

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ДОНЕЦКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «ДОНЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М. ГОРЬКОГО»

На правах рукописи

ФИЛИМОНОВ ДМИТРИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ

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

14.01.11 – Нервные болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Донецк – 2022

Работа выполнена в Институте неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака Министерства здравоохранения Донецкой Народной Республики

- Научный консультант: **Евтушенко Станислав Константинович**, доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки и техники, профессор кафедры детской и общей неврологии факультета интернатуры и последипломного образования ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО
- Официальные оппоненты: **Скоромец Александр Анисимович**, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой неврологии ФГБОУ «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург
Яхно Николай Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Заслуженный деятель науки РФ, заведующий научно-исследовательским отделом неврологии Научно-исследовательского центра, профессор кафедры нервных болезней и нейрохирургии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский Государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва
Ефремов Валерий Вильямович, доктор медицинских наук, профессор кафедры нервных болезней и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону
- Ведущая организация: Государственное учреждение Луганской Народной Республики «Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки»

Защита состоится « » 2023 года в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 01.026.06 при ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького» по адресу: 283003, г. Донецк, пр. Ильича, 16, морфологический корпус, электронный зал библиотеки на базе ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького». Тел./факс: (062) 277-14-54, e-mail: spec-sovet-01-026-06@dnmu.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького» по адресу: 283003, г. Донецк, пр. Ильича, 16 (<http://dnmu.ru/>).

Автореферат разослан « » 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Д 01.026.06

Коценко Ю. И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Цереброваскулярные заболевания занимают лидирующие позиции в структуре общей смертности и глубокой инвалидизации населения в большинстве стран (Campbell B.C.V. et al., 2019). Согласно опубликованным эпидемиологическим исследованиям, каждый четвертый человек в мире старше 25 лет перенес или перенесет инсульт (Feigin V.L., 2018). Инсульт является причиной 6,5 миллионов смертей в год, а к 2030 году приведет к ежегодной преждевременной потере более 200 миллионов лет полноценной жизни (Neuhaus A.A. et al., 2017). В Российской Федерации отмечается снижение заболеваемости инсультом с 2008 по 2016 г. на 45 %, однако, суммарный экономический ущерб от болезней системы кровообращения по-прежнему высок и составляет около 1 трлн. руб. в год (Скворцова В.И., 2018).

Золотым стандартом лечения ишемического инсульта является системный тромболизис. Результаты большого числа рандомизированных клинических исследований и их мета-анализов демонстрируют эффективность системного тромболизиса, проведенного в течение первых 3-х часов от развития симптомов ишемического инсульта при приемлемых рисках геморрагических осложнений (Bhaskar et al., 2018). 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-ти часов демонстрируют обнадеживающие результаты (Kalaria et al., 2016). Тем не менее, до сих пор недостаточно систематических данных для рекомендаций по расширению терапевтического «окна», основываясь на нейровизуализационных технологиях (Simonsen et al., 2021). Механическая тромбэктомия позволяет преодолеть временные ограничения системного тромболизиса и добиться успешной реперфузии в пределах 6-24 часов от развития ишемического инсульта. Однако сравнительные исследования, такие как DIFFUSE-MT и SKIP, изучавшие влияние тромбэктомии без системного тромболизиса на долгосрочные исходы инсульта по сравнению с комбинированным подходом демонстрируют противоречивые результаты (Vidale et al., 2020).

В целом, применение реперфузионных технологий по-прежнему сопряжено с техническими, организационными сложностями и рядом противопоказаний (Vanacker et al., 2016). В этой связи использование нейропротекции для улучшения исходов ишемического инсульта вызывает интерес. 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.

При анализе основных векторов развития фармакологической нейропротекции в течение последних 15 лет отмечается смещение акцента в сторону различных эндогенных субстанций и их синтетических аналогов (Hermann D.M., 2008; Neuhaus A.A., 2017; Vylicky et al., 2018; Яхно Н.Н., 2018). Головной мозг является особо чувствительным к ишемии органом, и многочисленные эндогенные противоишемические механизмы сформировались в ходе филогенеза. Несмотря на то, что большинство данных механизмов активируются при инсульте естественным путем, их активность возможно потенцировать искусственно (Sakakima H., 2019).

Степень разработанности темы исследования

В течение последних десятилетий особое внимание уделяется нейропротекторным свойствам эндогенных молекул, таких как VEGF, эритропоэтин, мозговой нейротрофический фактор и др. (Hayashi H, Takagi N., 2015; Noll et al., 2019). Известно, что особое значение в регуляции интенсивности метаболических процессов в большинстве органов и тканей, в том числе и в ЦНС, имеет система тиреоидного гомеостаза.

Тиреоидный гомеостаз – это сложная нейроэндокринная и нейроэпигенетическая 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 (Di Liegro I., 2008; Laurino A., Raimondi L., 2022). Высокоселективное воздействие на компоненты данной системы в различные фазы острой ишемии головного мозга представляется эффективным инструментом для осуществления нейропротекции, стимуляции нейропластичности и нейрореинтеграции, а также для улучшения функциональных исходов инсульта (Hoefig et al., 2016; Talhada D., 2019). Трийодтиронин 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 (Lin et al., 2011; Talhada, Santos, et al., 2019). 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 pH (Mancini et al., 2016).

Контраверсии результатов фундаментальных работ нашли свое отражение в клинических исследованиях, в которых при изучении влияния тиреоидного профиля на тяжесть и исход ишемического инсульта получены противоречивые данные. В 2017 г. были опубликованы результаты сразу двух мета-анализов, включавших 3936 и 5218 пациентов (Dhital et al., 2017; Jiang et al., 2017). Оба исследования демонстрируют ассоциацию между низким уровнем св. Т3 и неблагоприятным функциональным исходом ишемического инсульта, однако, не проясняют характер влияния гипер- или гипотиреоза, а также высоких уровней св. Т3 на течение и исход инсульта. В литературе практически отсутствуют данные о влиянии тиреоидного статуса на тяжесть неврологического дефицита в острую фазу инсульта. Не идентифицированы механизмы реализации воздействия тиреоидных гормонов на тяжесть и функциональный исход инсульта. Не изучена роль метаболитов тиреоидных гормонов в воздействии на тяжесть и исход острой очаговой ишемии головного мозга.

Цель исследования

Определить характер влияния тиреоидных гормонов, клеточных сигнальных систем, генетических механизмов, формирующих тиреоидный гомеостаз, на тяжесть неврологического дефицита в острый период цереброваскулярной патологии, ее функциональный исход, а также идентифицировать молекулярные мишени,

ассоциированные с тиреоидной системой, 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 клиничко-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 клиничко-неврологических показателей и лабораторных маркеров, отражающих тиреоидный статус.

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

4. 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.

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

6. Разработать рекомендации по коррекции нарушений тиреоидного статуса у пациентов с острым ишемическим инсультом.

Объект исследования: пациенты с острым гетерогенным ишемическим инсультом, лабораторные животные с моделированным ишемическим инсультом, инструментальные переменные (генетические вариации), ассоциированные с тиреоидной системой, риском и функциональным исходом нарушений мозгового кровообращения, промежуточными фенотипами.

Предмет исследования: влияние тиреоидных гормонов на тяжесть течения и функциональный исход острой цереброваскулярной патологии, механизмы реализации данного влияния с акцентом на нейропротекторные свойства тиреоидных гормонов.

Научная новизна работы

Научная новизна диссертационной работы заключается в комплексном клиничко-лабораторном, экспериментальном и мета-аналитическом исследовании влияния факторов, ассоциированных с системой тиреоидного гомеостаза, на тяжесть и исход цереброваскулярной патологии, а также в обосновании возможности

применения тиреоидных гормонов и их синтетических аналогов для улучшения функциональных исходов ишемического инсульта.

В ходе клинического исследования впервые продемонстрировано независимое влияние уровня свободного трийодтиронина на тяжесть неврологического дефицита в остром периоде ишемического инсульта. Впервые установлено, что высокие уровни свободного трийодтиронина ассоциированы с менее тяжелым течением и более благоприятным функциональным исходом ишемического инсульта.

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

Впервые установлено, что введение тиронамина Т0АМ в условиях острой церебральной ишемии приводит к нормализации поведенческих показателей, отвечающих за уровень тревожности у лабораторных животных, улучшению показателей рабочей памяти и обучаемости, уменьшению неврологического дефицита, что отражает влияние процессов, активируемых ТААР-рецепторами, на механизмы постишемического восстановления.

Впервые установлено, что активация ТААР-рецепторов приводит к различным биологическим эффектам в разные стадии острой церебральной ишемии. В острейший период (первые сутки) введение лиганда ТААР-рецепторов (тиронамина Т0АМ) сопровождается седативным действием, а к концу седьмых суток ассоциируется с более выраженным восстановлением неврологических функций и активацией когнитивных способностей.

В ходе проведенного менделевского рандомизационного исследования впервые установлено причинно-следственное влияние уровня свободного трийодтиронина на функциональный исход ишемического инсульта. Идентифицирован ряд механизмов влияния гипотиреоза на функциональный исход инсульта, включая повышение уровней апоптоз-индуцирующего митохондриального фактора-1 и апоптогенных белков семейства BCL-2. 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 проведен анализ влияния уровня селена, как фактора, регулирующего активность дейодиназ, на функциональный исход острого 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

Результаты работы позволяют расширить представления о нейротропных эффектах тиреоидных гормонов и их метаболитов в условиях острой ишемии головного мозга, а также обосновать возможность применения тиреоидных гормонов

и синтетических аналогов их метаболитов с целью улучшения исходов цереброваскулярных заболеваний.

В ходе проведенного комплексного клинического исследования и анализа генетических корреляций установлено, что высокий уровень трийодтиронина ассоциирован с более благоприятным исходом ишемического инсульта.

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, зависимых 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 инсульта, и закачивая стимуляцией когнитивных функций и процессов регресса неврологического дефицита.

В ходе исследования предложен алгоритм прогнозирования функционального исхода ишемического инсульта для внедрения в рутинную 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

Диссертационная работа является научным исследованием в области клинической прецизионной неврологии и улучшения качества жизни пациентов с цереброваскулярными заболеваниями.

Основная научная гипотеза исследования: тяжесть и функциональные исходы ишемического инсульта имеют особенности в зависимости от тиреоидного профиля в первые сутки после развития инсульта. Высокий уровень тиреоидных гормонов в момент развития инсульта ассоциирован с более благоприятным его течением и функциональным исходом. Молекулярные механизмы, реализующие данную ассоциацию, включают нейротропные эффекты метаболитов тиреоидных гормонов (тиронаминов) в ЦНС, а также влияние тиреоидных гормонов на активность сигнальных путей, регулирующих процессы апоптоза.

Для выполнения поставленных задач было проведено комплексное исследование, интегрирующее клинический этап с анализом влияния тиреоидного профиля на тяжесть и исход ишемического инсульта, экспериментальный этап, посвященный анализу нейротропных эффектов синтетических аналогов тиреоидных гормонов в модели острой церебральной ишемии, аналитический этап с выполнением мета-анализа генетических ассоциаций, связанных с тиреоидной системой, функциональными исходами инсульта и различными промежуточными фенотипами.

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: определение уровней ТТГ, свободного тироксина, свободного трийодтиронина, С-реактивного белка методом твердофазного иммуноферментного анализа;
 3. Инструментальный: дуплексное сканирование церебральных и прецеребральных сосудов (аппарат «Toshiba Aplio 500»), магнито-резонансная томография головного мозга с МР-ангиографией (аппарат «Амико МРФ3000»).
 4. Экспериментальный:
 - а. моделирование экспериментального ишемического инсульта у лабораторных животных (крысы) путем окклюзии общей сонной артерии;
 - б. анализ неврологического дефицита и поведенческих реакций, показателей окислительного стресса в модели острой церебральной ишемии на фоне введения синтетического аналога тиронамина.
 5. Анализ ассоциаций между генетическими предикторами и фенотипами с использованием метода менделевской рандомизации и международных научных баз данных.

Положения диссертации, 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 функциональный 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.
3. На клеточном уровне эффекты трийодтиронина реализуются через ряд молекулярных механизмов, связанных с ТААР-рецепторами. Синтетический аналог дейодированных метаболитов тиреоидных гормонов (тиронамин), активирующий ТААР-рецепторы, обладает нейропротекторными эффектами в модели ишемического инсульта. Механизм нейропротекторного действия тиронамина заключается в способности индуцировать гипотермию без нежелательных системных эффектов и нивелировать явления окислительного стресса, препятствуя снижению уровня супероксиддисмутазы и повышению продуктов перекисного окисления липидов в ишемизированной ткани головного мозга.
4. Активация ТААР-рецепторов дейодированными метаболитами тиреоидных гормонов приводит к различным биологическим эффектам в разные стадии острой ишемии головного мозга. В острейший период (первые сутки) введение лигандов ТААР-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 антиоксидантным эффектами, селективные лиганды ТААР-рецепторов на примере

разработанного синтетического аналога тиронамина (CA-T0AM) представляются перспективными нейропротекторами, дифференцированно воздействующими на процессы, которые происходят на разных стадиях ишемии головного мозга.

5. Одним из механизмов влияния гипотиреоза на функциональный исход инсульта выступает активация проапоптогенных сигнальных путей, а именно, повышение уровней апоптоз-индуцирующего митохондриального фактора-1 и апоптогенных белков семейства BCL. При этом экспрессия гена ядерного рецептора тиреоидных гормонов В влияет на активность антиапоптогенных факторов BCL-2 и МАРК2, имеющих большое значение для выживаемости нейронов.

6. Тиреоидные гормоны, прежде всего – трийодтиронин и его 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.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Идея диссертационной работы и ее реализация, научная гипотеза исследования принадлежат автору. Автором подготовлен дизайн и комплексная программа диссертационного исследования. Самостоятельно выполнен аналитический обзор литературы. Автором лично выполнен сбор, каталогизация и анализ клинического материала, организованы инструментальные и лабораторные исследования. Автором исследования организована совместная исследовательская работа Института физико-органической химии и углехимии им. Л.М. Литвиненко и ИНВХ им. В.К. Гусака по синтезу аналога эндогенного тиронамина, включая формирование основной идеи и выбор характеристик разрабатываемой субстанции. Автором организовано экспериментальное исследование, проведены систематизация и анализ экспериментальных данных. Автору принадлежит идея и реализация использования менделевской рандомизации для анализа влияния уровня трийодтиронина на функциональный исход инсульта, а также для поиска молекулярных механизмов нейротропных эффектов тиреоидных гормонов. Автор самостоятельно провел статистическую обработку полученных данных и дал научную интерпретацию полученных результатов с формулировкой выводов и практических рекомендаций.

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 неврологических заболеваний. Инструментальные переменные, необходимые для анализа, были извлечены из обширных международных баз данных, включающих результаты исследования миллионов генетических вариаций у тысяч индивидуумов из различных когорт.

В ходе экспериментальной части исследования были изучены биологические свойства аналога тиронамина, синтезированного в Институте физико-органической

химии и углехимии им. Л.М. Литвиненко. Чистота полученной субстанции была валидирована 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 на 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, 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), XXIII научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы клинической, экспериментальной неврологии, нейрохирургии, нейрофизиологии» (Казахстан, 2022), XIV Всемирном инсультном конгрессе (14th World Stroke Congress, Сингапур, 2022), I, II, III и IV Международном медицинском форуме Донбасса «Наука побеждать... болезнь» (Донецк, 2017-2020); II Международной научно-практической online-конференции, посвященной 90-летию ГОО ВПО ДОННМУ ИМ М. ГОРЬКОГО «Инновационные перспективы медицины Донбасса» (Донецк, 2020).

Апробация диссертационной работы 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 неврологическом отделении Городской клинической больницы №6 г. Донецке, неврологическом отделении Дорожной клинической больницы ст. Донецк, в неврологических отделениях центральной городской больницы №17 г. Донецка и 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 работы, из них в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК при Министерстве образования и науки Донецкой Народной Республики – 8, ВАК Российской Федерации – 1, ВАК Украины – 2.

Структура диссертации

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

Библиографический указатель включает 445 литературных источников, из которых 36 написаны кириллицей. Работа проиллюстрирована 46 таблицами и 52 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Диссертационное исследование представлено клиническим, экспериментальным этапами, а также аналитическим этапом с применением технологии менделевской рандомизации генетических корреляций.

Характеристика методов клинического этапа исследования

Клинический этап исследования представлен неинтервенционным проспективным рандомизированным когортным исследованием, в которое были включены 158 пациентов с острым ишемическим инсультом. *Критерии включения:* острый нелакунарный ишемический инсульт, госпитализация в период до 24 часов от появления симптомов инсульта, возраст старше 18 лет. *Критерии исключения:* 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-тироксином или тирозолом, наличие тяжелого системного заболевания, ХПН (СКФ < 60 мл/мин), хирургическое вмешательство в течение 30 дней до скрининга. Всем пациентам проводился комплексный клиничко-неврологический осмотр в динамике. Тяжесть неврологической симптоматики в остром периоде ишемического инсульта оценивалась с помощью Скандинавской шкалы инсульта (Scandinavian Stroke Scale). Для оценки функциональных исходов перенесенного ишемического инсульта применялась модифицированная шкала Рэнкина. Подтип гетерогенного ишемического инсульта устанавливался на основании критериев TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) по классификации подтипов ИИ (Adams H.P., 1993).

В течение первых 24 часов с момента развития симптомов инсульта анализировались базисные факторы риска, выполнялись общеклинические лабораторные анализы, анализ С-реактивного белка, а также ТТГ, св. Т3, св. Т4. К моменту выписки пациентам из стационара проводилось нейропсихологическое исследование с использованием шкалы MMSE.

Функциональный исход ишемического инсульта оценивался через 6 месяцев с момента развития инсульта по дихотомизированной конечной точке (0-2 балла против 3-6 баллов по модифицированной шкале Рэнкина) и по порядковой конечной точке, представленной всем спектром модифицированной шкалы Рэнкина.

Характеристика методов экспериментального этапа исследования

Для проверки научной гипотезы о влиянии дейодированных метаболитов тиреоидных гормонов на тяжесть неврологического дефицита в экспериментальной модели ишемического инсульта, идентификации их нейропротекторных свойств был синтезирован аналог эндогенного тиронамина – селективный лиганд TAAR-рецепторов.

Спектры ЯМР ^1H записывались на приборе Bruker Avance II 400, внутренний стандарт – тетраметилсилан.

Синтез соединения СА-Т0АМ (рисунок 1) выполнен в соответствии с методикой, предложенной Chellini et al. (2015) с собственными модификациями.

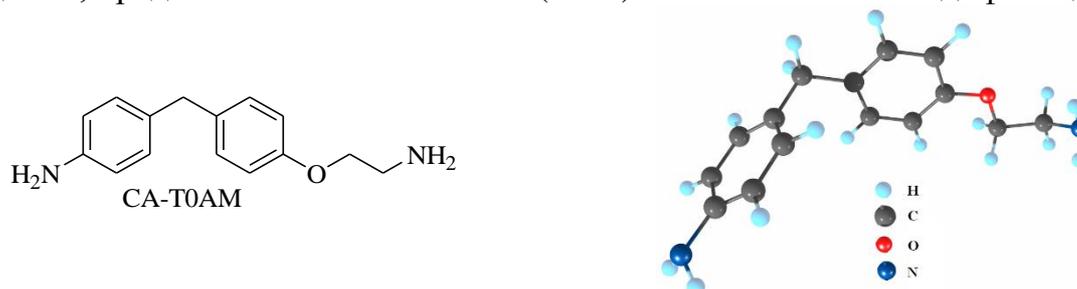


Рисунок 1 – 2D и 3D структурные модели 4-[4-(2-аминоэтокси)бензил]-анилина. (3D-модель получена в результате оптимизации молекулярной геометрии СА-Т0АМ в приближении полуэмпирического квантово-химического метода PM6 (Stewart, 2013) с помощью программного комплекса MOPAC2016 (Gieseck, 2021).

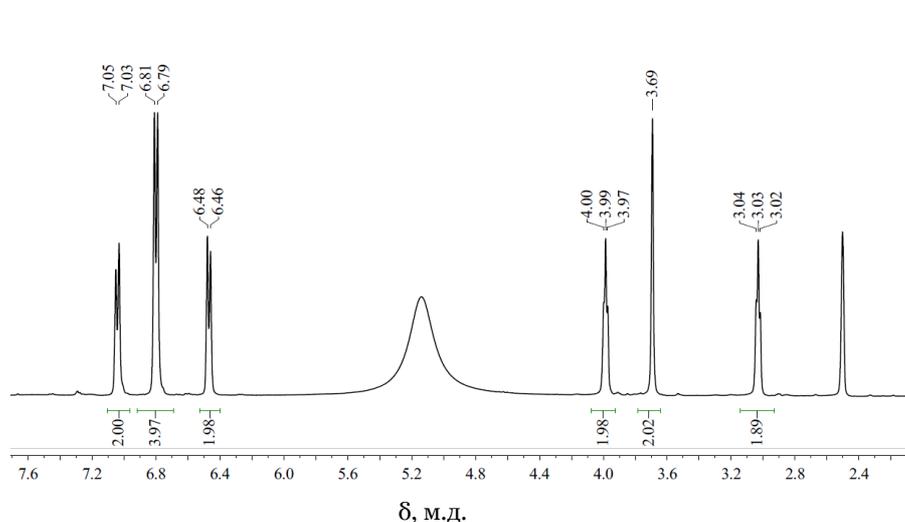


Рисунок 2 – ЯМР ^1H спектр 4-[4-(2-аминоэтокси)бензил]анилина в ДМСО- d_6

Для оценки влияния синтетического аналога тиронамина на неврологический дефицит и поведенческие нарушения при экспериментальном инсульте, а также на его исходы была сформирована группа животных, состоящая из 30 белых беспородных лабораторных крыс массой 250-300 г. Животные были разделены на три группы: «Sham», «Control» и «Т0АМ» 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 вводился исследуемый препарат – СА-Т0АМ в ранее определенной оптимальной дозировке 75 мг/кг (Филимонов Д.А. и соавт., 2019), 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) производились 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.

Для определения показателей тревожности, двигательной и исследовательской активности животных тестировали в установке «Открытое поле» до операции и повторно спустя 24 часа, через 3 и 7 суток после операции. Для оценки неврологического дефицита использовали следующие шкалы: 28-бальный неврологический тест, NSS, шкалу Лонга, шкалу Гарсиа. Для оценки когнитивного дефицита использовали тест в Т-образном лабиринте. Кроме того, в краткосрочной модели эксперимента анализировались показатели окислительного стресса в ишемизированном полушарии: уровень SOD, ТБК-активных продуктов и глутатионпероксидазы.

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 (Devies, 2018; Sanderson, 2022).

Для проведения анализа использовались среда разработки RStudio и пакеты TwoSampleMR, MRInstiments, MendelianRandomization. Составление дизайна исследования, выбор инструментальных переменных (генетических вариаций), методов MR-анализа, определение чувствительности и воздействия плеiotропии проведены с использованием стандартных методов (Burgess et al., 2019). 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-EVI (Национальный Институт исследования генома, <https://www.ebi.ac.uk/gwas/>).

Результаты исследования и их обсуждение

Основные клиничко-неврологические показатели и факторы риска развития ишемического инсульта

При анализе факторов риска ишемического инсульта в исследуемой выборке пациентов преобладали гипертоническая болезнь III ст., фибрилляция предсердий, ИБС. Подавляющее число пациентов переносили ишемический инсульт в каротидном

бассейне, ведущим подтипом 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.

Таблица 1 – Основные факторы риска и клинические показатели пациентов в зависимости от подтипа (классификация TOAST) ишемического инсульта

Показатель	Атеротромботический подтип, N = 108 ¹	Кардиоэмболический подтип, N = 22 ¹	Криптогенный, N = 26 ¹	Гемодинамический 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 (14.7, 17.5)	17.5 (16.6, 19.1)	15.8 (14.3, 16.5)	13.1(13.1, 13.1)	<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/л	10 (5, 29)	25 (7, 40)	9 (4, 46)	23 (23, 23)	0.3
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)	0.3 (0.3, 0.3)	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%)	

Примечания:¹Медиана (межквартильный интервал); n (%) ² Тест Краскела-Уоллиса; тест Фишера

При рассмотрении основных характеристик ишемического инсульта в зависимости от его подтипа выявлены различия в распределении ряда показателей: пациенты с кардиоэмболическим инсультом чаще переносили тяжелый неврологический дефицит и имели неблагоприятный исход, также кардиоэмболический подтип ассоциирован с более высокими уровнями св. Т4 и более низкими показателями MMSE.

Первый этап оценки влияния тиреоидного статуса на клинические характеристики инсульта представлен анализом различий в подгруппах, сформированных в зависимости от уровня ТТГ, как наиболее часто используемого маркера, отражающего функцию щитовидной железы (таблица 2). Наблюдения с уровнем ТТГ ниже или выше референтного интервала были расценены как субклинический гипер- и гипотиреоз соответственно (Thayakaran et al., 2019).

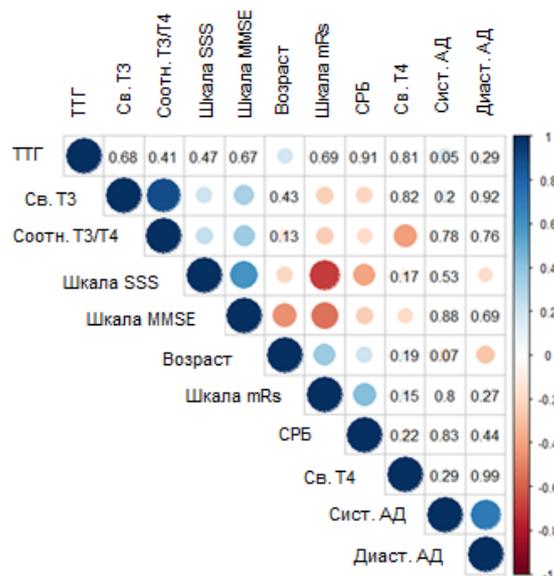
Таблица 2 – Основные факторы риска и клинические показатели пациентов в зависимости от подтипа (классификация TOAST) ишемического инсульта

Характеристика	Эутиреоз N = 130 ¹	Гипертиреоз, N = 13 ¹	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
Этиология инсульта (TOAST)				0.1
Атеротромботический	84 (65%)	5 (38%)	15 (100%)	
Кардиоэмболический	22 (17%)	8 (62%)	0 (0%)	
Криптогенный	22 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	
Другой	2 (1.5%)	0 (0%)	0 (0%)	
Гипертоническая болезнь				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)	<0.00 1
Св. Т4, пмоль/мл	16.30 (14.50, 7.50)	15.65 (15.07, 16.23)	16.3 (15.6, 17.5)	0.6
Св. Т3, пмоль/мл	4.61 (3.94, 5.32)	3.68 (2.65, 4.96)	5.2 (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				
Легкий	56 (43%)	7 (54%)	7 (47%)	0.057
Умеренный	42 (32%)	2 (15%)	9 (53%)	
Тяжелый	32 (25%)	4 (31%)	0 (0%)	
Примечание: ¹ Медиана (межквартильный диапазон); n (%) ² Тест Краскела-Уоллиса; Тест Фишера				

Основные характеристики ИИ и факторы риска его развития не имели существенных различий в подгруппах, сформированных согласно уровню ТТГ.

Для идентификации маркеров функции щитовидной железы, влияющих на клинико-неврологические характеристики инсульта, была построена корреляционная матрица (рисунок 3). В ходе анализа выявлены умеренная положительная корреляция между уровнем св. Т3 и суммой баллов по Скандинавской шкале ($r=0,44$), отрицательная умеренная корреляция между уровнем св. Т4 и суммой баллов по Скандинавской шкале ($r = -0,23$), умеренная положительная корреляция между уровнем св. Т3 и суммой баллов по шкале MMSE ($r=0,39$), а также корреляционная связь между рядом других показателей. Результаты корреляционного анализа демонстрируют, что уровень св. Т3 был ассоциирован с более высокими баллами по Скандинавской шкале (менее тяжелым дефицитом), а также с более высокими показателями по шкале MMSE. Для св. Т4 был характерен обратный эффект. Тест Грэйнджера демонстрирует, что уровень св. Т3 оказывает причинно-следственное влияние на уровень СРБ ($F = 7.767$, $p = 0.00016$).



Примечание: шкала отражает силу корреляционной связи, размер овала – статистическую значимость. Для статистически незначимых ассоциаций указан коэффициент r .

Рисунок 3 – Корреляционная матрица клинико-неврологических и лабораторных показателей пациентов с ИИ

С учетом наличия статистически значимой корреляционной связи уровня св. Т3 с показателями тяжести и исхода ишемического инсульта была проведена оценка различий в характеристиках пациентов, распределенных на подгруппы согласно принадлежности квантилям уровней св. Т3 (таблица 3).

Таблица 3 – Основные факторы риска и клинические показатели пациентов в зависимости от уровня св. Т3

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%)	
Гипертоническая болезнь				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	1.1 (0.81, 2.14)	1.11 (0.76, 1.61)	1.42 (0.9, 2.2)	0.2
Св. Т4, пмоль/мл	16.3 (14.8, 17.5)	16.1 (14.6, 17.1)	17.1 (15.7, 18.1)	0.14
Св. Т3, пмоль/мл	2.8 (2.21, 3.3)	4.58 (4.4, 4.84)	5.86 (5.53, 6.6)	<0.001
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:¹Медиана (межквартильный диапазон); n (%) ²Тест Краскела-Уоллиса; Тест Хи-квадрат Пирсона; Тест Фишера; Q – квартиль уровня свободного Т3.

Распределение целого ряда показателей в группах, сформированных по уровню св. Т3, имеет статистически значимые различия. Так, у пациентов с уровнем св. Т3 в

IV кватртеле отмечался менее выраженный неврологический дефицит (медиана 44 [40;50] балла по сравнению с 37 [24;51] баллами в группе с уровнем св. Т3 во II-III кватртелях и с 29 [24;42] баллами в группе с уровнем св. Т3 во I кватртеле). Также в группе пациентов с уровнем св. Т3 в IV кватртеле чаще отмечался благоприятный исход ИИ, фиксировались более высокие показатели MMSE (медиана 25 [21;28] баллов по сравнению с 19 [12;26] баллами в группе с уровнем св. Т3 во II-III кватртелях).

Влияние тиреоидных гормонов на тяжесть и функциональный исход ишемического инсульта

Для оценки независимого влияния уровня св. Т3 на тяжесть неврологического дефицита в остром периоде ИИ был проведен регрессионный анализ. Установлено, что на тяжесть ИИ оказывают независимое статистически значимое влияние уровень св. Т3 ($\beta=3.03$; 95% ДИ 0.15, 5.91), уровень св. Т4 ($\beta=-1.1$; 95% ДИ -2.3, 0.00; $p=0.06$), а также уровень СРБ ($\beta=-0.20$; 95% ДИ -0.40, -0.01, $p=0.031$). Коэффициент $R^2 = 0.42$.

Согласно проведенному анализу, 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). Обращает на себя внимание, что уровень ТТГ, соотношение св. Т3/св. Т4, а также ряд базисных факторов не влияли на качество модели. Графическое отображение сочетанного влияния уровней св. Т3 и св. Т4 представлено на рисунке 4.

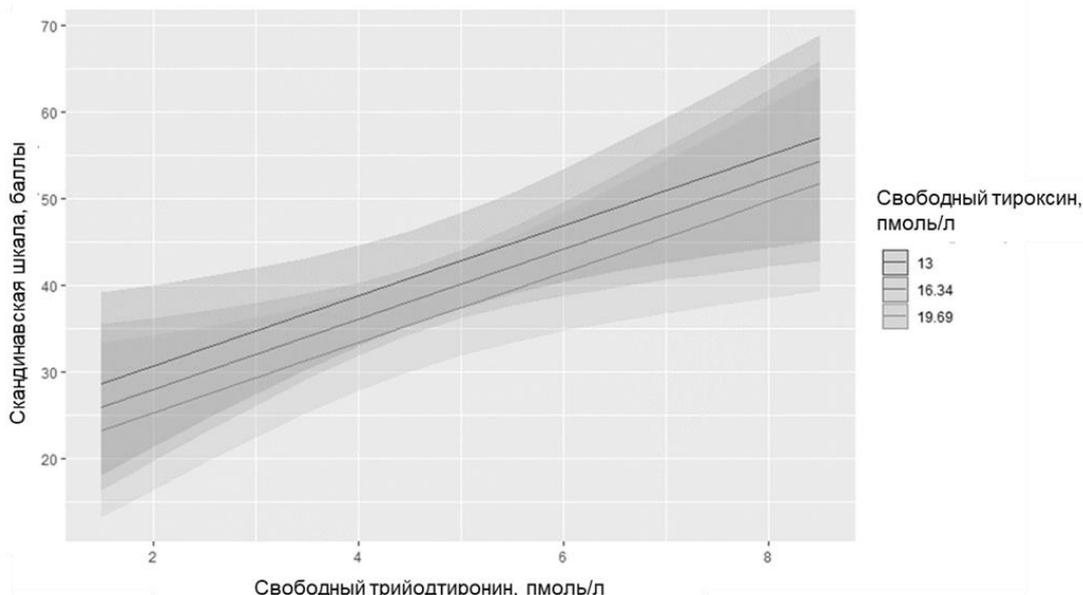


Рисунок 4 – График регрессионного влияния уровней св. Т3 и св. Т4 на тяжесть неврологического дефицита в остром периоде ишемического инсульта

Для оценки ассоциации между уровнем св. Т3 и тяжестью неврологического дефицита в остром периоде ишемического инсульта был проведен дисперсионный анализ. Тест ANOVA показал, что у пациентов с уровнем св. Т3 в IV кватртеле (≥ 5.35 пмоль/л; 95% ДИ 5,01 – 5,61) неврологический дефицит был менее выражен по сравнению с пациентами с уровнем св. Т3 во II-III кватртеле (медиана по шкале SSS 48

баллов и 37 баллов соответственно, $p = 0,0481$), и значительно менее выражен по сравнению с пациентами, у которых уровень св. Т3 находился в I квантиле ($\leq 3,4050$ пмоль/л, медианы по шкале SSS 48 и 30 баллов соответственно, $p=0,031$ с поправкой Бонферрони). Результаты дисперсионного анализа представлены на рисунке 5.

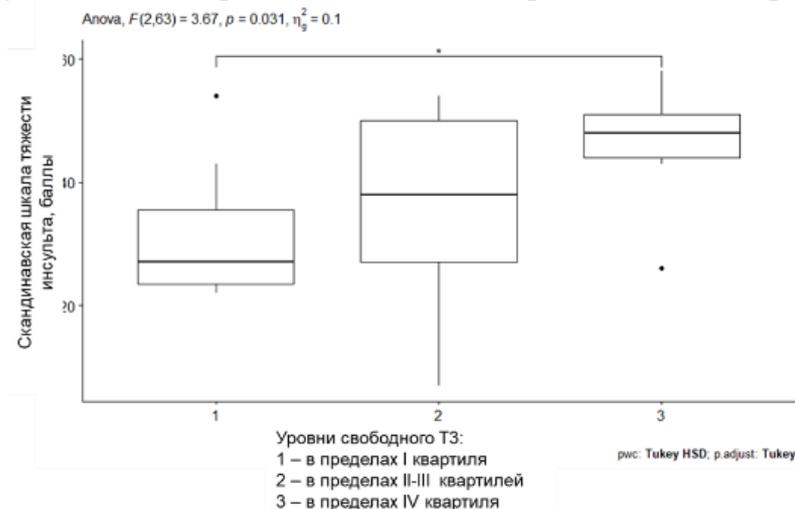


Рисунок 5 – Анализ вариации неврологического дефицита в подгруппах пациентов в зависимости от содержания свободного трийодтиронина (тест ANOVA)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что высокий уровень св. Т3 ассоциирован с менее тяжелым неврологическим дефицитом в остром периоде ишемического инсульта.

Для выбора наиболее значимых предикторов, влияющих на функциональный исход ИИ через 6 месяцев с момента его развития, был проведен сравнительный анализ их распределения в подгруппах пациентов согласно дихотомизированной конечной точке. Результаты проведенного анализа представлены в таблице 4.

Таблица 4 – 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 – 5,58)	4,43 (4,036 – 4,65)	0,0173
Св. Т4, пмоль/л	16,1 (14,61-17,22)	16,5 (15,47 – 16,8)	>0,05
ТТГ, мМЕ/мл	1,305 (0,78 – 1,86)	1,16 (0,99 – 1,43)	>0,05
СРБ, мг/л	6,29 (5,26 – 8,04)	16,1 (8,565 – 24,7)	0,0140
Отношение Св.Т3 / Св.Т4	0,366 (0,287 – 0,343)	0,27 (0,235 – 0,304)	0,0374

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

Для определения предикторов, влияющих на функциональный исход ИИ по всему спектру шкалы mRs был использован метод векторной обобщенной линейно-аддитивной модели. Результаты представлены в таблице 5 и на рисунке 6.

Таблица 5 – Показатели векторной обобщенной линейно-аддитивной модели влияния предикторов на функциональный исход инсульта

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	0,0415	0,3279	0,1099-0,8782
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

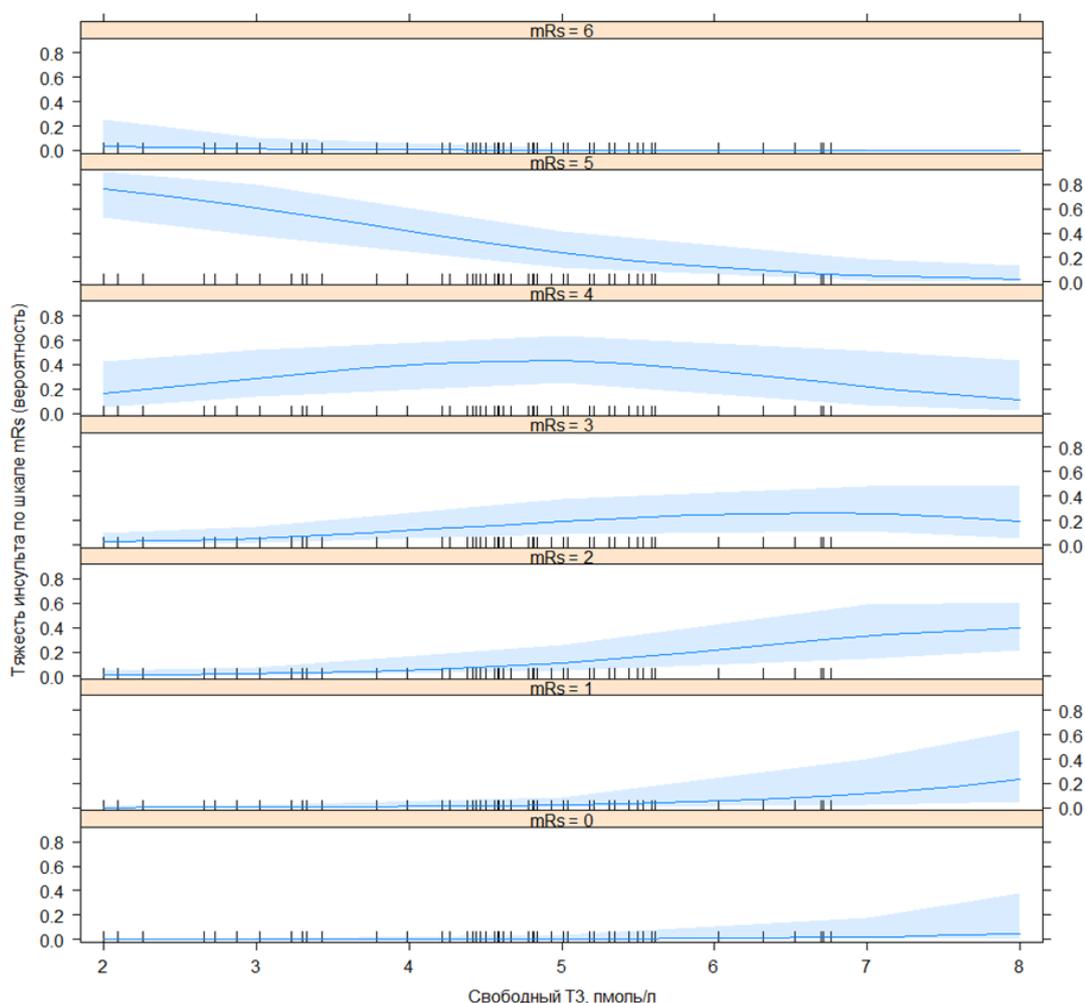
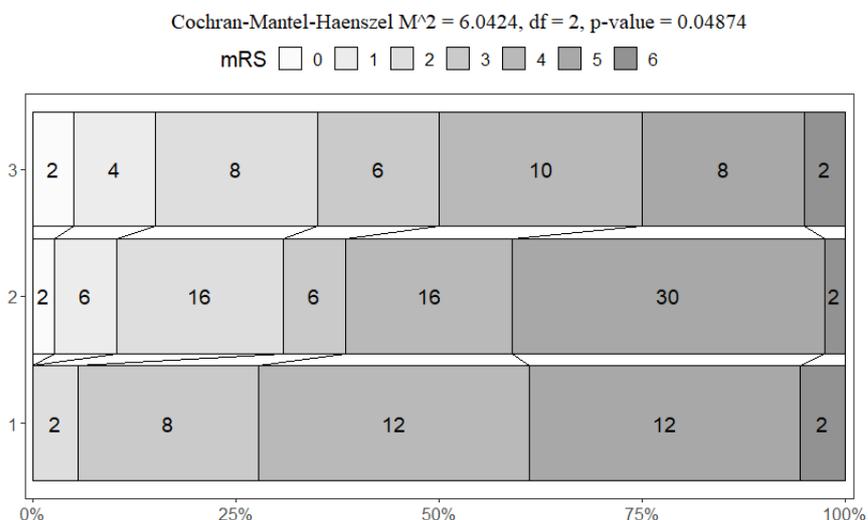


Рисунок 6 – Влияние уровня свободного трийодтиронина на шансы различных функциональных исходов ишемического инсульта

Согласно данным анализа, увеличение уровня св. Т3 на 1 пмоль/л ассоциировано со снижением шанса более тяжелого функционального исхода на 67%.

Для сравнения исходов ишемического инсульта у пациентов с разным профилем базисного уровня трийодтиронина был использован тест Кохрена-Мантеля-Хензеля. Пациенты были разделены на три группы по уровню св. Т3: ниже 25-го перцентиля, 25-75-й перцентили, выше 75-го перцентиля. Тест показал общие различия в mRs-шкале в группах с $p = 0,04874$, не зависящие от возраста и исходной тяжести инсульта. Медиана mRs-шкалы составила 4 в группах с низким уровнем св. Т3 и в пределах II-III квартилей; и 2,5 в группе с высоким св. Т3. Влияние уровня св. Т3 на распределение пациентов по исходам ишемического инсульта представлено на рисунке 7.



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

Рисунок 7 – Распределение пациентов по тяжести функционального исхода инсульта в зависимости от квартилей уровня свободного трийодтиронина

Для прогнозирования исхода ишемического инсульта по дихотомизированному отклику (0-2 балла по шкале mRs против 3-6 баллов) была использована модель бинарной регрессии (GLM). Характеристики статистически значимых предикторов неблагоприятного исхода инсульта в дихотомизированной модели представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Показатели влияния предикторов на дихотомизированный функциональный исход инсульта в модели пробит-регрессии

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, 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 по шкале mRs) на 46% при прочих равных условиях. График влияния уровня свободного трийодтиронина на вероятность неблагоприятного исхода ИИ представлен на рисунке 8.

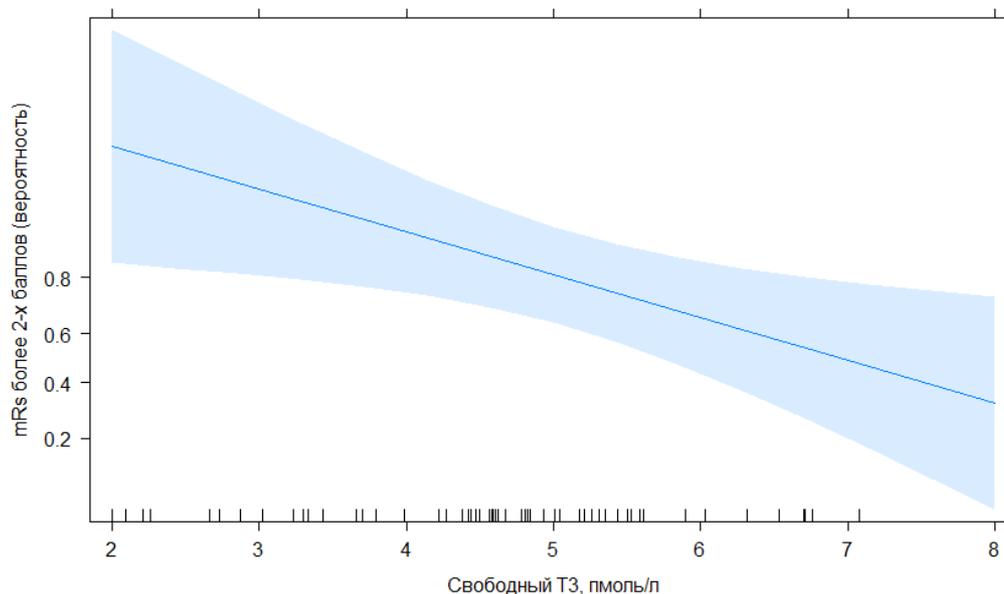
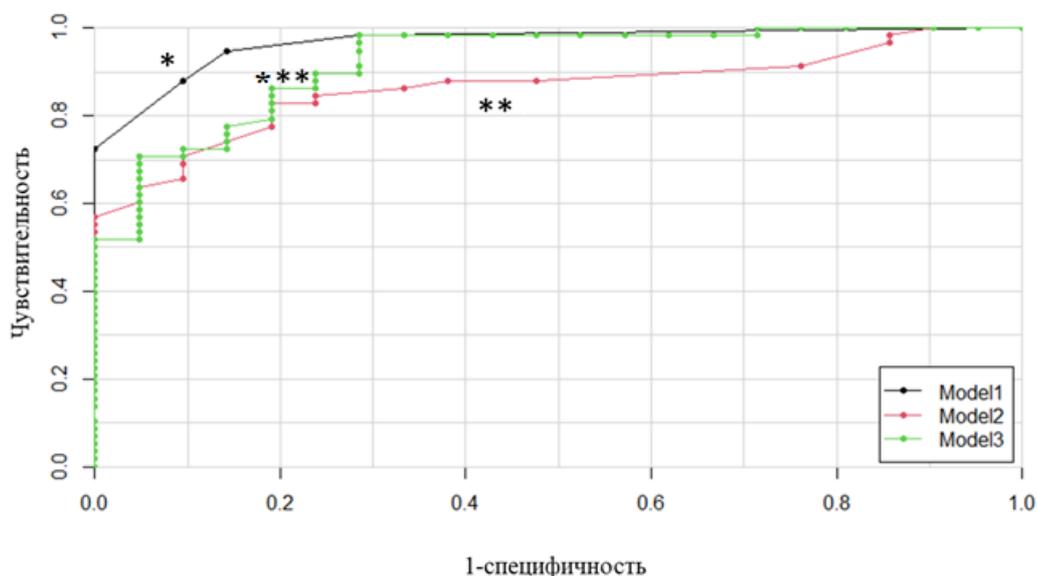


Рисунок 8 – Влияние уровня свободного трийодтиронина на вероятность неблагоприятного функционального исхода ишемического инсульта

Результаты предыдущих этапов исследования 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 исходов ишемического инсульта.

Прогностическая модель влияния тиреоидных гормонов на функциональный исход ишемического инсульта с применением машинного обучения

Для прогнозирования функциональных исходов ишемического инсульта был использован алгоритм на основе технологии машинного обучения с использованием метода классификационно-регрессионных деревьев (CART). При анализе с применением тестовой когорты (30% об общей выборки) и построения матрицы неточностей установлено, что предложенный алгоритм обладает точностью 92,6%, чувствительностью 88% и специфичностью 94%. Следует отметить, что предложенный алгоритм может быть легко применим в клинической практике, т.к. требует всего лишь двух лабораторных показателей (уровни св. Т3 и св. Т4). График чувствительности и специфичности алгоритма представлен на рисунке 9, алгоритм прогнозирования функционального исхода ишемического инсульта – на рисунке 10.



Примечание: * - модель прогнозирования на основе машинного обучения (model 1);
 ** - модель прогнозирования на основе возраста и Скандинавской шкалы (model 2);
 *** - модель прогнозирования на основе Скандинавской шкалы (model 3).

Рисунок 10 – График ROC-кривых моделей прогнозирования неблагоприятного функционального исхода ишемического инсульта

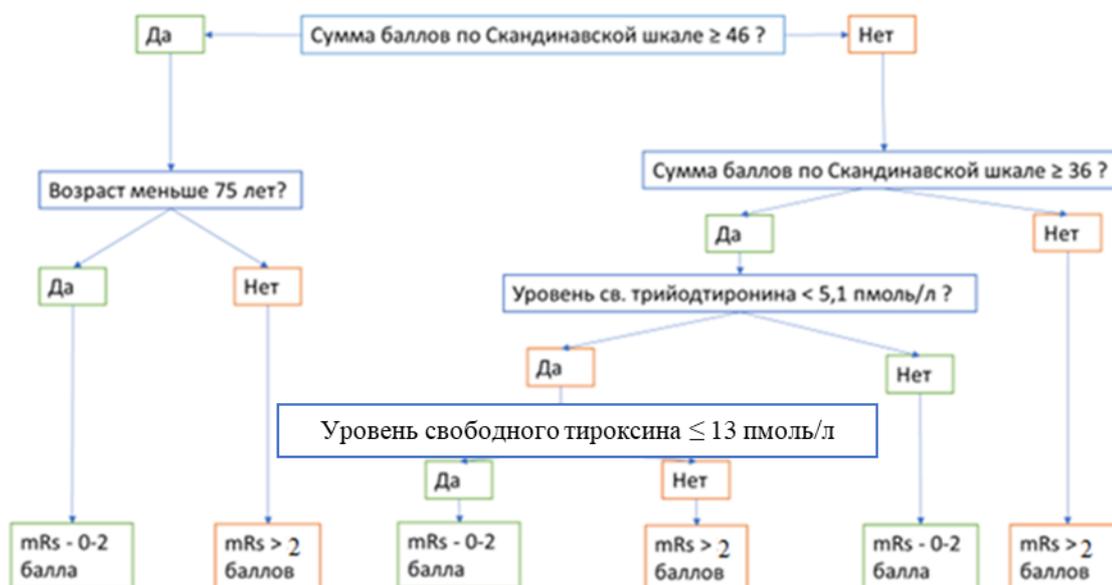


Рисунок 11 – Клинический алгоритм прогнозирования функционального исхода ишемического инсульта, разработанный на основе технологии машинного обучения

В ходе исследования был проведен анализ влияния тиреоидного профиля на функциональные исходы гетерогенного ишемического инсульта через 6 месяцев после его развития. Результаты многофакторного прогностического моделирования

позволяют выделить уровень св. Т3 в первые 24 часа после развития инсульта как независимый статистически значимый предиктор его функционального исхода. Продемонстрировано влияние св. Т3 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 (Sandset, 2017). Полученные результаты дают основания предполагать, что назначение синтетических аналогов трийодтиронина пациентам с ишемическим инсультом позволит улучшить функциональные исходы в том числе вне пределах «благоприятного» диапазона (0-2 балла по шкале mRS).

В ходе исследования было отмечено разнонаправленное действие св. Т3 и св. Т4 на исход инсульта. Гормоны Т3 и Т4 имеют схожую химическую структуру и биологическую функцию, но в данном исследовании они демонстрируют противоположные эффекты по отношению к исходам инсульта.

Полученные нами результаты коррелируют с фундаментальными исследованиями. В экспериментальных моделях было показано, что введение L-тироксина после преходящей ишемии головного мозга способствует увеличению плотности нейронов и стимуляции ангиогенеза в ишемизированном мозге (Davis et al., 2009; Schroeder, Privalsky, 2014). Результаты другого исследования *in vitro* показали, что трийодтиронин может восстанавливать внутриклеточную концентрацию натрия, ионов кальция и pH (Talhada, Santos, et al., 2019). Было показано, что трийодтиронин стимулирует синтез других нейротрофических факторов, таких как фактор роста фибробластов (Mancini et al., 2016; Talhada, Feiteiro, et al., 2019).

Биологические и нейропротекторные эффекты синтетического аналога тиронамина в экспериментальной модели ишемического инсульта

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 (ТАМ) представляют собой эндогенные молекулы, образующиеся из гормонов щитовидной железы путем дейодирования и декарбоксилирования (Hoefig et al., 2015, 2016).

Для доказательства связи нейропротекторных эффектов тиреоидных гормонов с их дейодированными метаболитами – тиронаминами, был синтезирован аналог тиронамина Т0АМ с применением технологии оптимизации молекулярной геометрии квантово-химическим методом РМ6.

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 СА-Т0АМ в сочетании с галотановым наркозом и в контрольной группе, в которой животные были подвергнуты только воздействию галотана, отмечалась с 21-й минуты исследования (33,47 °С, 95% ДИ 33,1–34,7 °С в экспериментальной группе и 34,97 °С, 95% ДИ 34,7– 35,3 °С 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 °С ниже, чем у контрольных животных ($p \leq 0,0001$). Результаты эксперимента представлены на рисунке 12.

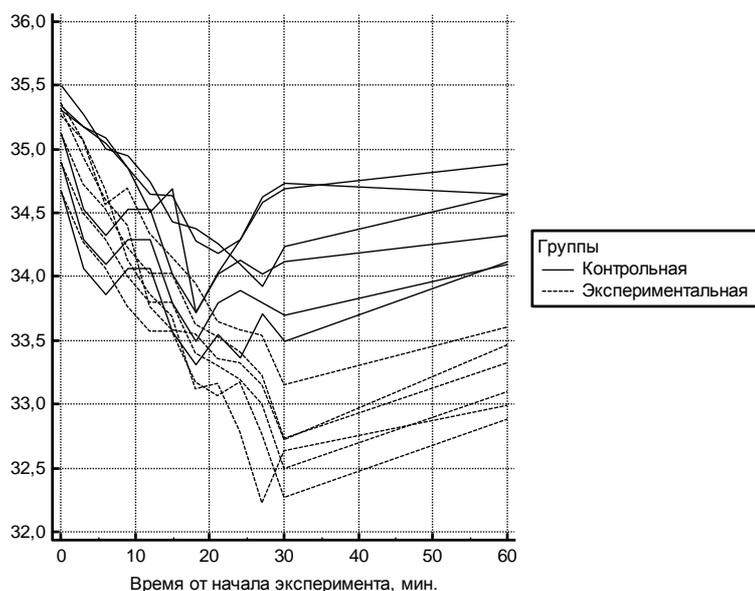


Рисунок 12 – Динамика ректальной температуры тела исследуемых животных на фоне галотанового наркоза (контроль) и инъекции САТ0 на фоне галотанового наркоза (эксперимент)

Интерес представляет обнаруженное в ходе исследования независимое от галотана влияние тиронаминов на термогенез. Галотан также является криогеном, действие которого основано на ингибировании норэпинефрин-индуцированного термогенеза в жировой ткани и непосредственном воздействии как на центральные, так и на периферические механизмы терморегуляции (Bellusci et al., 2017; Dicker et al., 1995). Со своей стороны, тиронамин модулирует активность субмитохондриальных частиц и растворимой субъединицы F1 АТФазы, снижая потребление кислорода и усиливая продукцию перекиси водорода митохондриями (Sabatini et al., 2016). 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 (Zucchi et al., 2014). Полученные данные дают основания считать СА-Т0АМ перспективным индуктором гипотермии для лечения критических состояний.

После подтверждения гипотермических свойств разработанной субстанции на следующем этапе работы изучались нейропротекторные эффекты синтетического аналога тиронамина в модели ишемического инсульта.

На третьи сутки после ишемии у интактных животных показатель NSS-теста составил 1 балл, что было связано с возрастом экспериментальных животных. После операции у ложнооперированных особей (группа sham) результаты NSS-теста не отличались от нормы (1, 3, 7 сутки – 1 балл). У крыс с ишемией (группа control) на первые сутки наблюдался выраженный неврологический дефицит (3 баллов), который

сохранялся вплоть до 7 суток (2 балла). У животных на фоне терапии аналогом тиронамина (группа T0AM) показатель NSS-теста не отличался от нормальных значений (1 балл), а к концу наблюдений (7 сутки) даже превзошел дооперационный результат (0 баллов).

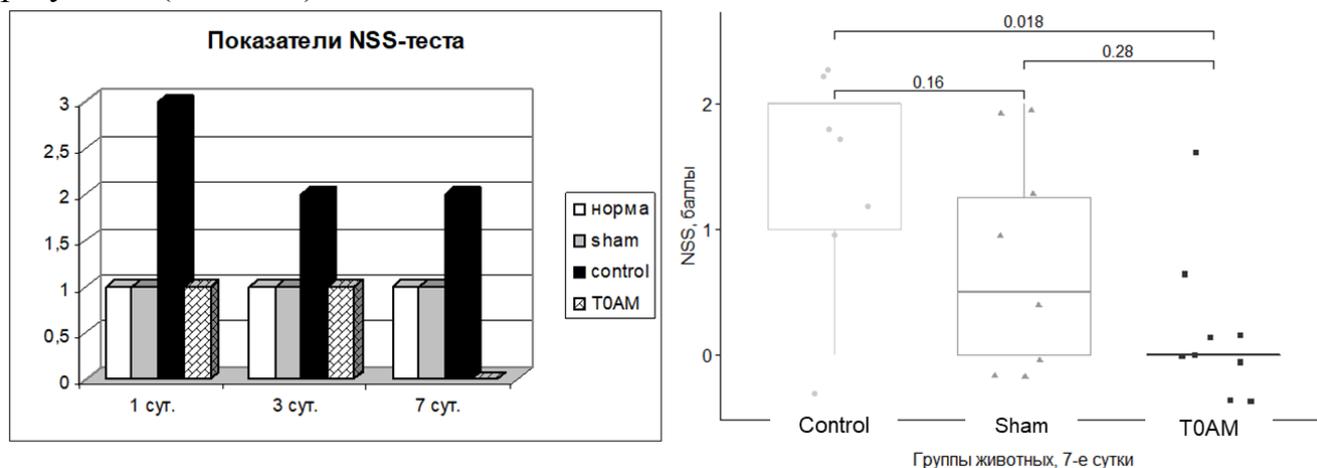


Рисунок 13 – Динамика изменений показателей NSS-теста у лабораторных крыс в эксперименте

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. (медиана). После ложной операции медиана времени прохождения возросла 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 аналога тиронамина, даже в сравнении с предоперационными показателями ($p < 0,05$ для разницы медиан в группах). Результаты прохождения Т-лабиринта представлены на рисунке 14.

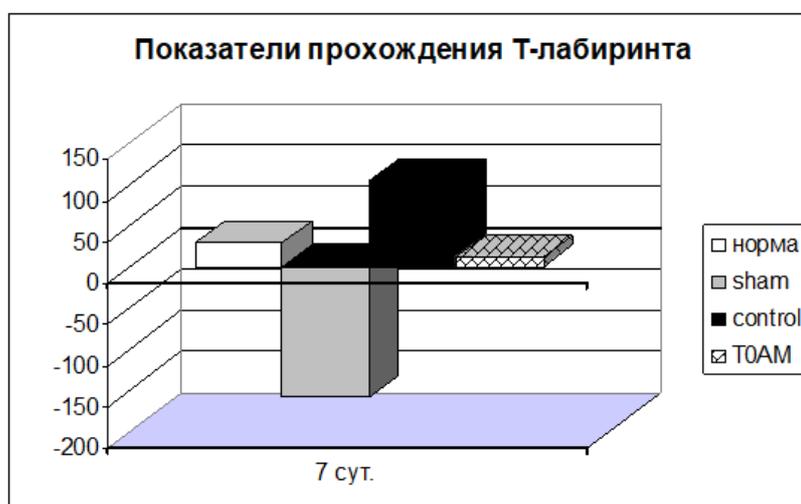


Рисунок 14 – Результаты прохождения Т-лабиринта животными на 7-е сутки после экспериментального ишемического инсульта

Результаты анализа поведенческих реакций и тяжести неврологического дефицита демонстрируют способность синтетических аналогов тиронамина улучшать функциональные исходы ишемического инсульта в эксперименте, в том числе способствовать восстановлению когнитивных функций.

В ходе исследования в ткани головного мозга лабораторных животных через сутки после моделирования острой очаговой ишемии головного мозга были определены продукты перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты), а также уровень супероксиддисмутазы (СОД). Результаты анализа маркеров окислительного стресса в ишемизированном и интактном полушариях головного мозга представлены на рисунке 15.

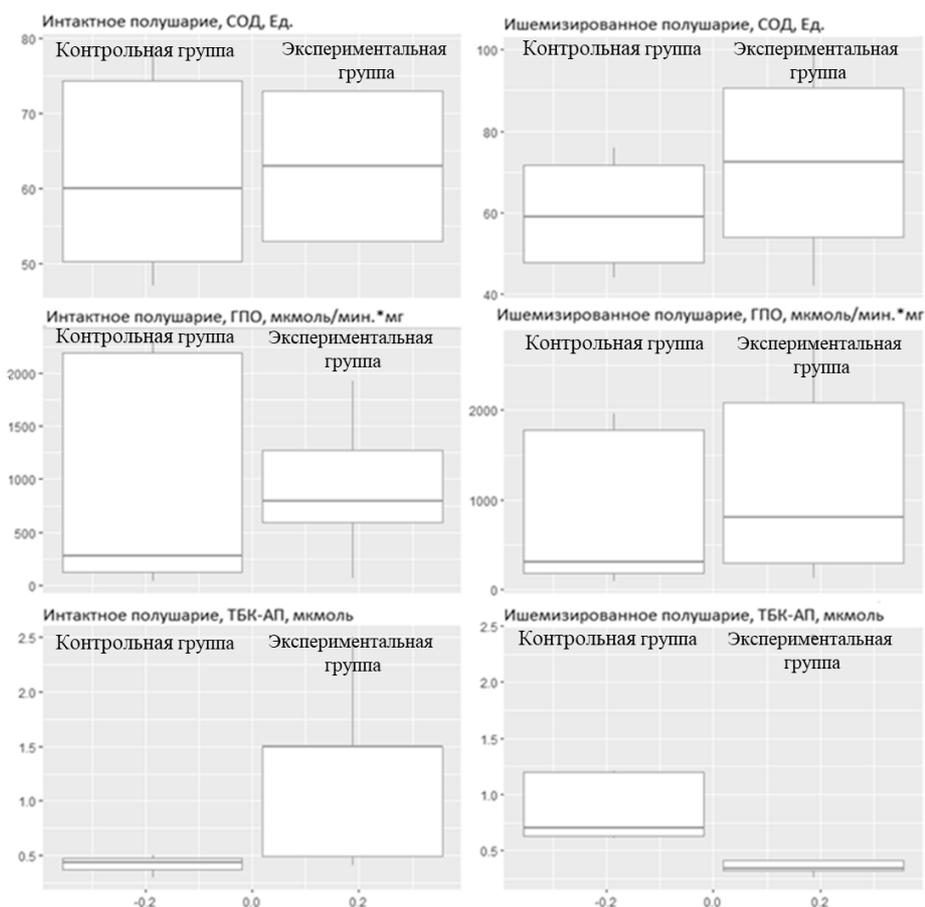


Рисунок 15 – Активность маркеров окислительного стресса в исследуемых группах животных

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 норме и в условиях окислительного стресса.

Начиная с 2017 г. в литературе появляются публикации о способности тиронамина T1AM и его синтетического аналога SG-2 модулировать поведенческие реакции у животных в моделях различных неврологических заболеваний.

Исследования демонстрируют, что при внутривенном введении мышам как T1AM, так и SG-2 вызывали эффекты улучшения памяти и гипералгезии, что реализуется через увеличение фосфорилирования ERK1/2 и экспрессию транскрипционного фактора c-fos (Bellusci et al., 2017). Однако сведения о биологической роли T0AM практически отсутствуют. Согласно полученным в экспериментальной части настоящего исследования данным, T0AM является не только конечным метаболитом тиреоидных гормонов, но и обладает биологическими эффектами, сходными с T1AM. Учитывая проницаемость T0AM для гематоэнцефалического барьера, о чем свидетельствует скорость наступления биологических эффектов, синтетические аналоги данной субстанции представляются потенциальными кандидатами для разработки лекарственных форм.

Результаты мета-анализа генетических корреляций между тиреоидным статусом, маркерами активности клеточного апоптоза и функциональным исходом ишемического инсульта

Заключительный этап диссертационной работы представлен менделевским рандомизационным исследованием, направленным на выявление взаимосвязи между маркерами тиреоидного статуса, ассоциированными с ними промежуточными фенотипами и исходами острых нарушений мозгового кровообращения.

В качестве инструментальных переменных, генетически предсказывающих уровень св. Т3, использовались 14 независимых однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), которые были извлечены из 2 GWAS-исследований в когортах жителей города Split и острова Corsula (Хорватия) и представлены в таблице 9 (Matana et al., 2019). Инструментальные переменные, ассоциированные с функциональным исходом инсульта (по дихотомизированной конечной точке 0-2 балла по шкале Рэнкина против 3-6 баллов) были извлечены из базы данных GISCOME (Sanders et al., 2019). Сеть GISCOME содержит данные 12 полногеномных исследований, проведенных Международным консорциумом генетики инсульта и инициативой Stroke Genetics Network Национального института неврологических заболеваний США.

Таблица 7 – Одиночные нуклеотидные последовательности, ассоциированные с уровнем свободного трийодтиронина

SNP	Chr	Ближайший ген	EA	OA	FREQ	BETA	SE	p
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
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	LOC101927081	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	XXYL1	C	G	0.148	-0.44	0.09	3.65e-6

Примечание: Chr – хромосома; SNP - однонуклеотидный полиморфизм; EA - эффективный аллель; OA - некодирующий аллель; FREQ - частота эффективного аллеля; BETA - общая расчетная величина эффекта для эффективного аллеля; SE — общая стандартная ошибка оценки величины эффекта; p - P-значения мета-анализа

Тест на нарушение равновесия сцепления Хайди-Вайберга проводился с использованием базы данных 1000Genomes. В ходе анализа из перечня однонуклеотидных вариаций, генетически прогнозирующих уровень св. Т3, были удалены 5 SNP ($R^2 > 0,1$ для нарушения равновесия сцепления). Результаты анализа представлены на рисунке 16 и в таблице 8.

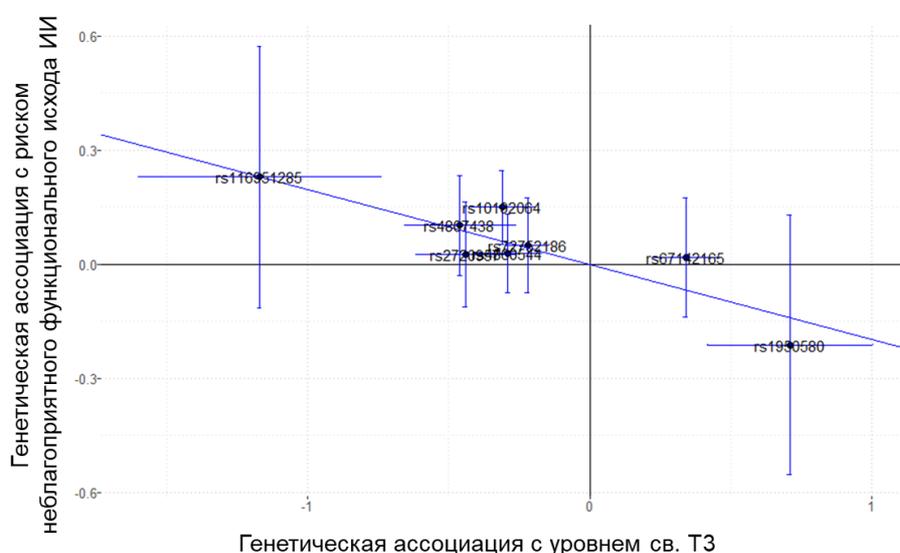


Рисунок 16 – Диаграмма рассеяния, отображающая взаимосвязь эффектов SNP, влияющих на уровень св. Т3 с эффектами SNP, прогнозирующими риск неблагоприятного функционального исхода ишемического инсульта

Таблица 8 – Менделевский рандомизационный анализ влияния концентрации свободного Т3 на риск неблагоприятного исхода инсульта

Метод	Количество SNP	BETA	SE	p
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: SNP - однонуклеотидный полиморфизм; BETA - общая расчетная величина эффекта; SE – общая стандартная ошибка оценки величины эффекта; p – P-значения мета-анализа.

Результаты анализа подтверждают наличие причинно-следственной связи между уровнем св. Т3 и функциональным исходом ишемического инсульта. Согласно полученным данным, генетически прогнозируемое повышение уровня св. Т3 на 1 пмоль/л ассоциировано со снижением риска неблагоприятного исхода инсульта на 18% (95% ДИ 0.72 - 0.92). Результаты проведенного исследования согласуются с рядом клинических наблюдений, посвященных изучению прогностической значимости концентрации свободного Т3 в сыворотке крови больных с острым ишемическим инсультом (Xu et al., 2016).

Потенциальный нейропротекторный эффект тиреоидных гормонов может быть связан с их влиянием на процессы апоптоза. Для подтверждения данной гипотезы было проведено менделевское рандомизационное исследование с целью определения причинно-следственной связи между уровнем св. Т3 и активностью протеинов сыворотки, ассоциированных с процессами апоптоза.

Однонуклеотидные вариации, ассоциированные с гипотиреозом, были извлечены из базы UKBiobank при помощи системы OpenGWAS (Elsworth et al., 2020). Инструменты (однонуклеотидные вариации), ассоциированные с циркулирующими белками системы апоптоза были извлечены из проекта «Геномный атлас протеома плазмы», включающего данные 1927 генетических ассоциаций с 1478 белками плазмы (Sun et al., 2018). 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 анализа представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Анализ влияния генетически прогнозируемого гипотиреоза на уровень проапоптогенных белков в сыворотке

Предиктор	Показатель	Метод MR	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	Индукующий 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 мета-анализа с использованием коэффициентов регрессии, N – количество SNP						

Исследование промежуточных фенотипов позволило нам обнаружить ассоциацию гипотиреоза с активностью ряда сигнальных молекул, ответственных за

инициацию процессов апоптоза. При этом также было установлено, что экспрессия гена THRB влияет на уровень белков плазмы, ассоциированных с подавлением процессов апоптоза, в частности с протеинами BCL-2 и MAPK2 (таблица 10). BCL-2 является одним из главных белков системы клеточного сигналирования BCL и обладает выраженным антиапоптогенным действием. В исследовании, проведенном Zhao et al. в 2003 г., показано, что увеличение экспрессии Bcl-2 защищает от потери нейронов в пределах пенумбры, а также ингибирует транслокацию цитохрома с и активность каспазы-3. В дальнейшем было показано, что субстанции, усиливающие экспрессию BCL-2, такие как аликсирен и эллаговая кислота, обладают нейропротекторным действием при ИИ (Liu et al., 2017; Miao et al., 2016).

Таблица 10 – Влияние генетически прогнозируемой экспрессии гена THRB на уровни антиапоптогенных факторов, риск развития и неблагоприятного функционального исхода ишемического инсульта

Зависимый показатель	Предиктор	Метод	Beta	Se	p
Bcl-2	Экспрессия THRB (базальные ганглии)	Метод Вальда	0.63	0.24	0.009
MAPK2	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	0.0099
Примечание: Beta – величина эффекта; Se - общая стандартная ошибка оценки величины эффекта; p - p-значение метаанализа с использованием коэффициентов регрессии, N – количество SNP					

Обнаруженное в ходе как клинического, так и менделевского исследования разнонаправленное действие трийодтиронина и тироксина на функциональный исход инсульта позволило предположить клинически значимую роль активности ферментов дейодиназ во влиянии на исход ИИ. Дополнительным подтверждением данной гипотезы является обнаруженная нами влияние экспрессии гена дейодиназы 2 типа на риск лакунарного инсульта ($p=0.0099$), что отражает связь дейодиназ с патологией мелких сосудов мозга. При увеличении экспрессии DIO2 на 1 TMP (1 транскрипт на 1 миллион) в мозжечке риск развития лакунарного инсульта снижается на 11% (ОШ = 0,89; 95% ДИ 0,82 – 0,97). В доступных базах данных мы не идентифицировали достаточного количества инструментальных переменных для анализа непосредственного влияния активности дейодиназ на риск неблагоприятного исхода

ишемического инсульта. Однако, поскольку экспрессия белков дейодиназ контролируется в значительной степени содержанием селена (Шабалина Е.А., 2011; Sonet et al., 2021), мы предположили, что уровень селена может играть роль промежуточного фенотипа. В качестве инструментальных переменных, генетически предсказывающих уровень селена, использовались данные исследования, проведенного Cornelis et al. (2014). Нами были извлечены 14 SNP, независимо предсказывающих уровень селена в ногтевой пластике дистальных фаланг пальцев нижних конечностей. Связь выбранных в качестве инструментальных переменных однонуклеотидных вариаций с промежуточными фенотипами, способными повлиять на тяжесть инсульта была исследована в системе PhenoScanner v2. 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 ИИ на 80% (ОШ=0,2, 95% ДИ 0,1-0,81).

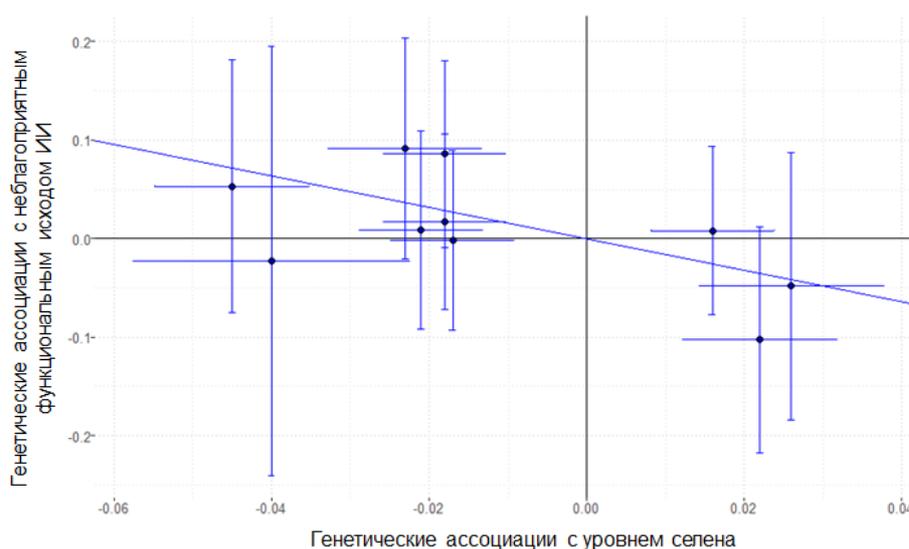


Рисунок 17 – Диаграмма рассеяния, демонстрирующая влияние эффектов SNP, ассоциированных с уровнем селена на эффекты SNP, ассоциированных с риском неблагоприятного функционального исхода ишемического инсульта

Дейодиназы (йодтиронин-5'-дейодиназы типа I и II) – ферменты, катализирующие удаление остатка йода в молекуле тироксина (Т4), превращая ее либо в активную (Т3), либо в неактивную (обратный Т3) форму трийодтиронина. Дейодиназы являются селенсодержащими белками и синтезируются, наряду с еще несколькими селенопротеинами, в щитовидной железе – органе с высоким содержанием селена. Клеточное поглощение различных соединений селена в организме до конца не изучено.

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 селена при комплексном лечении последствий ишемического инсульта в сочетании с препаратами тироксина с целью улучшения исхода заболевания.

Несмотря на то, что влияние тиреоидных гормонов на развитие острой ишемии головного мозга описано в ряде исследований, в настоящее время опубликованы лишь единичные исследования влияния тиреоидного статуса на риск развития и исход геморрагических типов инсульта.

Для определения влияния тиреоидного статуса на риск развития геморрагических типов инсульта было проведено менделевское рандомизационное исследование. В ходе проведенного анализа выявлены генетические ассоциации между повышением уровней св. Т3, св. Т4 и снижением риска обнаружения церебральных микрогеморрагий, интракраниальных аневризм и развития субарахноидального кровоизлияния (таблица 11). Atchaneeyasakul et al. в 2018г. в ходе ретроспективного исследования продемонстрировали, что гипотиреоз ассоциирован с увеличением риска обнаружения неразрывавшихся аневризм по данным церебральной ангиографии в 3.2 раза (95% ДИ 1.3–7.8, $p = 0.01$). Согласно опубликованным данным, гипотиреоз приводит к эндотелиальной дисфункции, повышенному отложению мукополисахаридов внеклеточного матрикса в стенках сосудов (Cherella & Wassner, 2017). Поскольку церебральные аневризмы связаны с потерей целостности артериальной стенки из-за эндотелиальной дисфункции и дезорганизации внеклеточного матрикса, гипотиреоз также может влиять на их образование.

Таблица 11 – 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, N – количество SNP

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 артериопатии).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе многоэтапного исследования, 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. Традиционно исследуемый с целью скрининга тиреоидной патологии тироксин, является кофактором и имеет противоположное воздействие – его высокий уровень ассоциирован с тяжелым течением ИИ. Основа данной ассоциации заключается в следующем уровне регуляции тиреоидного гомеостаза – трансформации в тканях тироксина в его активную форму – трийодтиронин. Нами показано, что генетические маркеры, ассоциированные с уровнем селена – одного из регуляторов активности дейодиназ, влияют на риск лакунарного инсульта и функциональный исход ишемического инсульта. Исследование промежуточных фенотипов методом менделевской рандомизации позволило нам определить, что на уровне модуляции клеточных сигнальных путей влияние тиреоидных гормонов на цереброваскулярные исходы реализуется через подавление проапоптогенных факторов (таких как апоптоз-инициирующий фактор I) и активацию антиапоптогенных сигнальных путей (BCL-2, MAPK2). При этом увеличение экспрессии гена ядерных тиреоидных рецепторов В связано с подавлением активности апоптогенных факторов. Наконец, на клеточном уровне нейротропные эффекты тиреоидных гормонов в головном мозге реализуются через активацию тиронаминами TAAR-рецепторов. Данный процесс сопровождается различными биологическими эффектами, такими как гипотермия, усиленный регресс неврологического дефицита и стимуляцией когнитивных функций.

Полученные данные свидетельствуют о том, что тиреоидные гормоны, прежде всего – трийодтиронин и его 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.

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, превышающие 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 с летальным исходом, 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. 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 момента появления симптомов инсульта. При этом причинный эффект воздействия направлен от уровня свободного трийодтиронина к уровню С-реактивного белка. Полученные данные свидетельствуют о потенцировании

системного воспалительного ответа тиреоидной дисфункцией при остром ишемическом инсульте.

6. В ходе экспериментальной части исследования в модели ишемического инсульта у лабораторных животных установлено, что синтетический аналог тиронамина ТОАМ (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 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 ишемии головного мозга. 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 сутки 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 восстановления.

8. Проведенное менделевское рандомизационное исследование подтверждает причинно-следственное влияние уровня свободного трийодтиронина на функциональный исход ишемического инсульта. 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 ишемического инсульта 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 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 ишемическим инсультом. 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 ишемического инсульта.

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 сумму баллов по Скандинавской шкале тяжести инсульта.

4. Учитывая установленное влияние низкого уровня трийодтиронина на развитие системного воспалительного ответа при ишемическом инсульте, 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, перспективы дальнейшей разработки заключаются в целесообразности проведения клинических исследований, направленных на изучение безопасности и непосредственной эффективности синтетических аналогов трийодтиронина в улучшении функциональных исходов ишемического инсульта.

Учитывая идентифицированные нейропротекторные эффекты селективных лигандов ТААР-рецепторов, необходимы дальнейшие работы по молекулярному дизайну и синтезу новых гетероциклических соединений – потенциальных лигандов ТААР- и АМРА- 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 в качестве церебральных цитопротекторов.

В ходе менделевского рандомизационного исследования выявлены новые молекулярные мишени для потенциальных нейропротекторных препаратов, такие как подавление активности индуцирующего апоптоз митохондриального 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 риск и 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 геморрагиями.

Крайне перспективным в контексте проведенного исследования является новое направление в фармакологии – тераностика, создание фармакологических агентов с лечебными и диагностическими свойствами. В настоящее время нами ведутся исследования по разработке гетероциклических систем – перспективных фотосенсибилизаторов с ядром тиронамина для биологических исследований.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых изданиях ВАК ДНР (статьи)

1. Филимонов Д.А. Взаимоотношения новых биомаркеров высокого риска развития цереброваскулярной патологии и тяжести неврологического дефицита в остром периоде ишемического инсульта [Текст] / Д.А. Филимонов // **Международный неврологический журнал.** – 2014. – № 7 (69). – С. 37-41.
2. 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. (диссертантом лично составлен план и дизайн исследования, организован сбор

клинических данных, самостоятельно проведен статистический анализ, сформулированы выводы, выполнено оформление статьи, подготовлена статья в печать).

3. Моделирование фокальной церебральной ишемии путем окклюзии средней мозговой артерии в дистальной и проксимальной ее частях [Текст] / Д.А. Филимонов, С. К. Евтушенко, Н.Н. Трубникова, М.А. Белоцерковская, В.Г. Самойлов // **Вестник неотложной и восстановительной хирургии.** – 2018. – Т. 3. – № 1. – С. 58-68. (диссертантом лично выполнены подбор и классификация информации, сформулированы выводы, выполнены литературное оформление статьи, подготовка статьи в печать).

4. Терморегуляторные эффекты метаболитов тиреоидных гормонов (тиронамина Т0АМ) в in-vivo эксперименте [Текст] / Д.А. Филимонов, А.Б. Ереско, М.А. Белоцерковская, Н.Н. Трубникова, А.А. Федорова, Т.А. Сауткина // **Вестник неотложной и восстановительной хирургии.** – 2019. – Т. 4. – № 4. – С. 217-225. (диссертантом лично составлен план и дизайн исследования, организован сбор клинических данных, самостоятельно проведен статистический анализ, сформулированы выводы, выполнено оформление статьи, подготовлена статья в печать).

5. Терморегуляторная активность водорастворимого синтетического аналога тиронамина - потенциального нейропротектора [Текст] / Д.А. Филимонов, А.Б. Ереско, Н.Н. Трубникова, М.А. Белоцерковская, А.А. Федорова // **Архив клинической и экспериментальной медицины.** – 2021. – Т. 30. – № 1. – С. 14-19. (диссертантом разработана концепция исследования, составлен дизайн экспериментального исследования, принимал участие в сборе экспериментальных данных, самостоятельно проведен статистический анализ, сформулированы выводы, подготовлена статья в печать).

6. 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. (диссертантом лично составлены план исследования, организован сбор клинических данных, самостоятельно проведен статистический анализ, включая статистическое моделирование, сформулированы выводы, подготовлена статья в печать).

7. Анализ генетических корреляций между тиреоидным статусом, маркерами активности клеточного апоптоза и функциональным исходом ишемического инсульта [Текст] / Д.А. Филимонов, И.С. Луцкий, Н.Н. Трубникова, А.А. Федорова, М.А. Белоцерковская // **Вестник неотложной и восстановительной хирургии.** – 2022 – Т. 7. – № 7. – С. 139-150. (диссертантом лично составлены план и дизайн исследования, организован сбор клинических данных, самостоятельно проведен статистический анализ, включая статистическое моделирование, сформулированы выводы, подготовлена статья в печать).

8. 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. *(диссертантом разработана общая концепция исследования, составлены план и дизайн исследования, проведен анализ генетических баз данных, самостоятельно проведен статистический анализ, сформулированы выводы, подготовлена статья в печать).*

Публикации в изданиях ВАК РФ, SCOPUS (статьи)

9. Евтушенко, С.К. Новые факторы риска развития инсульта у лиц молодого возраста [Текст] / С. К. Евтушенко, Д. А. Филимонов, И. С. Евтушенко // **Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2015. – Т. 115. – № 12-2. – С. 3-12.** *(диссертантом лично выполнены подбор и классификация информации, анализ результатов, составление выводов, литературное оформление статьи, подготовка статьи в печать).*

Публикации в изданиях ВАК Украины (статьи)

10. 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. – No 2. – P. 28-35.** *(диссертантом лично составлены план и дизайн исследования, организован сбор клинических данных, самостоятельно проведен статистический анализ, сформулированы выводы, выполнено оформление статьи, перевод на английский язык, подготовлена статья в печать).*

11. Терморегуляторные эффекты производных трийодтиронина: in vivo исследование и обзор потенциальных нейропротекторных свойств [Текст] / Д.А. Филимонов, Н.Н. Трубникова, М.А. Белоцерковская, А.А. Федорова, А.Б. Ересько, В.В. Марусиченко // **Международный неврологический журнал. – 2020. – Т. 16. – № 1. – С. 65-71.** *(диссертантом лично составлен дизайн экспериментального исследования, принимал участие в сборе экспериментальных данных, самостоятельно проведен статистический анализ, сформулированы выводы, подготовлена статья в печать).*

Публикации в иностранных рецензируемых изданиях (статьи)

12. 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, 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> (Дата обращения 21.10.2022) *(диссертантом лично составлены план и дизайн исследования, организован сбор клинических данных, самостоятельно проведен статистический анализ, сформулированы выводы, выполнено оформление статьи, перевод на английский язык, подготовлена статья в печать).*

Публикации в нерцензируемых иностранных изданиях (статьи)

13. Filimonov, D. Effects of thyroid hormones on the severity and outcome of the ischemic stroke: predictive value and choice of directions for further research [Текст] / D. Filimonov, A. Yeresko, D. Dyuba, Margarita Belotserkovskaya // Materials of the International Conference “Scientific research of the SCO countries: synergy and integration”

- Reports in English. Part 3. (March 26, 2019. Beijing, PRC). – P. 77-88 ISBN 978-5-905695-99-5

Публикации в нерецензируемых изданиях РФ (статьи)

14. Влияние метаболитов тиреоидных гормонов (тиронаминов) на поведенческие реакции белых крыс с ишемией головного мозга в краткосрочном эксперименте [Текст] / Д.А. Филимонов, М.А. Белоцерковская, Н.Н. Трубникова, А.А. Федорова // Соматоневрология: Материалы международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, Ростов-на-Дону, 25 февраля 2020 года / Под редакцией В.А.Балязина, В.В. Ефремова, М.Н. Дмитриева. – Ростов-на-Дону: Ростовский государственный медицинский университет, 2020. – С. 5-21.

Тезисы в иностранных рецензируемых изданиях

15. Filimonov, D. Searching for new risk factors of hemorrhagic transformation after ischemic stroke [Текст] / D. Filimonov, S. Yevtushenko, I. Yevtushenko // European Stroke Organization Congress. 10-12 May 2016. Barcelona, Spain. European Stroke Journal I (IS) 3-612. – P. 162.

16. Yevtushenko, S. Controversies of thyroid dysfunction effects in patients with acute ischemic stroke [Текст] / S. Yevtushenko, D. Filimonov, D. Diuba // Neurologia. – 2017. – V. 26. – P. 109.

17. The relationship between thyroid metabolism and the stroke severity and outcome with a focus on neuroprotection: clinical and experimental study [Текст] / D. Filimonov, S. Yevtushenko, N. Trubnikova, M. Belotserkovskaya, I. Yevtushenko, M. Savoskin, A. Yeresko // Journal of Neurological Sciences. – 2017. – V. 381. – P. 413

18. Impact of serum triiodothyronine on neurological deficit and outcome in acute ischemic stroke and possible in-vivo neuroprotective effects of its novel derivate – thyronamine [Текст] / D. Filimonov, S. Yevtushenko, A. Yeresko, A. Fedorova, N. Trubnikova and M. Belotserkovskaya // The Joint European Stroke Organisation and World Stroke Organization Conference Meeting Abstract. International Journal of Stroke. – 2020. – Vol. 15(1S) 3–752, – P. 426

19. Rationale for initiating feasibility study of triiodothyronine supplementation for stroke patients [Текст] / Dmytro Filimonov, Anna Fedorova, Alexander Yeresko, Margarita Belotserkovskaya, Nadezda Trubnikova // Journal of the Neurological Sciences. – 2021. – Vol. 429. – P. 118731 DOI:10.1016/j.jns.2021.118731

20. Dose-dependent effect of baseline serum triiodothyronine on the probability of favorable stroke outcome [Текст] / D. Filimonov, I. Yevtushenko, A. Fedorova, M. Belotserkovskaya and N. Trubnikova // International Journal of Stroke. – 2021. – Volume 16 Issue 2_suppl.,. – P. 147.

21. Causal effect of free triiodothyronine level on ischemic stroke outcome: a mendelian randomization study [Текст] / D. Filimonov, S. Yevtushenko, A. Fedorova, M. Belotserkovskaya, N. Trubnikova, A. Yeresko // European Stroke Journal –2022. – Vol. 7(1S) 3–545. – P. 442.

22. Mendelian randomization highlights hypothyroidism as a novel risk factor for unfavorable ischemic stroke outcome and elevated serum pro-apoptotic markers [Текст] / D. Filimonov, S. Yevtushenko, A. Fedorova, A. Yeresko, M. Belotserkovskaya, N. Trubnikova // International Journal of Stroke. – 2022. – Vol. 17(3S) 3–288. – P. 71.

Тезисы в рецензируемых изданиях РФ

23. Тиреоидные гормоны и их метаболиты как новый класс эндогенных нейропротекторов при ишемическом инсульте: предварительные результаты клинико-экспериментального исследования [Текст] / Д.А. Филимонов, С.К. Евтушенко, А.Б. Ерьсько, А.В. Землянская // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова: Материалы XI Всероссийского съезда неврологов и IV конгресса Национальной ассоциации по борьбе с инсультом. – 2019. – Т. 119, N 5. – С. 526-527.

Тезисы в рецензируемых изданиях РФ

24. Состояние тиреоидного обмена как новый фактор, влияющий на течение и исход ишемического инсульта [Текст] / Д.А. Филимонов, С.К. Евтушенко, Н.Н. Трубникова, М.А. Белоцерковская, С.Ф. Гараган // Актуальные проблемы неврологии : сборник трудов десятой научно-практической конференции неврологов Северо-Западного федерального округа с международным участием / под ред. А.А.Скоромца, Е.Р. Баранцевича, Г.О. Пениной Сыктывкар: Изд-во СГУ им. Питирима Сорокина. – 2016. – С.132-133.

25. Потенциальные нейропротекторные эффекты тиреоидных гормонов при кардиоэмболическом и атеротромботическом инсульте: сравнительный анализ и клинико-экспериментальное исследование [Текст] / Д.А. Филимонов, С.К. Евтушенко, А.Б. Ерьсько, М.А. Белоцерковская, Н.Н. Трубникова, А.В. Муратов, А.А. Войташ // Материалы III Национального конгресса «Кардионеврология» (Москва, 6-7 декабря 2018 г.). М., 2018. – С. 201.

26. Возможности применения и определение оптимальных доз синтетических аналогов тиронамина как индуктора гипотермии при церебральной ишемии: экспериментальное исследование [Текст] / Д.А. Филимонов, С.К. Евтушенко, А.Б. Ерьсько, Н.Н. Трубникова, М.А. Белоцерковская, А.А. Федорова, Т.Ю. Сауткина // Актуальные проблемы неврологии: сборник материалов тринадцатой научно-практической конференции неврологов Северо-Западного федерального округа Российской Федерации с международным участием. Сыктывкар: Изд-во СГУ им. Питирима Сорокина. – 2020. – С. 117-118

27. Нейропротекторные эффекты синтетических аналогов метаболитов тиреоидных гормонов (тиронаминов) в экспериментальной модели острой церебральной ишемии [Текст] / Д.А. Филимонов, С.К. Евтушенко, А.Б. Ерьсько, Н.Н. Трубникова, М.А. Белоцерковская, А.А. Федорова, Т.Ю. Саткина // Актуальные проблемы неврологии: сборник материалов тринадцатой научно-практической конференции неврологов Северо-Западного федерального округа Российской Федерации с международным участием. Сыктывкар: Изд-во СГУ им. Питирима Сорокина. – 2020. – С. 119-120.

Тезисы в рецензируемых изданиях ДНР

28. Нейропротекторные эффекты тиреоидных гормонов при атеротромботическом инсульте: клинико-экспериментальное исследование [Текст] / Д.А. Филимонов, С.К. Евтушенко, А.Б. Ерьсько, М.А. Белоцерковская, Н.Н. Трубникова, А.В. Муратов, А.А. Войташ Материалы II Международного медицинского форума Донбасса «Наука побеждать ... болезнь» г. Донецк, 14-15 ноября 2018. — С.214.

29. Перспективы использования результатов полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) в медицинских исследованиях [Текст] / Д.А. Филимонов, М.А.

Белоцерковская, Н.Н.Трубникова, А.А. Федорова, Н.Ф. Рыбалка // Международный медицинский форум Донбасса «Наука побеждать... болезнь» 11-12 ноября 2021 года. Университетская клиника. – 2021, приложение II. – С. 483-484.

30. Влияние гипотиреоза на различные компоненты системы клеточного апоптоза: данные исследования по типу менделевской рандомизации [Текст] / Д.А. Филимонов, С.К. Евтушенко, А.А. Федорова, Н.Н. Трубникова, М.А. Белоцерковская, А.Б. Ересько, А.В. Муратов, А.А. Войташ // Международный медицинский форум Донбасса «Наука побеждать... болезнь» 11-12 ноября 2021 года. Университетская клиника. – 2021, приложение II. – С. 484-485.

31. Менделевская рандомизация как перспективный аналитический метод в медицине [Текст] / Д.А. Филимонов, Н.Н. Трубникова, М.А. Белоцерковская, Ал.Г. Попандопуло // Международный медицинский форум Донбасса «Наука побеждать... болезнь» 11-12 ноября 2021 года Университетская клиника. – 2021, приложение II. – С. 485-486.

32. Увеличение экспрессии гена дейодиназы 2 типа в головном мозге ассоциировано с уменьшением риска развития лакунарного инсульта [Текст] / Д.А. Филимонов, Н.Н. Трубникова, М.А. Белоцерковская, А.А. Федорова, А.Б. Ересько // Международный медицинский форум Донбасса «Наука побеждать... болезнь» 11-12 ноября 2021 года Университетская клиника. – 2021, приложение II. – С. 486-487.

33. Генетические варианты, интегрирующие тиреоидный статус с исходом ишемического инсульта [Текст] / Д.А. Филимонов, Н.Н. Трубникова, М.А. Белоцерковская, А.А. Федорова, Д.Ю. Кустов // Международный медицинский форум Донбасса «Наука побеждать... болезнь» 11-12 ноября 2021 года. Университетская клиника. – 2021, приложение II. – С. 487-488.

34. Менделевская рандомизация как перспективный статистический метод выявления причинных эффектов в медицине [Текст] / Д.А. Филимонов, Н.Н. Трубникова, М.А. Белоцерковская, А.А. Федорова, И.Н. Носова // Международный медицинский форум Донбасса «Наука побеждать... болезнь» 11-12 ноября 2021 года Университетская клиника. – 2021, приложение II. – С. 488-489.

АННОТАЦИЯ

Д.А. Филимонов. Влияние тиреоидного гомеостаза на течение и исход острой цереброваскулярной патологии: клиничко-экспериментальное исследование и анализ генетических корреляций. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.11 – нервные болезни. – Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака Министерства здравоохранения Донецкой Народной Республики, Донецк, 2022.

Целью работы является определение характера влияния тиреоидных гормонов, клеточных сигнальных систем, генетических механизмов, формирующих тиреоидный гомеостаз, на тяжесть неврологического дефицита в острый период цереброваскулярной патологии, ее функциональный исход, а также идентификация молекулярных мишеней для воздействия на них с целью улучшения исходов цереброваскулярной патологии. Для реализации поставленной цели было выполнено проспективное клиническое исследование, изучение биологических и нейропротекторных эффектов метаболитов тиреоидных гормонов в

экспериментальной модели инсульта, а также использован аналитический метод исследования генетических корреляций.

В ходе многоэтапного исследования, которое было представлено клиническим этапом, экспериментальным моделированием инсульта и изучением биологической активности синтетического аналога тиронамина, 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. Традиционно исследуемый с целью скрининга тиреоидной патологии тироксин, является кофактором и имеет противоположное воздействие – его высокий уровень ассоциирован с тяжелым течением инсульта. Основа данной ассоциации заключается в следующем уровне регуляции тиреоидного гомеостаза – трансформации в тканях тироксина в его активную форму – трийодтиронин. Нами показано, что генетические маркеры, ассоциированные с активностью дейодиназ, осуществляющих процесс метаболизма тироксина, влияют на риск лакунарного инсульта и функциональный исход ишемического инсульта. Исследование промежуточных фенотипов методом менделевской рандомизации позволило нам 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 I) и активацию антиапоптогенных сигнальных путей (BCL-2, MAPK2). При этом увеличение экспрессии гена ядерных тиреоидных рецепторов В связано с подавлением активности апоптогенных факторов. Наконец, на клеточном уровне нейротропные эффекты тиреоидных гормонов реализуются через активацию тиронаминами TAAR-рецепторов. Данный процесс сопровождается различными биологическими эффектами, такими как гипотермия, усиленный регресс неврологического дефицита и стимуляция когнитивных функций.

Полученные данные свидетельствуют о том, что тиреоидные гормоны, прежде всего – трийодтиронин и его метаболит тиронамин, являются перспективными нейропротекторами при остром ишемическом инсульте

Ключевые слова: инсульт, тиреоидные гормоны, тиронамины, экспериментальная модель инсульта, нейропротекция, менделевская рандомизация.

ABSTRACT

D.A. Filimonov. Influence of thyroid homeostasis on the course and outcome of acute cerebrovascular pathology: a clinical and experimental study and analysis of genetic correlations. – The manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Medicine in the specialty 14.01.11 - nervous diseases. - V.K. Gusak Institute of Urgent and Reparative Surgery, Ministry of Health of the Donetsk People's Republic, Donetsk, 2022.

The aim of this work was to determine the nature of the influence of thyroid hormones, cell signaling systems, genetic and other mechanisms that form thyroid homeostasis on the severity of neurological deficit in the acute period of cerebrovascular pathology, its functional outcome as well as to identify possible molecular targets to modulate them for improving the outcomes of cerebrovascular pathology.

In a multistage study, which was represented by clinical part, experimental modeling of stroke and study of biological activity of thyronamines, mendelian randomization with investigation of the different phenotypes influence on cerebrovascular outcomes, the influence of thyroid homeostasis on severity and outcomes of acute cerebrovascular pathology was proved. This effect is multilevel and multicomponent. The most significant factor in this system is triiodothyronine. It has the greatest clinical significance as an independent predictor for the severity of neurological deficit and outcome of ischemic stroke. Thyroxine, traditionally investigated in screening for thyroid pathology, is a cofactor and has the opposite effect – its high level is associated with the severe course of stroke. The basis of this association lies in the next level of regulation of thyroid homeostasis – the tissue transformation of thyroxine. We have shown that genetic markers associated with the activity of deiodinases influence the risk of lacunar stroke and the functional outcome of ischemic stroke. The study of intermediate phenotypes by Mendelian randomization allowed us to determine that at the level of modulation of cellular signaling pathways, the influence of thyroid hormones on cerebrovascular outcomes is realized through suppression of proapoptogenic factors (such as apoptosis-inducing mitochondrial factor I) and activation of antiapoptogenic signaling pathways (BCL-2, MAPK2). The expression of nuclear thyroid receptor B genes has influence on this process. Finally, at the cellular level, the neurotropic effects of thyroid hormones are realized through the activation of TAAR receptors by thyronamines. This process is accompanied by various biological effects, such as hypothermia, enhanced regression of neurological deficits and stimulation of cognitive functions.

The study suggests that thyroid hormones, primarily triiodothyronine and its metabolite – thyronamine, appear to be promising neuroprotectors in ischemic stroke.

Key words: stroke, thyroid hormones, thyronamines, experimental model of stroke, neuroprotection, Mendelian randomization.

СПИСОК УСЛОВНЫХ 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)

GAD	глутаминовая кислота
GWAS	полногеномный поиск ассоциаций (genome-wide association studies)
МАРК	митоген-ассоциированная протеинкиназа (mitogen associated protein kinase)
MCAO	окклюзия среднемозговой артерии (middle cerebral artery occlusion)
MR	менделевская рандомизация (mendelian randomization)
PV	парвальбумин
SNP	однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism)
SNV	однонуклеотидный вариант (single nucleotide variant)
ТААР	рецептор, ассоциированный со следовыми аминами
tPA	тканевой активатор плазминогена
TR	рецептор к тиреоидным гормонам (thyroid receptor)
АГ	артериальная гипертензия
ГАМК	гамма-аминомасляная кислота
ГПО	глутатион-пероксидаза
ГЭБ	гематоэнцефалический барьер
ДИ	доверительный интервал
ИБС	ишемическая болезнь сердца
ИИ	ишемический инсульт
ОНМК	острое нарушение мозгового кровообращения
ОШ	отношение шансов
СА-Т0АМ	синтетический аналог тиронамина
Св. Т3	свободный трийодтиронин
Св. Т4	свободный тироксин
СОД	супероксиддисмутаза
СРБ	С-реактивный белок
Т0АМ	тиронамин
Т1АМ	3-йодтиронамин
ТБК	тиобарбитуровая кислота
ТГ	тиреоидные гормоны
ТТГ	тиреотропный гормон
ЦНС	центральная нервная система
ЯРТГ	ядерный рецептор тиреоидных гормонов