297. Neutrophil extracellular traps released by neutrophils impair revascularization and vascular remodeling after stroke / L. Kang, H. Yu, X. Yang [et al.] // *Nature Communications* 2020 11:1. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 1-15.

298. New insights into neutrophil extracellular traps: Mechanisms of formation and role in inflammation / H. Yang, M. H. Biermann, J. M. Brauner [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2016. – Vol. 7. – № AUG. – P. 302.
299. New insights into the potential roles of 3-Iodothyronamine (T1AM) and newly developed thyronamine-like TAAR1 agonists in neuroprotection / L. Bellusci, A. Laurino, M. Sabatini [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2017. – Vol. 8. – № DEC. – P. 1-17.
300. New insights into the potential roles of 3-Iodothyronamine (T1AM) and newly developed thyronamine-like TAAR1 agonists in neuroprotection / L. Bellusci, A. Laurino, M. Sabatini [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2017. – Vol. 8. – № DEC. – P. 905.
301. Normal thermoregulatory responses to 3-iodothyronamine, trace amines and amphetamine-like psychostimulants in trace amine associated receptor 1 knockout mice / H. N. Panas, L. J. Lynch, E. J. Vallender [et al.] // *Journal of Neuroscience Research*. – 2010. – Vol. 88. – № 9. – P. 1962-1969.
302. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review / E. Obeng // *Brazilian Journal of Biology*. – 2020. – Vol. 81. – № 4. – P. 1133-1143.
303. Oliveira da Silva M. I. Linking Alpha-Synuclein to the Actin Cytoskeleton: Consequences to Neuronal Function / M. I. Oliveira da Silva, M. A. Liz // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 787.
304. Optimisation of imidazole compounds as selective TAAR1 agonists: Discovery of RO5073012 / G. Galley, H. Stalder, A. Goergler [et al.] // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2012. – Vol. 22. – № 16. – P. 5244-5248.
305. Ordinal outcome analysis improves the detection of between-hospital differences in outcome / I. E. Ceyisakar, N. van Leeuwen, D. W. J. Dippel [et al.] // *BMC Medical Research Methodology*. – 2021. – Vol. 21. – № 1. – P. 1-11.
306. Ordinal Prediction Model of 90-Day Modified Rankin Scale in Ischemic Stroke / M. Y. Zhang, M. Mlynash, K. L. Sainani [et al.] // *Frontiers in Neurology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 1851.

307. Ordinal vs dichotomous analyses of modified Rankin Scale, 5-year outcome, and cost of stroke / A. Ganesh, R. Luengo-Fernandez, R. M. Wharton, P. M. Rothwell // *Neurology*. – 2018. – Vol. 91. – № 21. – P. e1951-e1960.
308. PATJ Low Frequency Variants Are Associated with Worse Ischemic Stroke Functional Outcome: A Genome-Wide Meta-Analysis: Genetic contribution to functional Outcome and Disability after Stroke (GODS) Project, NINDS Stroke Genetics Network (SiGN), Internation / M. Mola-Caminal, C. Carrera, C. Soriano-Tárraga [et al.] // *Circulation research*. – 2019. – Vol. 124. – № 1. – P. 114.
309. Paul S. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: An overview of clinical and preclinical studies / S. Paul, E. Candelario-Jalil // *Experimental neurology*. – 2021. – Vol. 335. – P. 113518.
310. Pharmacological approaches promoting stem cell-based therapy following ischemic stroke insults / S. Z. Zhu, V. Szeto, M. H. Bao [et al.] // *Acta Pharmacologica Sinica* 2018 39:5. – 2018. – Vol. 39. – № 5. – P. 695-712.
311. Pharmacological effects of 3-iodothyronamine (T1AM) in mice include facilitation of memory acquisition and retention and reduction of pain threshold / M. E. Manni, G. De Siena, A. Saba [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. – 2013. – Vol. 168. – № 2. – P. 354-362.
312. Pharmacological Modulation of Neutrophil Extracellular Traps Reverses Thrombotic Stroke tPA (Tissue-Type Plasminogen Activator) Resistance / C. Peña-Martínez, V. Durán-Laforet, A. García-Culebras [et al.] // *Stroke*. – 2019. – Vol. 50. – № 11. – P. 3228-3237.
313. Pharmacological neuroprotection after perinatal hypoxic-ischemic brain injury. / X. Fan, A. Kavelaars, C. J. Heijnen [et al.] // *Current neuropharmacology*. – 2010. – Vol. 8. – № 4. – P. 324-334.
314. Phase I randomized trial of liothyronine for remyelination in multiple sclerosis: A dose-ranging study with assessment of reliability of visual outcomes / L. Wooliscroft, G. Altowaijri, A. Hildebrand [et al.] // *Multiple sclerosis and related disorders*. – 2020. – Vol. 41.

315. PhenoScanner V2: an expanded tool for searching human genotype-phenotype associations / M. A. Kamat, J. A. Blackshaw, R. Young [et al.] // *Bioinformatics* (Oxford, England). – 2019. – Vol. 35. – № 22. – P. 4851-4853.
316. Pierce B. L. Power and instrument strength requirements for Mendelian randomization studies using multiple genetic variants / B. L. Pierce, H. Ahsan, T. J. Vanderweele // *International Journal of Epidemiology*. – 2011. – Vol. 40. – № 3. – P. 740-752.
317. Plasma proteome and metabolome characterization of an experimental human thyrotoxicosis model / M. Pietzner, B. Engelmann, T. Kacprowski [et al.] // *BMC Medicine*. – 2017. – Vol. 15. – № 1. – P. 1-18.
318. Popławski P. Tyronaminy – dekarboksylowane pochodne hormonów tarczycy – nowa rodzina cząsteczek sygnałowych? / P. Popławski // *Postępy Nauk Medycznych*. – 2011. – Vol. XXIV. – № 11. – P. 957-962.
319. Post-ischaemic thyroid hormone treatment in a rat model of acute stroke / T. Genovese, D. Impellizzeri, A. Ahmad [et al.] // *Brain Research*. – 2013. – Vol. 1513. – P. 92-102.
320. Preclinical safety and pharmacokinetic profile of 3K3A-APC, a novel, modified activated protein C for ischemic stroke / P. D. Williams, B. V. Zlokovic, J. H. Griffin [et al.] // *Current pharmaceutical design*. – 2012. – Vol. 18. – № 27. – P. 4215-4222.
321. Prezioso G. Effect of Thyroid Hormones on Neurons and Neurodevelopment / G. Prezioso, C. Giannini, F. Chiarelli // *Hormone Research in Paediatrics*. – 2018. – Vol. 90. – № 2. – P. 73-81.
322. Prion Protein Regulates Iron Transport by Functioning as a Ferrireductase / A. Singh, S. Haldar, K. Horback [et al.] // *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. – 2013. – Vol. 35. – № 3. – P. 541.
323. Proangiogenic action of thyroid hormone is fibroblast growth factor-dependent and is initiated at the cell surface / F. B. Davis, S. A. Mousa, L. O'Connor [et al.] // *Circulation research*. – 2004. – Vol. 94. – № 11. – P. 1500-1506.

324. Probing cell type-specific functions of G_i in vivo identifies GPCR regulators of insulin secretion / J. B. Regard, H. Kataoka, D. A. Cano [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2007.
325. Progesterone Changes VEGF and BDNF Expression and Promotes Neurogenesis After Ischemic Stroke / C. Jiang, F. Zuo, Y. Wang [et al.] // *Molecular Neurobiology*. – 2017. – Vol. 54. – № 1. – P. 571-581.
326. Prognostic value of thyroid hormones in acute ischemic stroke – a meta analysis / X. Jiang, H. Xing, J. Wu [et al.] // *Scientific Reports* 2017 7:1. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-8.
327. Protective Effect of Aliskiren in Experimental Ischemic Stroke: Up-Regulated p-PI3K, p-AKT, Bcl-2 Expression, Attenuated Bax Expression / J. Miao, L. Wang, X. Zhang [et al.] // *Neurochemical Research* 2016 41:9. – 2016. – Vol. 41. – № 9. – P. 2300-2310.
328. Rajkovic O. Regenerative medicine therapies for targeting neuroinflammation after stroke / O. Rajkovic, G. Potjeywd, E. Pinteaux // *Frontiers in Neurology*. – 2018. – Vol. 9. – № SEP. – P. 734.
329. Rapid endothelial cytoskeletal reorganization enables early blood-brain barrier disruption and long-term ischaemic reperfusion brain injury / Y. Shi, L. Zhang, H. Pu [et al.] // *Nature Communications*. – 2016. – Vol. 7.
330. Rasooly D. Conducting a Reproducible Mendelian Randomization Analysis using the R analytic statistical environment / D. Rasooly, C. J. Patel // *Current protocols in human genetics*. – 2019. – Vol. 101. – № 1. – P. e82.
331. Reaching the End-Game for GWAS: Machine Learning Approaches for the Prioritization of Complex Disease Loci / H. L. Nicholls, C. R. John, D. S. Watson [et al.] // *Frontiers in Genetics*. – 2020. – Vol. 11.
332. Recent Insights into Neutrophil Extracellular Traps in Cardiovascular Diseases. / Y. Dong, Y. Zhang, X. Yang [et al.] // *Journal of clinical medicine*. – 2022. – Vol. 11. – № 22.
333. Regulation of cerebellar neuronal migration and neurite outgrowth by thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine / A. P. Farwell, S. A. Dubord-Tomasetti, A. Z.

- Pietrzykowski [et al.] // Brain research. Developmental brain research. – 2005. – Vol. 154. – № 1. – P. 121-135.
334. Regulator of calcineurin 1 (Rcan1) has a protective role in brain ischemia/reperfusion injury / M. Sobrado, B. G. Ramirez, F. Neria [et al.] // Journal of Neuroinflammation. – 2012. – Vol. 9.
335. Richmond R. C. Mendelian randomization: concepts and scope. Cold Spring Harb. / R. C. Richmond, G. D. Smith // Perspect. Med. – 2022. – Vol. 12. – № 1.
336. Robust Mendelian randomization in the presence of residual population stratification, batch effects and horizontal pleiotropy / C. Cinelli, N. LaPierre, B. L. Hill [et al.] // Nature Communications 2022 13:1. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 1-13.
337. Robust methods in Mendelian randomization via penalization of heterogeneous causal estimates / J. M. B. Rees, A. M. Wood, F. Dudbridge, S. Burgess // PLoS ONE. – 2019. – Vol. 14. – № 9.
338. Rojas-Carvajal M. Acute stress differentially affects grooming subtypes and ultrasonic vocalisations in the open-field and home-cage test in rats / M. Rojas-Carvajal, J. C. Brenes // Behavioural Processes. – 2020. – Vol. 176. – P. 104140.
339. Role of Neuropilin 1 in COVID-19 Patients with Acute Ischemic Stroke / A. W. Al-Thomali, H. M. Al-Kuraishy, A. I. Al-Gareeb [et al.] // Biomedicines. – 2022. – Vol. 10. – № 8.
340. Roy G. ApoB-100-containing Lipoproteins Are Major Carriers of 3-Iodothyronamine in Circulation / G. Roy, E. Placzek, T. S. Scanlan // The Journal of Biological Chemistry. – 2012. – Vol. 287. – № 3. – P. 1790.
341. Ruan J. Behavioral tests in rodent models of stroke / J. Ruan, Y. Yao // Brain hemorrhages. – 2020. – Vol. 1. – № 4. – P. 171.
342. Sanderson E. Testing and correcting for weak and pleiotropic instruments in two-sample multivariable Mendelian randomization / E. Sanderson, W. Spiller, J. Bowden // Statistics in Medicine. – 2021. – Vol. 40. – № 25. – P. 5434-5452.

343. Scanlan T. S. Endogenous 3-iodothyronamine (T1AM): More than we bargained for / T. S. Scanlan // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2011. – Vol. 96. – № 6. – P. 1674-1676.
344. Scanlan T. S. Endogenous 3-iodothyronamine (T1AM): More than we bargained for / T. S. Scanlan // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2011. – Vol. 96. – № 6. – P. 1674-1676.
345. Schroeder A. C. Thyroid hormones, T3 and T4, in the brain / A. C. Schroeder, M. L. Privalsky // *Frontiers in Endocrinology*. – 2014. – Vol. 5. – № MAR. – P. 40.
346. Schwartz H. L. Ontogenesis of 3,5,3'-Triiodothyronine Receptors in Neonatal Rat Brain: Dissociation between Receptor Concentration and Stimulation of Oxygen Consumption by 3,5,3'-Triiodothyronine / H. L. Schwartz, J. H. Oppenheimer // *Endocrinology*. – 1978. – Vol. 103. – № 3. – P. 943-948.
347. Selective Brain Hypothermia in Acute Ischemic Stroke: Reperfusion Without Reperfusion Injury / J. H. Choi, S. Poli, M. Chen [et al.] // *Frontiers in Neurology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1455.
348. Serum magnesium and calcium levels in relation to ischemic stroke / S. C. Larsson, M. Traylor, S. Burgess [et al.] // *Neurology*. – 2019. – Vol. 92. – № 9. – P. e944-e950.
349. Sims N. R. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke / N. R. Sims, H. Muyderman // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. – 2010. – Vol. 1802. – № 1. – P. 80-91.
350. Singh R. Hypothyroidism alters mitochondrial morphology and induces release of apoptogenic proteins during rat cerebellar development / R. Singh, G. Upadhyay, M. M. Godbole // *The Journal of endocrinology*. – 2003. – Vol. 176. – № 3. – P. 321-329.
351. Sirsat M. S. Machine Learning for Brain Stroke: A Review / M. S. Sirsat, E. Fermé, J. Câmara // *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. – 2020. – Vol. 29. – № 10. – P. 105162.

352. Some new prospects in the understanding of the molecular basis of the pathogenesis of stroke / S. A. Saeed, K. F. Shad, T. Saleem [et al.] // *Experimental Brain Research*. – 2007. – Vol. 182. – № 1. – P. 1.
353. Sparsity in optimal randomized classification trees / R. Blanquero, E. Carrizosa, C. Molero-Río, D. Romero Morales // *European Journal of Operational Research*. – 2020. – Vol. 284. – № 1. – P. 255-272.
354. Stimulation of astrocyte fatty acid oxidation by thyroid hormone is protective against ischemic stroke-induced damage / N. L. Sayre, M. Sifuentes, D. Holstein [et al.] // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2017. – Vol. 37. – № 2. – P. 514-527.
355. Stimulatory effects of thyroid hormone on brain angiogenesis in vivo and in vitro / L. Zhang, C. M. Cooper-Kuhn, U. Nannmark [et al.] // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2010. – Vol. 30. – № 2. – P. 323.
356. Straub I. R. Multi-OMICS study of a CHCHD10 variant causing ALS demonstrates metabolic rewiring and activation of endoplasmic reticulum and mitochondrial unfolded protein responses / I. R. Straub, W. Weraarpachai, E. A. Shoubridge // *Human molecular genetics*. – 2021. – Vol. 30. – № 8. – P. 687-705.
357. Su F. Enhancing Brain Plasticity to Promote Stroke Recovery / F. Su, W. Xu // *Frontiers in Neurology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 554089.
358. Subclinical thyroid dysfunction and autoantibodies in acute ischemic and hemorrhagic stroke patients: relation to long term stroke outcome / R. S. Nageeb, A. M. Azmy, H. F. Tantawy [et al.] // *Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*. – 2022. – Vol. 58. – № 1. – P. 1-7.
359. Symptoms and probabilistic anatomical mapping of lacunar infarcts / E. Barow, H. Pinnschmidt, F. Boutitie [et al.] // *Neurological Research and Practice* 2020 2:1. – 2020. – Vol. 2. – № 1. – P. 1-7.
360. Synaptic and Non-Synaptic Mitochondria in Hippocampus of Adult Rats Differ in Their Sensitivity to Hypothyroidism / E. Zhuravliova, T. Barbakadze, N. Jojua [et al.]

- al.] // Cellular and Molecular Neurobiology 2012 32:8. – 2012. – Vol. 32. – № 8. – P. 1311-1321.
361. Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (Dio2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4 / M. J. Schneider, S. N. Fiering, S. E. Pallud [et al.] // Molecular Endocrinology. – 2001. – Vol. 15. – № 12. – P. 2137-2148.
362. Targeting resolution of neuroinflammation after ischemic stroke with a lipoxin A4 analog: Protective mechanisms and long-term effects on neurological recovery / K. E. Hawkins, K. M. DeMars, J. C. Alexander [et al.] // Brain and Behavior. – 2017. – Vol. 7. – № 5.
363. Taylor P. M. Tissue uptake of thyroid hormone by amino acid transporters / P. M. Taylor, J. W. A. Ritchie // Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2007. – Vol. 21. – № 2. – P. 237-251.
364. The benefits and harms of intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator within 6 h of acute ischaemic stroke (the third international stroke trial [IST-3]): a randomised controlled trial / IST-3 collaborative group, P. Sandercock, J. M. Wardlaw [et al.] // The Lancet. – 2012. – Vol. 379. – № 9834. – P. 2352-2363.
365. The HDAC9-associated risk locus promotes coronary artery disease by governing TWIST1 / L. Ma, N. S. Bryce, A. W. Turner [et al.] // PLoS Genetics. – 2022. – Vol. 18. – № 6.
366. The Histone Deacetylase 9 Stroke-Risk Variant Promotes Apoptosis and Inflammation in a Human iPSC-Derived Smooth Muscle Cells Model / A. Granata, I. Kasioulis, F. Serrano [et al.] // Frontiers in Cardiovascular Medicine. – 2022. – Vol. 9. – P. 688.
367. The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a mendelian randomisation analysis / D. I. Swerdlow, M. V. Holmes, K. B. Kuchenbaecker [et al.] // Lancet (London, England). – 2012. – Vol. 379. – № 9822. – P. 1214-1224.

368. The interplay of thyroid hormones and the immune system – where we stand and why we need to know about it / C. Wenzek, A. Boelen, A. M. Westendorf [et al.] // *European Journal of Endocrinology*. – 2022. – Vol. 186. – № 5. – P. R65-R77.
369. The ischemic penumbra: From concept to reality / C. M. Ermine, A. Bivard, M. W. Parsons, Jean-Claude Baron // *International Journal of Stroke*. – 2021. – Vol. 16. – № 5. – P. 497-509.
370. The many weak instruments problem and Mendelian randomization / N. M. Davies, S. von Hinke Kessler Scholder, H. Farbmacher [et al.] // *Statistics in medicine*. – 2015. – Vol. 34. – № 3. – P. 454-468.
371. The MR-base platform supports systematic causal inference across the human phenome / G. Hemani, J. Zheng, B. Elsworth [et al.] // *eLife*. – 2018. – Vol. 7.
372. The MRC IEU OpenGWAS data infrastructure / B. Elsworth, M. Lyon, T. Alexander [et al.] // *bioRxiv*. – 2020. – P. 2020.08.10.244293.
373. The prognostic value of total T3 after acute cerebral infarction is age-dependent: a retrospective study on 768 patients / L. Q. Li, X. Y. Xu, W. Y. Li [et al.] // *BMC Neurology*. – 2019. – Vol. 19. – № 1.
374. The relationship between oxidative stress and acute ischemic stroke severity and functional outcome / W. M. Elsayed, E. H. A. Abdel-Gawad, D. I. A. Mesallam, T. S. El-Serafy // *Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*. – 2020. – Vol. 56. – № 1. – P. 1-6.
375. The Scandinavian Stroke Scale is equally as good as The National Institutes of Health Stroke Scale in identifying 3-month outcome / T. Askim, J. Bernhardt, L. Churilov, B. Indredavik // *Journal of rehabilitation medicine*. – 2016. – Vol. 48. – № 10. – P. 909-912.
376. The thyroid hormone triiodothyronine controls macrophage maturation and functions: Protective role during inflammation / C. Perrotta, M. Buldorini, E. Assi [et al.] // *American Journal of Pathology*. – 2014. – Vol. 184. – № 1. – P. 230-247.
377. The use of two-sample methods for Mendelian randomization analyses on single large datasets / C. Minelli, F. M. Del Greco, D. A. Van Der Plaat [et al.] // *International Journal of Epidemiology*. – 2021. – Vol. 50. – № 5. – P. 1651-1659.

378. Therapeutic effects of lipo-prostaglandin E1 on angiogenesis and neurogenesis after ischemic stroke in rats / L. Ling, S. Zhang, Z. Ji [et al.] // *The International journal of neuroscience*. – 2016. – Vol. 126. – № 5. – P. 469-477.
379. Thompson C. K. Thyroid Hormone Acts Locally to Increase Neurogenesis, Neuronal Differentiation, and Dendritic Arbor Elaboration in the Tadpole Visual System / C. K. Thompson, H. T. Cline // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. – 2016. – Vol. 36. – № 40. – P. 10356-10375.
380. Thromboinflammation in stroke brain damage / S. F. De Meyer, F. Denorme, F. Langhauser [et al.] // *Stroke*. – 2016. – Vol. 47. – № 4. – P. 1165-1172.
381. Thyroid Function Affects the Risk of Stroke via Atrial Fibrillation: A Mendelian Randomization Study / E. Marouli, A. Kus, F. Del Greco M [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2020. – Vol. 105. – № 8. – P. 2634-2641.
382. Thyroid Function and Dysfunction in Relation to 16 Cardiovascular Diseases: A Mendelian Randomization Study / S. C. Larsson, E. Allara, A. M. Mason [et al.] // *Circulation: Genomic and Precision Medicine*. – 2019. – Vol. 12. – № 3. – P. E002468.
383. Thyroid function tests and early outcomes of acute ischemic stroke in older euthyroid patients / P. Forti, F. Maioli, M. Coveri [et al.] // *Experimental Gerontology*. – 2015. – Vol. 61. – P. 8-14.
384. Thyroid hormone-dependent development of the GABAergic pre- and post-synaptic components in the rat hippocampus / E. Sawano, M. Takahashi, T. Negishi, T. Tashiro // *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. – 2013. – Vol. 31. – № 8. – P. 751-761.
385. Thyroid hormone-induced haemoglobin changes and antioxidant enzymes response in erythrocytes. / A. S. R. Araujo, F. E. R. Seibel, U. O. Oliveira [et al.] // *Cell biochemistry and function*. – 2011. – Vol. 29. – № 5. – P. 408-413.

386. Thyroid hormone-regulated brain mitochondrial genes revealed by differential cDNA cloning / E. Vega-Núñez, A. Menéndez-Hurtado, R. Garesse [et al.] // *The Journal of clinical investigation*. – 1995. – Vol. 96. – № 2. – P. 893-899.
387. Thyroid hormone increases astrocytic glutamate uptake and protects astrocytes and neurons against glutamate toxicity / C. B. N. Mendes-de-Aguiar, R. Alchini, H. Decker [et al.] // *Journal of Neuroscience Research*. – 2008. – Vol. 86. – № 14. – P. 3117-3125.
388. Thyroid hormone induces sprouting angiogenesis in adult heart of hypothyroid mice through the PDGF-Akt pathway / J. Chen, S. B. Ortmeier, O. V. Savinova [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2012. – Vol. 16. – № 11. – P. 2726.
389. Thyroid hormone regulation of neural stem cell fate: From development to ageing / J. D. Gothié, P. Vancamp, B. Demeneix, S. Remaud // *Acta Physiologica*. – 2020. – Vol. 228. – № 1. – P. e13316.
390. Thyroid hormone treatment activates protective pathways in both in vivo and in vitro models of neuronal injury / J. Li, I. Donangelo, K. Abe [et al.] // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2017. – Vol. 452. – P. 120-130.
391. Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation / A. Mancini, C. Di Segni, S. Raimondo [et al.] // *Mediators of Inflammation*. – 2016. – Vol. 2016.
392. Thyroid hormones and functional outcomes after ischemic stroke / L. M. O’Keefe, S. E. Conway, A. Czap [et al.] // *Thyroid Research*. – 2015. – Vol. 8. – № 1. – P. 9.
393. Thyroid hormones as modulators of immune activities at the cellular level / P. De Vito, S. Incerpi, J. Z. Pedersen [et al.] // *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*. – 2011. – Vol. 21. – № 8. – P. 879-890.
394. Thyroid hormones decrease the proinflammatory TLR4/NF- κ B pathway and improve functional parameters of the left ventricle of infarcted rats / A. L. de Castro, R. O. Fernandes, V. D. Ortiz [et al.] // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2018. – Vol. 461. – P. 132-142.

395. Thyroid hormones in the brain and their impact in recovery mechanisms after stroke / D. Talhada, C. R. A. Santos, I. Gonçalves, K. Ruscher // *Frontiers in Neurology*. – 2019. – Vol. 10. – № OCT. – P. 1103.
396. Thyroid Hormones Interaction With Immune Response, Inflammation and Non-thyroidal Illness Syndrome / R. De Luca, P. J. Davis, H. Y. Lin [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Vol. 8. – P. 1775.
397. Thyroid State Regulates Gene Expression in Human Whole Blood / E. T. Massolt, M. E. Meima, S. M. A. Swagemakers [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2018. – Vol. 103. – № 1. – P. 169-178.
398. Thyronamines - Past, present, and future / S. Piehl, C. S. Hoefig, T. S. Scanlan, J. Köhrle // *Endocrine Reviews*. – 2011. – Vol. 32. – № 1. – P. 64-80.
399. Thyronamines and Analogues - The Route from Rediscovery to Translational Research on Thyronergic Amines / G. Chiellini, L. Bellusci, M. Sabatini, R. Zucchi // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2017. – Vol. 458. – P. 149-155.
400. Thyronamines inhibit plasma membrane and vesicular monoamine transport / A. N. Snead, M. S. Santos, R. P. Seal [et al.] // *ACS Chemical Biology*. – 2007. – Vol. 2. – № 6. – P. 390-398.
401. Time-Based Decision Making for Reperfusion in Acute Ischemic Stroke / M. Grøan, J. Ospel, S. Ajmi [et al.] // *Frontiers in Neurology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 1831.
402. Tin A. Mendelian Randomization Analysis as a Tool to Gain Insights into Causes of Diseases: A Primer / A. Tin, A. Kottgen // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2021. – Vol. 32. – № 10. – P. 2400-2407.
403. Tin A. Mendelian Randomization Analysis as a Tool to Gain Insights into Causes of Diseases: A Primer / A. Tin, A. Kottgen // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2021. – Vol. 32. – № 10. – P. 2400-2407.
404. Tissue distribution and cardiac metabolism of 3-iodothyronamine / A. Saba, G. Chiellini, S. Frascarelli [et al.] // *Endocrinology*. – 2010. – Vol. 151. – № 10. – P. 5063-5073.

405. Tmem74 promotes tumor cell survival by inducing autophagy via interactions with atg16l1 and atg9a / Y. Sun, Y. Chen, J. Zhang [et al.] // *Cell Death and Disease*. – 2017. – Vol. 8. – № 8. – P. e3031-e3031.
406. TMTC1 and TMTC2 Are Novel Endoplasmic Reticulum Tetratricopeptide Repeat-containing Adapter Proteins Involved in Calcium Homeostasis / J. C. Sunryd, B. Cheon, J. B. Graham [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289. – № 23. – P. 16085-16099.
407. Transarterial regional hypothermia provides robust neuroprotection in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion with transient collateral hypoperfusion / K. Kurisu, T. Abumiya, M. Ito [et al.] // *Brain Research*. – 2016. – Vol. 1651. – P. 95-103.
408. Transcriptome analysis of gene expression provides new insights into the effect of mild therapeutic hypothermia on primary human cortical astrocytes cultured under hypoxia / M. M. Salman, P. Kitchen, M. N. Woodroffe [et al.] // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2017. – Vol. 11. – P. 386.
409. Translating concepts of neural repair after stroke: Structural and functional targets for recovery / R. W. Regenhardt, H. Takase, E. H. Lo, D. J. Lin // *Restorative neurology and neuroscience*. – 2020. – Vol. 38. – № 1. – P. 67.
410. Triiodothyronine modulates neuronal plasticity mechanisms to enhance functional outcome after stroke / D. Talhada, J. Feiteiro, A. R. Costa [et al.] // *Acta Neuropathologica Communications*. – 2019. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-18.
411. TRPV4 Activation Contributes Functional Recovery from Ischemic Stroke via Angiogenesis and Neurogenesis / C. K. Chen, P. Y. Hsu, T. M. Wang [et al.] // *Molecular neurobiology*. – 2018. – Vol. 55. – № 5. – P. 4127-4135.
412. TR α Protects Against Atherosclerosis in Male Mice: Identification of a Novel Anti-Inflammatory Property for TR α in Mice / C. Billon, L. Canaple, S. Fleury [et al.] // *Endocrinology*. – 2014. – Vol. 155. – № 7. – P. 2735-2745.
413. Two-sample Mendelian randomization: avoiding the downsides of a powerful, widely applicable but potentially fallible technique / F. P. Hartwig, N. M. Davies,

- G. Hemani, G. D. Smith // *International Journal of Epidemiology*. – 2016. – Vol. 45. – № 6. – P. 1717.
414. Two Thyroid Stimulating Hormone assays correlated in clinical practice show disagreement in subclinical hypothyroidism patients / V. A. da Silva, R. J. de Almeida, M. P. Cavalcante [et al.] // *Clinical Biochemistry*. – 2018. – Vol. 53. – P. 13-18.
415. Type 2 deiodinase polymorphism causes ER stress and hypothyroidism in the brain / S. Jo, T. L. Fonseca, B. M. L. C. Bocco [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2019. – Vol. 129. – № 1. – P. 230-245.
416. Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis / A. Hernandez, M. E. Martinez, S. Fiering [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2006. – Vol. 116. – № 2. – P. 476-484.
417. Ulgen E. PathfindR: An R package for comprehensive identification of enriched pathways in omics data through active subnetworks / E. Ulgen, O. Ozisik, O. U. Sezerman // *Frontiers in Genetics*. – 2019. – Vol. 10. – № SEP. – P. 858.
418. Venditti P. Thyroid hormone-induced oxidative stress / P. Venditti, S. Di Meo // *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 2006 63:4. – 2006. – Vol. 63. – № 4. – P. 414-434.
419. Villanueva I. The Role of Thyroid Hormones as Inductors of Oxidative Stress and Neurodegeneration / I. Villanueva, C. Alva-Sánchez, J. Pacheco-Rosado // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2013. – Vol. 2013.
420. Visual discrimination impairment after experimental stroke is associated with disturbances in the polarization of the astrocytic aquaporin-4 and increased accumulation of neurotoxic proteins / S. Sanchez-Bezanilla, C. TeBay, M. Nilsson [et al.] // *Experimental neurology*. – 2019. – Vol. 318. – P. 232-243.
421. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT) / E. A. Klein, I. M. Thompson, C. M. Tangen [et al.] // *JAMA*. – 2011. – Vol. 306. – № 14. – P. 1549-1556.

422. Vries E. M. de. The molecular basis of the non-thyroidal illness syndrome / E. M. de Vries, E. Fliers, A. Boelen // *Journal of Endocrinology*. – 2015. – Vol. 225. – № 3. – P. R67--R81.
423. Wajner S. M. New insights toward the acute non-thyroidal illness syndrome / S. M. Wajner, A. L. Maia // *Frontiers in Endocrinology*. – 2012. – Vol. 3. – № JAN. – P. 1-7.
424. Wang W. J. Research Progress on PATJ and Underlying Mechanisms Associated with Functional Outcomes After Stroke / W. J. Wang, T. J. Lyu, Z. Li // *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. – 2021. – Vol. 17. – P. 2811.
425. Warner A. Thyroid hormone and the central control of homeostasis / A. Warner, J. Mittag // *Journal of Molecular Endocrinology*. – 2012. – Vol. 49. – № 1. – P. R29-R35.
426. Wassner A. J. Congenital hypothyroidism: recent advances / A. J. Wassner, R. S. Brown // *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. – 2015. – Vol. 22. – № 5. – P. 407-412.
427. Within-sibship genome-wide association analyses decrease bias in estimates of direct genetic effects. / L. J. Howe, M. G. Nivard, T. T. Morris [et al.] // *Nature genetics*. – 2022. – Vol. 54. – № 5. – P. 581-592.
428. Wnt Signaling Pathways: A Role in Pain Processing / Y. Tang, Y. Chen, R. Liu [et al.] // *Neuromolecular Medicine*. – 2022. – Vol. 24. – № 3. – P. 233.
429. World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022 / V. L. Feigin, M. Brainin, B. Norrving [et al.] // *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*. – 2022. – Vol. 17. – № 1. – P. 18-29.
430. Wrutniak-Cabello C. Thyroid hormone action in mitochondria / C. Wrutniak-Cabello, F. Casas, G. Cabello // *Journal of Molecular Endocrinology*. – 2001. – Vol. 26. – № 1. – P. 67-77.
431. Wu X. Integrins as receptor targets for neurological disorders / X. Wu, D. S. Reddy // *Pharmacology and Therapeutics*. – 2012. – Vol. 134. – № 1. – P. 68-81.

432. Wulf M. A. The biological function of the cellular prion protein: an update / M. A. Wulf, A. Senatore, A. Aguzzi // *BMC Biology* 2017 15:1. – 2017. – Vol. 15. – № 1. – P. 1-13.
433. Xie F. Adult Neurogenesis Following Ischemic Stroke and Implications for Cell-Based Therapeutic Approaches / F. Xie, H. Liu, Y. Liu // *World Neurosurgery*. – 2020. – Vol. 138. – P. 474-480.
434. Xu X. Y. Alteration of Thyroid-Related Hormones within Normal Ranges and Early Functional Outcomes in Patients with Acute Ischemic Stroke / X. Y. Xu, W. Y. Li, X. Y. Hu // *International Journal of Endocrinology*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1-5.
435. Yang Z. Credible Mendelian Randomization Studies in the Presence of Selection Bias Using Control Exposures / Z. Yang, C. M. Schooling, M. K. Kwok // *Frontiers in Genetics*. – 2021. – Vol. 12. – P. 2318.
436. YAP/TAZ incorporation in the β -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response / L. Azzolin, T. Panciera, S. Soligo [et al.] // *Cell*. – 2014. – Vol. 158. – № 1. – P. 157-170.
437. Yavorska O. O. MendelianRandomization: an R package for performing Mendelian randomization analyses using summarized data / O. O. Yavorska, S. Burgess // *International journal of epidemiology*. – 2017. – Vol. 46. – № 6. – P. 1734-1739.
438. Yee T. W. The VGAM Package for Categorical Data Analysis / T. W. Yee // *Journal of Statistical Software*. – 2010. – Vol. 32. – № 10. – P. 1-34.
439. Yonkers M. A. Sensory neuron sodium current requires nongenomic actions of thyroid hormone during development / M. A. Yonkers, A. B. Ribera // *Journal of Neurophysiology*. – 2008. – Vol. 100. – № 5. – P. 2719-2725.
440. You J. S. Therapeutic hypothermia for stroke: Unique challenges at the bedside / J. S. You, J. Y. Kim, M. A. Yenari // *Frontiers in Neurology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 2221.

441. Zekri Y. An Atlas of Thyroid Hormone Receptors' Target Genes in Mouse Tissues / Y. Zekri, R. Guyot, F. Flamant // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 19. – P. 11444.
442. Zhang Y. Clinical analysis on alteration of thyroid hormones in the serum of patients with acute ischemic stroke / Y. Zhang, M. A. Meyer // *Stroke research and treatment*. – 2010. – Vol. 2010.
443. Zhou H. Thyroid Hormone Metabolite 3-Iodothyronamine (T1AM) Alleviates Hypoxia/Reoxygenation-Induced Cardiac Myocyte Apoptosis via Akt/FoxO1 Pathway / H. Zhou, B. Hu, X. Liu // *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. – 2020. – Vol. 26. – P. e923195-1.
444. Zucchi R. Update on 3-iodothyronamine and its neurological and metabolic actions / R. Zucchi, A. Accorroni, G. Chiellini // *Frontiers in Physiology*. – 2014. – Vol. 5. – № OCT. – P. 1-12.
445. Genetic risk factors for ischaemic stroke and its subtypes (the METASTROKE collaboration): a meta-analysis of genome-wide association studies / M. Traylor, M. Farrall, E. G. Holliday [et al.] // *Lancet Neurol*. – 2012. – Vol. 11. – № 11. – P. 951-962.

ПРИЛОЖЕНИЕ
**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ДОНЕЦКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ**
ДОРОЖНАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ БОЛЬНИЦА СТАНЦИИ ДОНЕЦК
(МЗ ДНР ДКБ ст. Донецк)

 ул. Университетская, 60 г. Донецк, 83114 Тел. (062)319-31-62
 E-mail: st.donetsk@zdravdnr.ru Идентификационный код 51005724

24.11.22 № 373

На _____ от _____

Справка

о внедрении результатов диссертационной работы

Филимонова Дмитрия Алексеевича на тему:

«Влияние тиреоидного гомеостаза на течение и исход острой цереброваскулярной патологии: клинко-экспериментальное исследование и анализ генетических корреляций», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.11 – Нервные болезни

Предложенный способ диагностики и коррекции нарушений тиреоидного статуса у пациентов с острым ишемическим инсультом позволяет разработать индивидуализированную программу аддитивной терапии, направленную на улучшение функциональных исходов инсульта. При сравнительном анализе с ретроспективной контрольной группой применение предложенного метода ассоциировано с увеличением пропорции пациентов с функциональным исходом в диапазоне 0-3 балла по модифицированной шкале Рэнкина на 18%.

Источник информации: статьи: 1. Филимонов Д.А. Влияние тиреоидных гормонов на функциональный исход ишемического инсульта в многофакторной прогностической модели [Текст] / Д.А. Филимонов, С.К. Евтушенко, И.С. Луцкий, А.А. Федорова, Н.Н. Трубникова, М.А. Белоцерковская // Вестник неотложной и восстановительной хирургии. – 2022 – Т. 7. – №7. – С. 123-137; 2. Filimonov D. Impact of baseline free serum triiodothyronine on stroke severity and outcome in patients with atherothrombotic ischemic stroke [Текст] / D. Filimonov, A. Yeresko, A. Fedorova, V. Marusichenko, M. Belotserkovskaya, N. Trubnikova// International Neurological Journal. – 2020. – Vol. 16. – № 2. – P. 28-35; 3. Филимонов Д.А. Взаимосвязь генетически прогнозируемого уровня селена и риска неблагоприятного исхода ишемического инсульта / Д. А. Филимонов, С. К. Евтушенко, И. С. Луцкий, Н.Н. Трубникова, А.А. Федорова, М.А. Белоцерковская // Университетская клиника. – 2022. – № 2(43). – С. 44-52.

Сроки внедрения: сентябрь 2021 г.

 Главный врач Дорожной
клинической больницы ст. Донецк
к.мед.н.

 Заведующая неврологическим
отделением


А.Б. Чуков

Л.В. Лютикова



**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ЦЕНТРАЛЬНАЯ ГОРОДСКАЯ БОЛЬНИЦА №17 Г. ДОНЕЦКА»
(ГБУ «ЦГБ №17 Г. ДОНЕЦКА»)**

Пр. Панфилова, дом 87, г. Донецк, 83087, ДНР тел. (062) 253-53-01
e-mail: doncgb17@mail.ru, cgb17buh@yandex.ru ИКЮЛ 51004537

24.11.2025 № 1074/01-24

На _____ от _____

СПРАВКА

**о внедрении результатов диссертационной работы
Филимонова Дмитрия Алексеевича на тему:
«Влияние тиреоидного гомеостаза на течение и исход острой цереброваскулярной
патологии: клинико-экспериментальное исследование
и анализ генетических корреляций»,
представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук
по специальности 14.01.11 – Нервные болезни**

Внедренные результаты диссертационного исследования относятся к прецизионной медицине и представляют собой способ выявления и коррекции новых метаболических факторов, влияющих на тяжесть и функциональный исход острых нарушений мозгового кровообращения по ишемическому типу. Метод основан на использовании данных тиреоидного профиля для прогнозирования функциональных исходов ишемического инсульта и разработки индивидуализированной программы терапии в острый период инсульта и его вторичной профилактики. Внедренный метод используется при оказании лечебно-профилактической помощи населению и позволяет улучшить качество оказания медицинской помощи пациентам с острыми нарушениями мозгового кровообращения.

Источник информации: статьи: 1. Филимонов Д.А. Влияние тиреоидных гормонов на функциональный исход ишемического инсульта в многофакторной прогностической модели [Текст] / Д.А. Филимонов, С.К. Евтушенко, И.С. Луцкий, А.А. Федорова, Н.Н. Трубникова, М.А. Белоцерковская // Вестник неотложной и восстановительной хирургии. – 2022 – Т. 7. – №7. – С. 123-137; 2. Филимонов Д.А. Взаимосвязь генетически прогнозируемого уровня селена и риска неблагоприятного исхода ишемического инсульта / Д. А. Филимонов, С. К. Евтушенко, И. С. Луцкий, Н.Н. Трубникова, А.А. Федорова, М.А. Белоцерковская // Университетская клиника. – 2022. – № 2(43). – С. 44-52; 3. Filimonov D. Low Free Serum Triiodothyronine is Associated with More Severe Neurological Deficit in Patients with First-Time Ischemic Stroke: A Single-Center Clinical Study [Текст] / D. Filimonov, S. Yevtushenko, A. Yeresko, A. Fedorova, M. Belotserkovskaya and N. Trubnikova // Archives in Neurology & Neuroscience [Электронный ресурс] Published: March 05, 2020 DOI: 10.33552/ANN.2020.07.000661 URL: <https://irispublishers.com/ann/pdf/ANN.MS.ID.000661.pdf>

Сроки внедрения: октябрь 2021 г. – октябрь 2022 г.

Главный врач центральной городской
больницы №17

Заведующая неврологическим
отделением



Е.Ф. Ильина

Н.Н. Сокурова



«ЦЕНТРАЛЬНАЯ ГОРОДСКАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ БОЛЬНИЦА №6 Г. ДОНЕЦКА»
ул. Клиническая, 11, г. Донецк, 283062, тел. (062) 316-15-74, E-mail: CGKB6@yandex.ru

30.11.22 № 2499/01-14

На _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный врач городской
клинической больницы №6 г. Донецка
Атаманов В.М.
«30» _____ 2022 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов диссертационного исследования

Филимонова Дмитрия Алексеевича

на тему «Влияние тиреоидного гомеостаза на течение и исход острой цереброваскулярной патологии: клиничко-экспериментальное исследование и анализ генетических корреляций», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.11 – Нервные болезни

1. Предложения для внедрения: метод раннего прогнозирования тяжелого течения и неблагоприятного функционального исхода ишемического инсульта.

Учреждение разработчик: Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака (ДНР, 283045, Донецк, пр. Ленинский, 47).

2. Источник информации: статьи: Филимонов Д.А. Влияние тиреоидных гормонов на функциональный исход ишемического инсульта в многофакторной прогностической модели [Текст] / Д.А. Филимонов, С.К. Евтушенко, И.С. Луцкий, А.А. Федорова, Н.Н. Трубникова, М.А. Белоцерковская // Вестник неотложной и восстановительной хирургии. – 2022 – Т. 7. – №7. – С. 123-137; Филимонов Д.А. Тиреоидная дисфункция как новый фактор, влияющий на тяжесть и исход острого ишемического инсульта [Текст] / Д.А. Филимонов, С.К.Евтушенко, Н.Н. Трубникова, М.А. Белоцерковская, Т.Ю. Сауткина, В.В. Свиляр // Вестник неотложной и восстановительной хирургии. – 2017. – Т. 2. – № 2-3. – С. 313-320; Filimonov D. Impact of baseline free serum triiodothyronine on stroke severity and outcome in patients with atherothrombotic ischemic stroke [Текст] / D. Filimonov, A. Yeresko, A. Fedorova, V. Marusichenko, M. Belotserkovskaya, N. Trubnikova // International Neurological Journal. – 2020. – Vol. 16. – № 2. – P. 28-35.

3. Базовое учреждение, которое проводит внедрение: Центральная городская клиническая больница №6 г. Донецка (ул. Клиническая, 11, г. Донецк, 2830624).

4. Сроки внедрения: январь 2021 – октябрь 2022

5. Форма внедрения: материалы используются при оказании лечебно-профилактической помощи населению.

6. Эффективность внедрения: использование алгоритма раннего прогнозирования тяжелого течения и неблагоприятного функционального исхода ишемического инсульта позволило идентифицировать пациентов с острым ишемическим инсультом, нуждающихся в длительной интенсивной терапии, персонализировать подходы к терапии в острый период, а также программу реабилитации и вторичной профилактики, что способствовало улучшению качества оказания медицинской помощи пациентам с острыми нарушениями мозгового кровообращения.

Заведующий неврологическим
отделением

В.А. Охмуш

Государственная образовательная организация
 высшего профессионального образования
 «Донецкий национальный медицинский
 университет им. М. Горького» Министерства
 здравоохранения Донецкой Народной
 Республики
 283003, г. Донецк, пр. Ильича, 16 Тел.
 +380 (62) 344-40-01

«УТВЕРЖДАЮ»
 Проректор по учебной работе
 ГОО ВПО ДОННМУ
 им. М. Горького
 к.мед.н., доц. Басий Р.В



АКТ

о внедрении результатов научно-исследовательской работы в учебный процесс

Название научно-исследовательской работы: «Влияние тиреоидного гомеостаза на течение и исход острой цереброваскулярной патологии: клиничко-экспериментальное исследование и анализ генетических корреляций».

Автор исследования: Филимонов Дмитрий Алексеевич, заведующий отделом экспериментальной хирургии Института неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака

Материалы для внедрения: влияние новых молекулярно-метаболических факторов, ассоциированных с тиреоидной системой, на характер течения и исход цереброваскулярных заболеваний. Поиск новых молекулярных мишеней и сигнальных путей для коррекции факторов риска развития и неблагоприятного течения неврологических заболеваний с использованием аналитических генетических методов (MR, cis-MR, SMR).

Форма внедрения: Использование материалов в процессе обучения студентов и ординаторов. Составление учебно-методических материалов, подготовка лекций и семинарских занятий.

Наименование учреждения, в котором внедрены материалы научно-исследовательской работы: кафедра детской и общей неврологии ФИПО ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького».

Зав. кафедрой
 кафедрой детской и общей
 неврологии ФИПО,
 д. мед. н.

И.С. Луцкий

Государственная образовательная организация
 высшего профессионального образования
 «Донецкий национальный
 медицинский университет
 им. М. Горького»
 Министерства
 здравоохранения
 Донецкой Народной Республики
 283003, г. Донецк, пр. Ильича, 16
 Тел. +380 (62) 344-40-01
 e-mail: contact@dnmu.ru



АКТ

о внедрении результатов научно-исследовательской работы в учебный процесс

Название научно-исследовательской работы: «Влияние тиреоидного гомеостаза на течение и исход острой цереброваскулярной патологии: клиничко-экспериментальное исследование и анализ генетических корреляций».

Автор исследования: Филимонов Дмитрий Алексеевич, заведующий отделом экспериментальной хирургии Института неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака

Материалы для внедрения: Роль тиреоидной системы в формировании ишемического повреждения при инсульте, влияние тиреоидных гормонов на тяжесть и исход острых нарушений мозгового кровообращения. Молекулярно-генетические механизмы нейропротекторных эффектов трийодтиронина и тиронамина. Использование менделевской рандомизации для идентификации молекулярно-метаболических факторов, влияющих на риск развития и исход цереброваскулярной патологии. Экспериментальное моделирование острой полушарной ишемии.

Форма внедрения: Использование материалов в процессе обучения студентов и ординаторов. Составление учебно-методических материалов, подготовка лекций и семинарских занятий.

Наименование учреждения, в котором внедрены материалы научно-исследовательской работы: Кафедра неврологии и медицинской генетики ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького».

Зав. кафедрой
 неврологии и медицинской генетики,
 д.мед.н., профессор

Стагинова Е.А.