

На правах рукописи

ЛЯНГ Ольга Викторовна

**ЛАБОРАТОРНЫЕ БИОМАРКЕРЫ В ПРОГНОЗЕ ОСЛОЖНЕНИЙ И
ИСХОДОВ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России

Научные консультанты:

Кочетов Анатолий Глебович
доктор медицинских наук

Стаховская Людмила Витальевна
доктор медицинских наук

Официальные оппоненты:

Ройтман Александр Польевич
доктор медицинских наук, профессор, профессор
кафедры клинической лабораторной диагностики
ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

Иванец Татьяна Юрьевна
доктор медицинских наук, заведующая клинико-
диагностической лабораторией ФГБУ НМИЦ АГП
им. В.И. Кулакова Минздрава России

Гладилин Геннадий Павлович
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой клинической лабораторной
диагностики ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.
И. Разумовского Минздрава России

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Пермский государственный
медицинский университет им. академика Е.А.
Вагнера» Минздрава России

Защита состоится «___» _____ 2019 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.073.05 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15). С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации: <http://cardioweb.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Ускач Татьяна Марковна

Актуальность темы.

Поиск и разработка прогностических и диагностических биомаркеров на сегодняшний день является актуальным научным направлением в медицине (Е.С. Дон, 2017; Т.В. Осипова, 2018). На январь 2019 года в базе данных PubMed найдено более 15 000 публикаций, связанных с биомаркерами. Однако, многие из лабораторных показателей, которые в публикациях названы биомаркерами и факторами риска, не являются таковыми по своей сути, поскольку всего лишь ассоциированы с большей частотой заболеваний, осложнений или неблагоприятных исходов (JL Allinson et al., 2018). Такой ассоциации недостаточно для того, чтобы отнести искомый показатель к диагностическим или прогностическим маркерам, требуется проведение углубленного статистического анализа, который позволит выявить многофакторные взаимосвязи, оценить значимость и рассчитать диагностические или прогностические характеристики теста с обязательным использованием ROC-анализа (F. Dieterle et al, 2010; R.D. Beger et al, 2015).

В настоящее время ведутся исследовательские работы по поиску биомаркеров во всех направлениях медицины, в том числе, в области цереброваскулярной патологии (WT Kao et al, 2018; J Zhang et al, 2018; E Harel et al, 2019). Ишемический инсульт (ИИ), в силу своих эпидемиологических характеристик, несомненно, представляется важным объектом, поскольку помимо высокой летальности, сопровождается значительной частотой инвалидизации, которая в итоге оборачивается значительными экономическими затратами (WHO, 2014; Л.В. Стаховская и др., 2014). У 30-60% пациентов с ИИ развиваются осложнения, такие как пневмония, нарушения деятельности сердца, тромбозы, которые могут сильно ухудшить прогноз течения заболевания (В.И. Ершов и др., 2016). Патогенез этих осложнений позволяет предположить немаловажную роль различных молекулярных агентов. При этом обращает на себя внимание низкое число научных публикаций, в которых использовались бы лабораторные показатели как предикторы или прогностические маркеры течения ИИ.

Таким образом, поиск лабораторных биомаркеров, с помощью которых возможно прогнозирование осложнений и неблагоприятных исходов инсульта остаётся актуальной задачей, поскольку позволит индивидуализировать подход к лечению и реабилитации пациентов.

Степень научной разработанности темы.

Проблема диагностики ишемического инсульта при помощи лабораторных методов практически решена за счет высокочувствительных методов

визуализации, позволяющих верифицировать заболевание на ранних сроках. Однако риски развития различных осложнений, которые встречаются у каждого второго больного и могут приводить к утяжелению состояния или даже летальному исходу, пока оцениваются лишь на основании клинических и анамнестических данных. Перечень лабораторных исследований, выполняемый пациентам с инсультом в соответствии со стандартами оказания медицинской помощи, направлен на оценку общего состояния пациента, то есть выраженности протекающих патофизиологических процессов. При этом не существует лабораторных показателей, по уровню которых можно было бы предсказать риск развития того или иного осложнения, летального исхода, степени функционального восстановления и, в соответствии с полученной информацией, скорректировать схему лечения пациента. Выявление таких показателей позволит также лучше понять механизмы развития ишемического повреждения и развития последующих осложнений.

С учетом вышеизложенного, была сформулирована цель и задачи исследования.

Цель исследования: разработать алгоритм оценки риска развития наиболее частых госпитальных осложнений и исходов ишемического инсульта с использованием лабораторных биомаркеров.

Задачи исследования:

1. Изучить особенности лабораторного профиля в острейшем периоде ишемического инсульта.
2. Оценить значимость лабораторных показателей в прогнозе летального исхода на госпитальном этапе у больных с ишемическим инсультом.
3. Выявить и охарактеризовать лабораторные биомаркеры развития пневмонии и тромботических осложнений у больных с ишемическим инсультом.
4. Изучить взаимосвязь лабораторных показателей с функциональными исходами ишемического инсульта.
5. Исследовать прогностическую значимость лабораторных показателей у больных с ишемическим инсультом при проведении тромбоэкстракции.
6. Определить диагностическую ценность микроРНК при хронической сердечной недостаточности у больных с ишемическим инсультом.
7. Разработать персонифицированный алгоритм формирования групп риска развития осложнений и исходов ишемического инсульта.

Научная новизна работы:

В результате проведенного исследования лабораторного профиля, включающего 77 показателей, у пациентов в острейшем периоде ишемического инсульта установлено, что маркеры протекающих метаболических, коагуляционных, нейрорегенеративных и нейропротективных процессов, запущенных в результате ишемического повреждения, в подавляющем своем большинстве не являются прогностическими биомаркерами осложнений и исходов ишемического инсульта на госпитальном этапе.

Сформирован и охарактеризован паттерн из 9 лабораторных показателей, позволяющих с высокой долей вероятности прогнозировать развитие летального исхода, тромботических осложнений, пневмонии, плохого функционального восстановления у пациентов с ишемическим инсультом. Для расчета риска разработан персонафицированный алгоритм с указанием пороговых значений биомаркеров.

Впервые охарактеризован как независимый прогностический биомаркер летального исхода на госпитальном этапе у больных с ишемическим инсультом сердечный белок, связывающий жирные кислоты (сБСЖК).

Обоснована целесообразность включения в перечень обязательных лабораторных исследований у пациентов с ишемическим инсультом определения концентрации С-реактивного белка как раннего прогностического биомаркера пневмонии и сердечного белка, связывающего жирные кислоты как маркера летального исхода на госпитальном этапе.

Определен биомаркер хорошего функционального восстановления при проведении тромбоэкстракции – тканевой активатор плазминогена (t-РА), который отражает эффективное устранение этиологической причины активации фибринолиза в острейшем периоде ишемического инсульта.

Изучена значимость микроРНК в прогнозе осложнений и исходов ишемического инсульта. Продемонстрирован различный профиль экспрессии микроРНК в слюне и в плазме, что пока не позволяет использовать неинвазивный метод взятия буккального соскоба как альтернативу взятию венозной крови. Обосновано использование в качестве единиц измерения количества копий микроРНК.

Теоретическая и практическая значимость.

Результаты, представленные в работе, позволяют расширить представления о патофизиологических механизмах развития пневмонии и тромботических осложнений в остром периоде ишемического инсульта. Показано, что выраженная компенсаторная активация механизмов пролиферации и дифференцировки клеток вследствие ишемического

повреждения может быть сопряжена с плохим функциональным восстановлением, осложнениями и летальным исходом.

Лабораторные показатели, назначаемые в рамках оказания медицинской помощи, отражают состояние пациента, однако не являются прогностическими биомаркерами, за исключением С-реактивного белка. Включение определения С-реактивного белка в первые сутки от развития инсульта в перечень обязательных лабораторных исследований позволит выявить ранний риск развития пневмонии, снизить который может превентивное назначение антибактериальных препаратов.

Сердечный белок, связывающий жирные кислоты, является независимым предиктором летального исхода на госпитальном этапе у больных с ишемическим инсультом, что подтверждает значимость метаболизма жирных кислот при urgentных состояниях. Полученные результаты позволяют рекомендовать внедрение данного биомаркера в клиническую практику.

Провоспалительный цитокин интерлейкин-6 (ИЛ-6) реализует свои эффекты, находясь еще в интервале референтных значений. Его определение в первые сутки от развития инсульта и сравнение с выявленным пороговым значением позволяет спрогнозировать риск неблагоприятного функционального восстановления и своевременно скорректировать схему терапевтических и реабилитационных мероприятий.

МикроРНК являются важными эффекторами воспалительных и регенеративных процессов, влияющих на развитие осложнений и исходов ишемического инсульта. Полученные прогностические и диагностические характеристики изученных в работе микроРНК обуславливают необходимость регистрации наборов реагентов для их количественного определения.

Разработанный алгоритм оценки риска летального исхода, тромботических осложнений, пневмонии и плохого функционального восстановления позволяет на раннем сроке выделить группы риска пациентов с целью коррекции стандартных схем терапии и реабилитации.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Отклонение лабораторных показателей от референтных интервалов у пациентов с ишемическим инсультом, свидетельствует об активации воспалительных, метаболических, коагуляционных, нейрорегенеративных и нейропротективных процессов, однако не взаимосвязано с риском развития осложнений и неблагоприятных исходов.

2. Независимым биомаркером риска летального исхода на госпитальном этапе у больных с ишемическим инсультом является сердечный белок,

связывающий жирные кислоты. Одновременное снижение уровня сБСЖК и лейкоцитов ниже рассчитанных пороговых значений прогнозирует 100% выживаемость.

3. Простым и доступным исследованием является определение концентрации С-реактивного белка с целью раннего прогноза развития пневмонии, при повышении которого частота возникновения пневмонии увеличивается почти в 6 раз.

4. Дизрегуляция системы гемостаза и подавление механизмов опсонизации продуктов некроза и фибринолиза являются причиной развития тромботических осложнений, риск которых можно оценить на 1 сутки от возникновения инсульта путём измерения концентрации комплекса тканевого активатора плазминогена и его ингибитора (t-РА/РАI-1) и фибронектина.

5. Дополнительное определение концентрации микроРНК на 1 сутки позволяет повысить точность прогноза летального исхода и провести раннюю диагностику хронической сердечной недостаточности как фактора риска неблагоприятного течения ишемического инсульта.

Личный вклад автора в проведенное исследование.

Идея диссертационной работы и ее реализация принадлежат автору. Также автором лично проведен углублённый анализ отечественной и зарубежной научной литературы по тематике исследования, планирование научной работы, подбор лабораторных и статистических методов, выполнение лабораторных исследований, анализ и интерпретация клинических, лабораторных и инструментальных данных, их систематизация, статистическая обработка и описание полученных результатов, написание и оформление основных публикаций по выполненной работе.

Результаты работы были доложены на следующих конференциях: Международная научно-практическая конференция "Многопрофильная клиника XXI века. Высокотехнологичная медицинская помощь", 17 апреля 2014 года, Санкт-Петербург; научно-образовательный форум «Лабораторная медицина России: современные технологии, внедрение новых тестов, организационные проблемы», Симферополь, 27-28 мая 2015; 16 Международный медицинский форум «Качество и безопасность оказания медицинской помощи», Нижний Новгород, 27-29 мая 2015; VIII Всероссийский форум «Вопросы неотложной кардиологии 2015», Москва, 25-27 ноября 2015; XII Всероссийский конгресс «Артериальная гипертензия 2016: Итоги и перспективы», Москва, 23-25 марта 2016; Научно-практическая конференция специалистов Уральского федерального округа «Современная

лабораторная медицина для клинических решений. Уральский форум 2016», Екатеринбург, 20-21 мая 2016; Северо-Западный форум лабораторной медицины «Клинико-лабораторный консилиум», Санкт-Петербург, 22 июня 2016; научно-практическая конференция «Персонализация лабораторных методов диагностики сердечно-сосудистой патологии с применением высоких технологий и информационных систем», Санкт-Петербург, 22 ноября 2018 года; Саратовский форум лабораторной медицины: лабораторная диагностика и организация лабораторной службы в мониторинге сердечно-сосудистых заболеваний, Саратов, 3 марта 2018 года; «Современная лабораторная медицина для клинических решений. Уральский форум 2018», Екатеринбург, 18-19 мая 2018 года; XV Всероссийский конгресс «Артериальная гипертензия 2019: профилактика и лечение», Москва, 13-14 марта 2019.

Внедрение результатов исследования.

Результаты работы внедрены в лечебную практику отделения нейрореанимации ГКБ №31 г. Москвы, используются в процессе преподавания на кафедре медицинской реабилитации ФДПО ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России и на кафедре госпитальной терапии с курсами гематологии, эндокринологии и клинической лабораторной диагностики ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов».

Публикация результатов и апробация работы.

По теме диссертации опубликовано 38 печатных работ, из них 14 статей в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК РФ, из которых 3 статьи – в изданиях, входящих в международную базу данных Scopus. Апробация диссертации состоялась 04 апреля 2019 года на совместном заседании НИИ цереброваскулярной патологии и инсульта и кафедры медицинской реабилитации ФДПО ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Объем и структура диссертации.

Диссертация построена по классическому принципу и состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение), выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы, включающего 268 источников, сгруппированных в соответствии с ГОСТ Р 7.0.11-2011, в порядке упоминания в тексте. Работа изложена на 313 страницах печатного текста, содержит 89 таблиц, 79 рисунков, 2 схемы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика выборки пациентов

В исследование было включено 302 пациента в остром периоде ишемического инсульта, поступивших в ГКБ №31 г. Москвы в период с 2012 по 2018 гг. Работа проводилась в рамках Государственного контракта от 10 марта 2009 года №02.522.11.2018 (грант «Разработка технологии генодиагностики и создание диагностической тест-системы для определения индивидуального генетического риска развития острого инсульта на основании анализа полиморфных ДНК маркеров»).

Критериями включения явились:

1. Острый ИИ, подтвержденный методами нейровизуализации.
2. Поступление в первые сутки от начала развития заболевания.
3. Отсутствие острых и хронических заболеваний в стадии декомпенсации.

Критерии исключения:

1. Геморрагический инсульт.
2. Транзиторная ишемическая атака.
3. Острые и хронические заболевания в стадии декомпенсации.

Выборка была представлена пожилыми пациентами с избыточным весом и сердечно-сосудистой патологией различного рода, с полушарным ишемическим инсультом и состоянием средней степени тяжести (табл.1). Средняя длительность госпитализации составила 25,8 (5-30) дней.

Таблица 1. Общая клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование.

Показатель	Значение
Всего, n (% от N)	302 (100%)
Пол, n (% от N)	Муж 164 (54,3%, 48,7-60%) Жен 138 (45,7%, 40,1-51,3%)
Возраст, лет	69,4 (50-88)
ИМТ, кг/м ²	27,7 (27,0-29,8)
САД, ммрт.ст.	152,1 (Q 139-174)
ДАД, мм рт.ст.	78,6 (Q 74,4-91)
ЧСС, уд./мин.	78,3 (75,4-82,4)
ЧД, в мин.	16 (Q 15-19)
Локализация поражения, n (% от N)	Полушария 284 (94%, 91,1-96,5%) Ствол 18 (6%, 4,7-10,1%)
Сопутствующие заболевания, n (% от N)	Артериальная гипертензия 252 (83,4%, 79-87,4%) ИБС 106 (35,1%, 29,8-40,6%) Нарушения ритма сердца 194 (64,2%, 58,8-69,5%)

Показатель		Значение
	Хроническая сердечная недостаточность	73 (24,2%, 19,5-29,2%)
	Инфаркт миокарда в анамнезе	54 (17,9%, 13,8-22,4%)
	Инсульты в анамнезе	63 (20,9%, 16,5-25,6%)
	Сахарный диабет	66 (21,9%, 17,4-26,7%)
	Заболевания периф. сосудов	29 (9,6%, 6,5-13,2%)
Балл по NIHSS		11,0 (Q6-20)
Объем очага, куб.см.		13,9 (Q 2,8-48,8)
Патогенетический вариант инсульта, n (% от N)	Атеротромботический	93 (28,5%, 23,5-33,7%)
	Кардиоэмболический	85 (27,5%, 22,6-32,7%)
	Другой этиологии	136 (44%, 38,5-50%)

Методы обследования пациентов

Всем пациентам в соответствии с протоколами лечения при поступлении в стационар выполняли компьютерную томографию головного мозга, а также инструментальные и физикальные исследования. Выраженность неврологической симптоматики определяли по шкале инсульта NIHSS при поступлении в отделение реанимации и интенсивной терапии, а затем на 1-е, 2-е, 7-е сутки. В соответствии с данной шкалой выделяли легкую степень тяжести состояния (менее 4 баллов), среднюю степень тяжести (от 5 до 15 баллов) и тяжелую (более 16 баллов). Уменьшение балла по NIHSS на 3 к 7 суткам расценивалось как улучшение состояния, увеличение на 3 и более – как ухудшение.

Степень функционального восстановления оценивали при выписке по модифицированной шкале Рэнкина и индексу Бартел. В качестве критериев стратификации применялись следующие значения по шкале Рэнкина:

- хорошее функциональное восстановление, до 2 баллов;
- плохое функциональное восстановление, 3-5 баллов;

по индексу Бартел:

- хороший функциональный исход, более 75 баллов;
- отсутствие хорошего функционального исхода, 0-75 баллов.

Лекарственная терапия

Всем пациентам проводилась стандартная базисная терапия в соответствии с порядками и стандартами оказания медицинской помощи. По показаниям проводилась специализированная реперфузионная терапия – тромболизис препаратом рекомбинантного тканевого активатора плазминогена (rt-PA) – 99 пациентов (33%), тромбэкстракция – 15 пациентов (5%) или их сочетание – 13 пациентов (4,3%).

Лабораторные исследования

Всем пациентам проводились стандартные лабораторные исследования в соответствии с порядками и стандартами оказания медицинской помощи. Исследования проводились на базе клинико-диагностической лаборатории ГКБ №31. В работе использовались следующие общепринятые референтные интервалы (Клиническое руководство Тица по лабораторным тестам, 2013):

1. Эритроциты, муж $4,5-5,3 \times 10^{12}/л$, жен $4,1-5,1 \times 10^{12}/л$
2. Гематокрит, муж 37-49%, жен 36-46%
3. Гемоглобин, муж 130-160 г/л, жен 120-150 г/л
4. Лейкоциты, $4-9 \times 10^9/л$
5. Тромбоциты, $180-320 \times 10^9/л$
6. Общий белок, 65-85 г/л
7. Билирубин, 5-21 мкмоль/л
8. Креатинин, муж 70-120 мкмоль/л, жен 58-96 мкмоль/л
9. Мочевина, 2,5-8,3 ммоль/л
10. Мочевая кислота, муж 262-452 ммоль/л, жен 137-393 ммоль/л
11. Аспаратаминотрансфераза (АСТ), муж 11-41 Ед/л, жен 11-36 Ед/л
12. Аланинаминотрансфераза (АЛТ), муж 10-41 Ед/л, жен 10-37 Ед/л
13. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ), менее 248 Ед/л
14. Креатинфосфокиназа (КФК), муж до 171 Ед/л, жен до 145 Ед/л
15. Натрий, 135-145 ммоль/л
16. Калий, 3,8-5,2 ммоль/л
17. Глюкоза 3,6-6 ммоль/л
18. Триглицериды, менее 2,26 ммоль/л
19. Холестерин, менее 6,22 ммоль/л
20. Липопротеины высокой плотности (ЛПВП), более 1,55 ммоль/л
21. Липопротеины низкой плотности (ЛПНП), менее 2,85 ммоль/л

Помимо этого, на основании литературных данных были отобраны показатели, которые с учетом их биологической роли могут оказать влияние на течение ИИ и развитие осложнений. Также были отобраны показатели, информация о взаимосвязи которых с ИИ представляется недостаточной или противоречивой. Список таких потенциальных биомаркеров представлен в таблице 2. В качестве референтных использовались значения, указанные производителем, а при отсутствии – по данным доступной литературы.

Таблица 2. Сывороточные показатели, исследованные у пациентов с ишемическим инсультом

№	Показатель	Производитель набора реагентов	Референтные значения, единицы измерения	Биологическая роль
1.	Суфра 21-1 (фрагмент цитокератина 21-1)	Hitachi High-Technologies Corporation	<3,3 нг/мл	Маркер регенерации и пролиферации
2.	D-димер	Technoclone	<250 нг/мл	Маркер активации системы гемостаза
3.	Урокиназа	Technoclone	1,2-2,4 нг/мл	Маркер активации системы гемостаза
4.	Альфа-фетопроtein (АФП)	Hitachi High-Technologies Corporation	<5,8 МЕ/мл	Маркер регенерации и пролиферации
5.	Антитела к миелин-ассоциированному гликопротеину (анти-MAG)	Bühlmann Laboratories AG	<1000 единиц титра	Маркер повреждения нервных клеток
6.	Антитела к окисленным липопротеинам низкой плотности (АТ к оЛПНП)	BiomedicaGruppe	216-448 мЕд/мл	Маркер оксидативного стресса
7.	Антитела к субъединице NR2 рецептора NMDA (АТ к NR2)	CIS Biotech	0,87-2,0 нг/мл	Маркер повреждения нервных клеток
8.	Аполипопротеин а (Аpo(a))	Mercodia	<1044 Ед/л	Маркер активации системы гемостаза
9.	Белок S100	CanAg Diagnostics	<0,09 мкг/л	Маркер повреждения нервных клеток
10.	Витронектин	Technoclone	250-450 мкг/мл	Маркер активации системы гемостаза
11.	Глиальный фибриллярный кислый протеин (GFAP)	BioVendor Laboratory Medicine	< 0,1 нг/мл	Маркер повреждения нервных клеток
12.	Гомоцистеин	Axis	3-16 мкмоль/л	Маркер активации системы гемостаза
13.	Ингибитор активатора пламиногена 1 типа (РАI-1)	Technoclone	7-43 нг/мл	Маркер активации системы гемостаза
14.	Ингибитор протеина С (РСI)	Technoclone	<4 мкг/мл	Маркер активации системы гемостаза
15.	Интерлейкин-6(ИЛ-6)	BenderMedSystems	1,1-14,3 пг/мл	Маркер воспаления и повреждения эндотелия
16.	Комплекс «плазмин-α2-антиплазмин» (РАР-комплекс)	Technoclone	<514 нг/мл	Маркер активации системы гемостаза
17.	Комплекс t-РА/РАI-1	Technoclone	7-20 нг/мл	Маркер активации системы гемостаза
18.	Матриксная металлопротеиназа-13 (ММП-13)	BenderMedSystems	<9,7 пг/мл	Маркер деградации межклеточного матрикса
19.	Матриксная металлопротеиназа-3 (ММП-3)	BenderMedSystems	11-165пг/мл	Маркер деградации межклеточного матрикса

№	Показатель	Производитель набора реагентов	Референтные значения, единицы измерения	Биологическая роль
20.	Матриксная металлопротеиназа-9 (ММП-9)	BenderMedSystems	20-77пг/мл	Маркер деградации межклеточного матрикса
21.	Натрийуретический пропептид С-типа (CNP)	BiomedicaGruppe	Медиана 2,88 пмоль/л	Регулятор сосудистого тонуса
22.	Нейрон-специфичная енолаза (NSE)	CanAg Diagnostics	<13 мкг/л	Маркер повреждения нервных клеток
23.	Нейротрофин-3 (NT-3)	Chemicon	Нет данных	Эндогенная нейропротекция
24.	Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF)	RnD Systems	3,1-21,6 пг/мл	Эндогенная нейропротекция
25.	Нейтрофильная эластаза (НЭ)	BenderMedSystems	29-86 нг/мл	Маркер воспаления и повреждения эндотелия
26.	Неоптерин	IBL	<10 нмоль/л	Маркер воспаления и повреждения эндотелия
27.	Окисленные липопротеиды низкой плотности (оЛПНП)	BiomedicaGruppe	40-65нг/мл	Маркер оксидативного стресса
28.	Плазминоген	Technoclone	60-250мкг/мл	Маркер активации системы гемостаза
29.	Раковый эмбриональный антиген (РЭА)	Hitachi High-Technologies Corporation	<5,0 нг/мл	Маркер регенерации и пролиферации
30.	Растворимая молекула межклеточной адгезии-1 (ICAM-1)	BenderMedSystems	129-297 нг/мл	Маркер воспаления и повреждения эндотелия
31.	Растворимая молекула сосудистой адгезии-1 (VCAM-1)	BenderMedSystems	675-1693 нг/мл	Маркер воспаления и повреждения эндотелия
32.	Растворимый Е-селектин (sE-селектин)	BenderMedSystems	23,0-79,2 нг/мл	Маркер воспаления и повреждения эндотелия
33.	Ренин	UscscnLifeScience	1-128 пг/мл	Регулятор сосудистого тонуса
34.	CA125	Hitachi High-Technologies Corporation	<35 Ед/мл	Маркер регенерации и пролиферации
35.	CA15-3	Hitachi High-Technologies Corporation	<25 Ед/мл	Маркер регенерации и пролиферации
36.	CA19-9	Hitachi High-Technologies Corporation	<27 Ед/мл	Маркер регенерации и пролиферации
37.	CA72-4	Hitachi High-Technologies Corporation	<6,9 Ед/мл	Маркер регенерации и пролиферации
38.	Сердечный белок, связывающий жирные кислоты (сБСЖК)	НВТ	<1600 пг/мл	Маркер повреждения нервных клеток
39.	С-реактивный белок (СРБ)	BenderMedSystems	136-800 мг/л	Маркер воспаления и повреждения эндотелия
40.	Сывороточный амилоид	Invitrogen	10-400 нг/мл	Маркер воспаления и

№	Показатель	Производитель набора реагентов	Референтные значения, единицы измерения	Биологическая роль
	A (SAA)			повреждения эндотелия
41.	Тканевой активатор плазминогена (t-PA)	Technoclone	2-8 нг/мл	Маркер активации системы гемостаза
42.	Тканевой ингибитор металлопротеиназы-1 (TIMP-1)	BenderMedSystems	11-743 нг/мл	Маркер деградации межклеточного матрикса
43.	Тканевой ингибитор металлопротеиназы-2 (TIMP-2)	RnD Systems	23-328 нг/мл	Маркер деградации межклеточного матрикса
44.	Тромбомодулин	Diaclone	2,39-7,9 нг/мл	Маркер активации системы гемостаза
45.	Тромбопоэтин	RnDSystems	<228 пг/мл	Маркер активации системы гемостаза
46.	Фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α)	BenderMedSystems	<5 пг/мл	Маркер воспаления и повреждения эндотелия
47.	Фактор пигментного эпителия (PEDF), нг/мл	Chemicon	Нет данных	Маркер ангиогенеза
48.	Фактор роста фибробластов (FGF)	Biosource	<135 пг/мл	Маркер ангиогенеза
49.	Фибронектин	Technoclone	70-148 мкг/мл	Маркер активации системы гемостаза
50.	Цилиарный (глиальный) нейротрофический фактор (CNTF)	RnD Systems	<8 пг/мл	Эндогенная нейропротекция
51.	Секретируемая фосфолипаза 2 типа (sPLA2)	Cayman Chemical	25-100 пг/мл	Маркер воспаления и повреждения эндотелия
52.	Эндотелин-1 (ЭТ-1)	BiomedicaGruppe	медиана 0,26 фмоль/мл	Регулятор сосудистого тонуса

Уровни вышеперечисленных показателей, за исключением фетальных белков, определяли методом иммуноферментного анализа с использованием микропланшетного спектрофотометра ASYS ExpertPlus. Фетальные белки определяли в сыворотке крови на автоматическом анализаторе Elecsys 2010 (Roche, Япония) электрохемилюминисцентным методом.

Помимо сывороточных маркеров, 86 пациентам, из которых 28 человек были с проведением тромбоэкстракции и 58 - со стандартной терапией, отобранных в подгруппе без реперфузионной терапии методом простой рандомизации, определяли профиль экспрессии микроРНК-16, -21, -125, -126 и 145 в слюне и ЭДТА-плазме на 1 и 4 сутки от развития ИИ. Выделение и обратную транскрипцию микроРНК проводили с использованием наборов Exiqon (Дания) на приборе Applied Biosystems 7900 HT («Applied Biosystems»),

США). Данные по уровню микроРНК нормализовали на исходный объем цельной крови при помощи набора синтетических РНК-транскриптов UniSp6, результат выражали в количестве копий в мл (далее – копий). Затем, согласно рекомендациям ряда исследователей, проводилась дополнительная нормализация количества микроРНК по уровню микроРНК-16, концентрация которой считается относительно стабильной (H Schwarzenbach, 2015; FMP de Candia, 2016).

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводился с учётом принципов надлежащей статистической практики при проведении и учёте данных клинических исследований с использованием программного обеспечения SPSS 18.0, Microsoft Excel 2013. Описательная статистика непрерывных количественных данных после анализа нормальности распределения представлена в виде среднего значения (M) и 95% доверительного интервала через дефис (2,5%-97,5%) при нормальном распределении, или в виде медианы (Md) и значений 25% нижнего и 75% верхнего квартилей с использованием знака Q (Q 25%-75%) при ненормальном распределении. Нормальным принималось распределение, у которого критерий отличия Колмогорова-Смирнова от теоретически нормального распределения был более 0,05. Анализ рисков проводился методом «латинского квадрата» с расчётом отношения шансов и дополнительных рисков. Характеристики качественных или пороговых критических значений количественных переменных (чувствительность, специфичность, точность, правдоподобие) оценивались с использованием таблицы сопряжённости. Также точность количественных тестовых переменных оценивалась рабочей характеристической кривой (ROC-кривой). Выбор точек деления подтверждался оценкой статистической значимости расхождения концентрационных кривых Каплана-Мейера по преваленсу заболевания. Факторный анализ проводился методом главных компонент корреляционной матрицы с учётом веса компонента более единицы и векторного влияния переменной в факторном комплексе (f_r). Значимость переменных в моделях их влияния на бинарные страты исследовалась методом пошагового логистического регрессионного анализа. Поиск лабораторных биомаркеров проводился по следующему алгоритму, представляющему собой систему последовательных фильтров:

1. Выявление лабораторных показателей, значимо различающихся по статистическим критериям между группами.

2. Сопоставление доверительных интервалов выявленных показателей в исследуемых группах.

3. Выделение показателей с наибольшей взаимосвязью с осложнением или исходом ИИ методом факторного анализа (снижение размерности).

4. Выявление статистически значимого показателя методом пошагового регрессионного анализа (идентификация лабораторного биомаркера).

5. Расчет порогового значения биомаркера, его значимости в прогнозе осложнений и исходов ИИ (характеристика лабораторного биомаркера).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка значимости лабораторных показателей в прогнозе летального исхода и осложнений ишемического инсульта

Анализ встречаемости неблагоприятных событий у больных в остром периоде показал, что наиболее часто в исследуемой выборке наблюдались летальный исход (ЛИ) – 87 пациентов (28,8%), пневмония - 82 (27,2%), тромботические осложнения - 32 (10,6%), повторный инсульт - 16 (5,3%), инфаркт миокарда - 7 (2,3%), симптомная геморрагическая трансформация - 6 (2%). Однако, по уровню лабораторных показателей статистически значимые различия были выявлены только по наличию летального исхода, пневмонии и тромботических осложнений.

С целью выявления наиболее информативных маркеров, которые могут обладать значимостью в прогнозе летального исхода, было проведено сравнение показателей у выживших и умерших пациентов. Статистическая значимость была выявлена для 25 лабораторных показателей, для которых был проведён факторный анализ снижения размерности с выводом показателей, имеющих не менее чем средней силы векторное влияние в компоненте. Из них наиболее значимая первая компонента содержит летальный исход, как ведущую переменную с сильным векторным влиянием (табл.3). В этот же факторный комплекс вошли ещё 10 лабораторных показателей, из которых наиболее значимое векторное влияние наблюдалось по сБСЖК.

Исследование у больных с ЛИ вероятности различия уровней выбранных лабораторных показателей по особенностям лечения и причинам летального исхода не выявило статистически значимых различий, поэтому дальнейший анализ результатов исследования был проведён без учёта особенностей лечения и причин смерти.

Таблица 3. Матрица компонент факторного анализа лабораторных показателей, по которым выявлена статистическая значимость развития летального исхода у больных с ишемическим инсультом при использовании статистических критериев.

Показатель	Компонента 1	Компонента 2
ЛИ	0,725	
сБСЖК	0,473	
ЛДГ	0,442	
Ренин	0,418	
ИЛ-6	0,395	
Лейкоциты	0,393	
sPLA2	0,389	
Глюкоза	0,320	
Белок S100	0,308	
GFAP	0,304	
Неоптерин	0,302	
sE-селектин		0,473
Мочевина		0,442
ЛПНП		0,418
VCAM-1		0,395
NSE		0,307
Холестерин		0,306
t-PA		
ЭТ-1		
Гомоцистеин		
СРБ		
РАI-1		
BDNF		
PEDF		
CA125		
Cyfra21-1		

ROC-анализ значений сБСЖК по наличию ЛИ подтвердил прогностическую значимость данного маркера – кривая значимости прошла выше опорной линии характеристического квадрата (рис.1). Площадь под характеристической кривой составила $0,776 \pm 0,061$ (95%ДИ 0,655-0,896) при $p < 0,001$, пороговое значение концентрации сБСЖК составило 2757,25 пг/мл с чувствительностью 80% и специфичностью 74,4%. Отношения шансов ЛИ по указанной концентрации сБСЖК при использовании таблицы сопряженности составило 11,6 (95ДИ 3,68-36,5). Кривые Каплана-Мейера по группам наличия и отсутствия ЛИ показали статистически значимое расхождение для пациентов с концентрацией сБСЖК до и после пороговой точки прогноза ЛИ (рис.2).

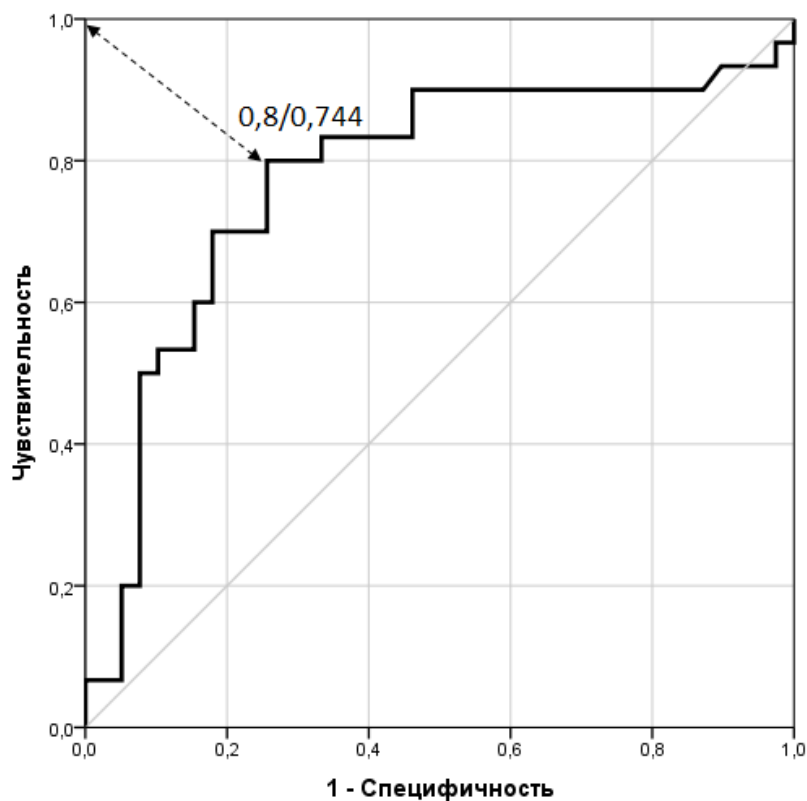


Рисунок 1. Характеристическая кривая концентрации сБСЖК по летальному исходу.

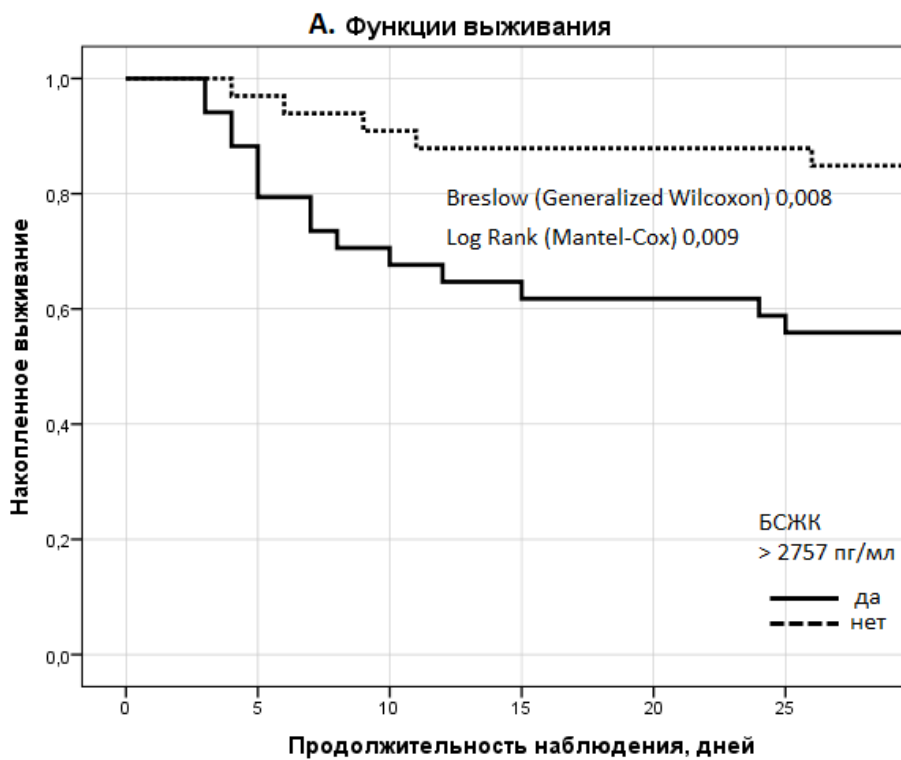


Рисунок 2. Кривые выживаемости Каплана-Мейера в зависимости от концентрации сБСЖК.

Несмотря на то, что методами описательной статистики наиболее значимым показателем был выявлен сБСЖК и соответствующим образом охарактеризован, необходимость повышения значимости биомаркёрного исследования требует дополнительного анализа отобранных выше биомаркёров, которые могут при совместном использовании с сБСЖК повысить чувствительность и специфичность прогноза ЛИ.

С целью выбора наиболее значимых показателей и сведения их в единый прогностический показатель был проведён пошаговый логистический регрессионный анализ, представленный в таблице 4. Концентрация лейкоцитов и сБСЖК оказались наиболее значимыми биомаркёрами в прогнозе ЛИ у больных с ИИ при уровне, превышающем $9,45 \times 10^9/\text{л}$ и 2757 пг/мл соответственно.

Таблица 4. Результаты пошагового логистического регрессионного анализа лабораторных показателей, по которым выявлена значимость развития летального исхода у больных с ишемическим инсультом при использовании статистических критериев.

Шаг	Показатель	В	Среднеквадратичная ошибка	Вальд	Знач.	Exp (В)	95% доверительный интервал для EXP(В)	
							Нижняя граница	Верхняя граница
Шаг 1	сБСЖК	0,163	0,998	0,027	0,037	1,177	0,166	8,326
	Лейкоциты	1,571	0,771	4,147	0,042	4,812	1,061	21,827
	ЛДГ	0,850	0,662	1,646	0,199	2,340	0,639	8,570
	Глюкоза	-0,657	0,622	1,114	0,291	0,518	0,153	1,756
	Ренин	-0,936	0,671	1,944	0,163	0,392	0,105	1,462
	Неоптерин	-0,745	0,600	1,541	0,214	0,475	0,147	1,539
	ИЛ-6	0,425	0,677	0,394	0,530	1,529	0,406	5,765
	sPLA2	0,270	0,654	0,170	0,680	1,310	0,363	4,721
	Белок S100	-1,099	1,155	0,905	0,341	0,333	0,035	3,205
	GFAP	0,000	1,414	0,000	1,000	1,000	0,063	15,988
Шаг 7	сБСЖК	0,875	0,376	5,410	0,020	2,400	1,148	5,019
	Лейкоциты	0,944	0,445	4,496	0,034	2,571	1,074	6,156

Прогностическая ценность положительного результата (ПЦПР) сБСЖК в прогнозе летального исхода составила 71%, прогностическая ценность отрицательного результата (ПЦОР) составила 83%. ПЦПР и ПЦОР для лейкоцитов составила 52% и 86% соответственно.

Полученные в исследовании данные также показали, что сБСЖК является независимым фактором риска ЛИ у больных с ИИ, его взаимосвязи с сердечно-сосудистыми заболеваниями, с инсультом и транзиторными ишемическими атаками в анамнезе были слабой силы и статистически незначимы (рис.3). Независимость данного маркера обусловлена, вероятно, его более глобальным отражением состояния организма, тем, что его концентрация зависит от количества повреждённых клеток, являющихся источником сБСЖК, то есть, взаимосвязана с процессами, влияющими на жизнедеятельность клеток, в том числе, с активностью воспалительных процессов, ответной реакцией эндотелия, выраженностью окислительного стресса, выраженностью системных и клеточных метаболических изменений.

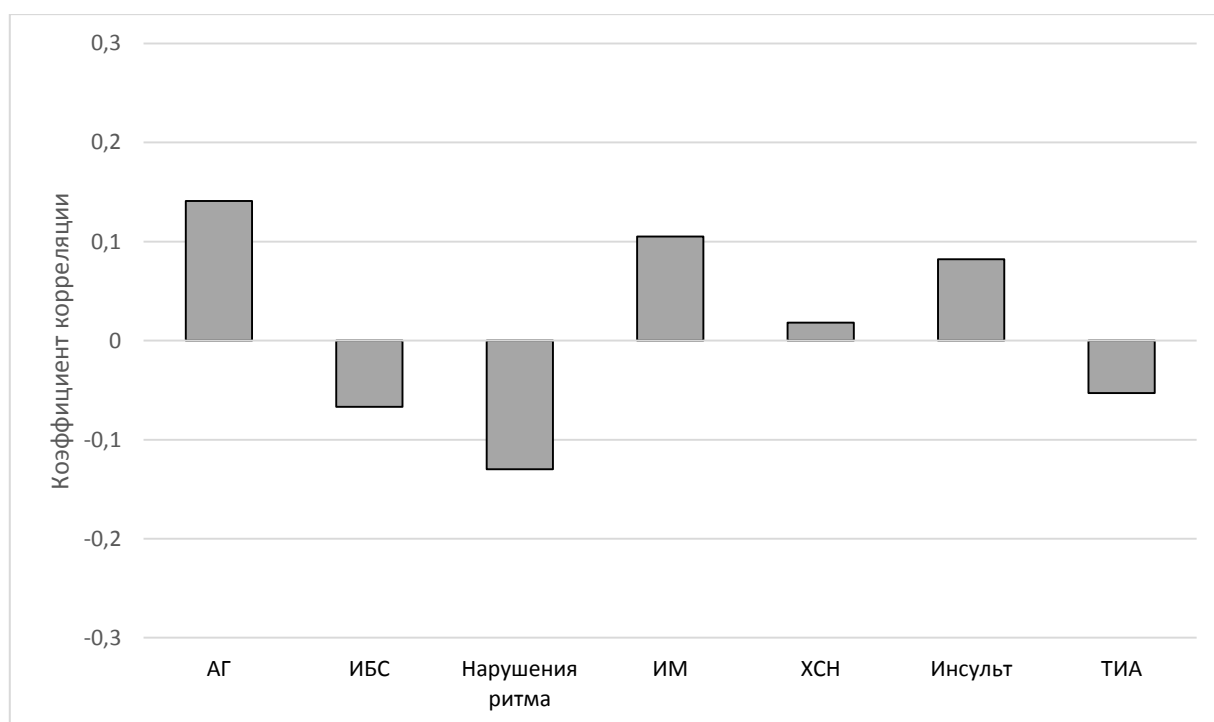


Рисунок 3. Взаимосвязь сБСЖК с сердечно-сосудистыми заболеваниями в анамнезе у пациентов с ишемическим инсультом.

Выраженное повышение значимости прогноза риска отсутствия ЛИ достигается путём совместного использования результатов исследования концентрации сБСЖК и концентрации лейкоцитов. При концентрации сБСЖК менее 2757 пг/мл и концентрации лейкоцитов менее $9,45 \cdot 10^9$ /л кривые выживаемости и риска Каплана-Мейера демонстрируют нулевую вероятность ЛИ у больных с ИИ. ПЦПР и ПЦОР для сБСЖК и лейкоцитов ниже пороговых значений составила 52% и 100% соответственно. Среднее значение для времени выживаемости при концентрации сБСЖК более 2757 пг/мл и концентрации лейкоцитов более $9,45 \cdot 10^9$ /л составило 17,8 (95%ДИ 12,4-23,1) дней (рис.4).

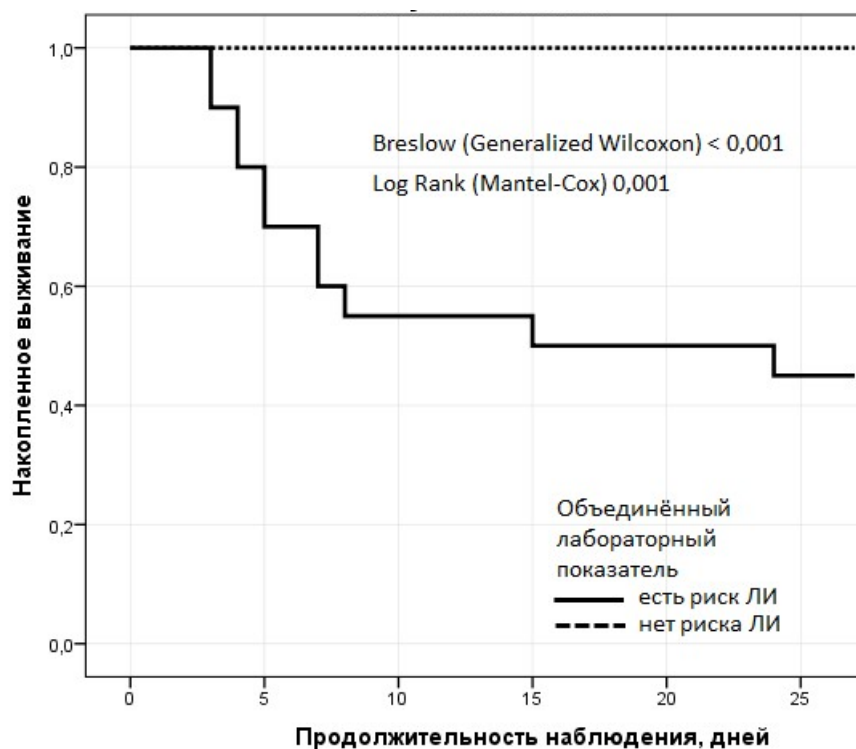


Рисунок 4. Кривые выживаемости Каплана-Мейера в зависимости от значения объединённого лабораторного показателя.

Наличие концентраций маркёров ниже пороговых значений, вполне вероятно, может служить индикатором возможности применения более активных реабилитационных мероприятий без опасения получить какие-либо осложнения со стороны сердечно-сосудистой и иммунной системы.

Для определения прогностической ценности теста в популяции с конкретным преваLENсом неблагоприятного события может быть полезен наглядный график, отражающий зависимость прогностической ценности от преваLENса. По данным различных авторов, частота летального исхода при ИИ может составлять от 10 до 35% в зависимости от тяжести состояния поступающих пациентов и условий оказания медицинской помощи (О.С. Стародубцева, 2012). Соответственно, ПЦПР сБСЖК при указанном преваLENсе составляет 31,4-68,9%, ПЦОР 96,2-84%, прогностическая эффективность 81,6-78,6% (рис. 5). По мере увеличения преваLENса ЛИ при ИИ увеличивается ПЦПР и снижается ПЦОР.

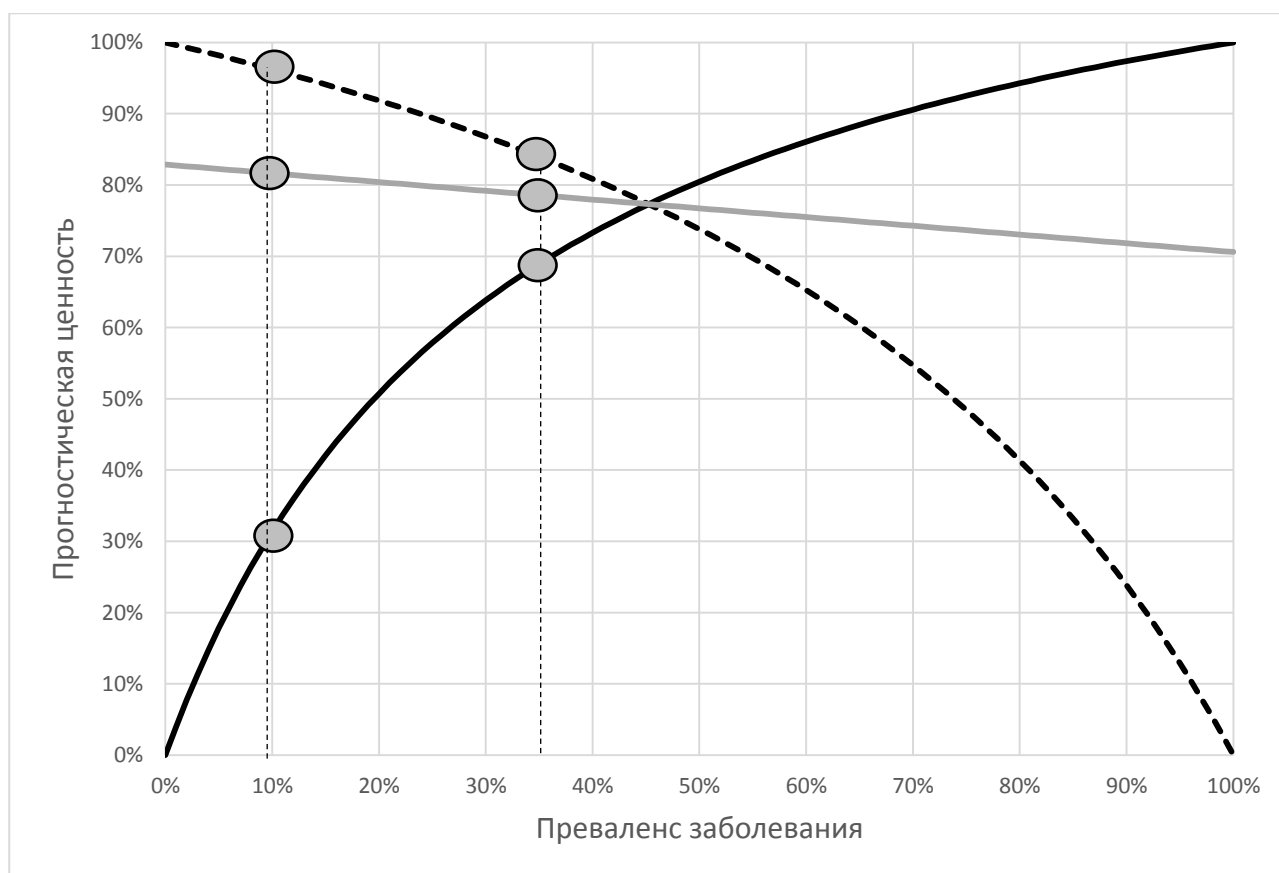


Рисунок 5. Характеристики теста сБСЖК с пороговым значением более 2757 пг/мл по развитию ЛИ у больных с ИИ. Сплошная чёрная жирная линия – ПЦПР (более 2757 пг/мл), прерывистая черная жирная линия – ПЦОР (равно или менее 2757), сплошная серая жирная линия – прогностическая точность, прерывистые чёрные тонкие линии – обозначение диапазона преваленса по данным литературы.

Аналогичным образом был проведен поиск прогностических лабораторных биомаркеров пневмонии и тромботических осложнений.

Медиана развития тромботических осложнений у пациентов с ЛИ составила 7 (95%ДИ 4,92-9,1) дней. Риск ЛИ при развитии тромбоза повышался в 69,3 раза при статистической значимости $p < 0,001$. Было выявлено, что значимостью в прогнозе тромботических осложнений обладают комплекс t-РА/РАI-1 и фибронектин.

Площадь под характеристической кривой в прогнозе развития тромботических осложнений для комплекса t-РА/РАI-1 составила 0,772 (95%ДИ 0,566-0,978, $p = 0,029$). Характеристическая кривая комплекса t-РА/РАI-1 в прогнозе развития тромботических осложнений представлена на рисунке 6.

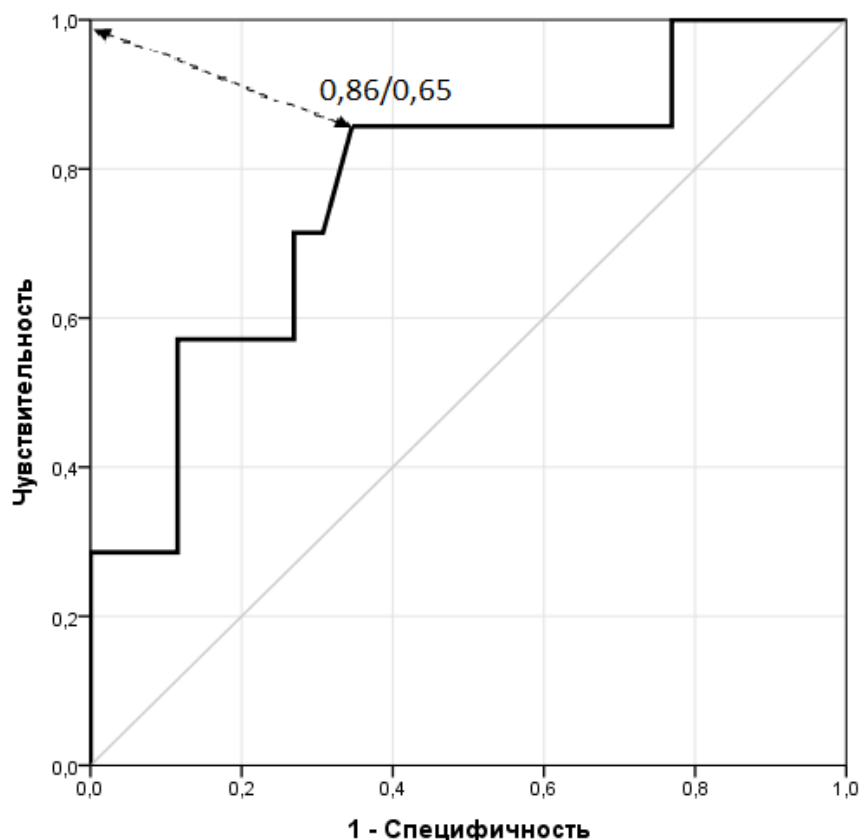


Рисунок 6. Характеристическая кривая концентрации комплекса t-PA/PAI-1 в прогнозе развития тромботических осложнений.

Пороговое значение по координатам характеристической кривой было в пределах референтных значений и составило 14,1 нг/мл с чувствительностью 85,7% и специфичностью 65,4%. ПЦПР комплекса t-PA/PAI-1 в прогнозе развития тромботических осложнений составила 32%, ПЦОР – 93%. Риск развития тромботических осложнений при концентрации комплекса t-PA/PAI-1 более 14,1 нг/мл, рассчитанный по таблице сопряжённости, составил ОШ 11,3 (95%ДИ 1,18-109,3, $p=0,03$).

Площадь под характеристической кривой в прогнозе отсутствия тромботических осложнений для фибронектина составила 0,756 (95%ДИ 0,642-0,870, $p=0,001$). Пороговое значение по координатам характеристической кривой было ниже референтного значения и составило 61,2 мкг/мл с чувствительностью 67% и специфичностью 65%. ПЦПР концентрации фибронектина в прогнозе отсутствия тромботических осложнений составила 26%, ПЦОР – 93%. Риск развития тромботических осложнений при концентрации фибронектина более 61,2 мкг/мл, рассчитанный по таблице сопряжённости, составил ОШ 0,229 (95%ДИ 0,078-0,673, $p=0,011$), вероятность

отсутствия тромботических осложнений при концентрации фибронектина более 61,2 мкг/мл составила 4,38 (95%ДИ 1,49-12,9, $p=0,011$).

Преваленс тромботических осложнений при ИИ составляет по данным литературы 0,7-10-20-50% (В.А. Парфенов, 2012). ПЦПР для теста Фибронектин с пороговым значением менее 61,2 мкг/мл при указанных преваленсах составляет 3,41-28-46,6-77,7%, ПЦОР 99,2-91,9-83,4-55,6%, прогностическая эффективность 92,5-85,9-79,2-59,4%. По мере увеличения преваленса тромботических осложнений при ИИ увеличивается ПЦПР и снижается ПЦОР. Для теста комплекс tРА/РАI-1 с пороговым значением более 14,1 нг/мл ПЦПР при указанных преваленсах составляет 3,41-28-46,6-77,7%, ПЦОР 99,2-91,9-83,4-55,6%, прогностическая эффективность 92,5-85,9-79,2-59,4%. По мере увеличения преваленса тромботических осложнений при ИИ увеличивается ПЦПР и снижается ПЦОР.

Обоснование значимости выявленных в исследовании лабораторных биомаркёров тромботических осложнений, фибронектина и комплекса t-РА/РАI-1, может заключаться в том, что при тромбозах наблюдается недостаточность механизма перевода свободного активного РАI-1 в латентное состояние, на фоне активного использования фибронектина, приводящего к его истощению и дестабилизации фибринолиза из-за накопления дериватов фибрина, что, в конечном итоге, завершается тромбозом, обусловленным, прежде всего, нарушением процессов активации фибринолитического звена гемостаза.

Было выявлено, что значимостью в прогнозе развития пневмонии обладают концентрации тромбоцитов, ИЛ-6, мочевины, СРБ и КФК. Медиана дожития по наличию пневмонии составила 15 (95%ДИ 6,93-28,6) дней.

Площадь под характеристической кривой в прогнозе отсутствия пневмонии для концентрации тромбоцитов составила 0,601 (95%ДИ 0,505-0,698, $p=0,045$). Пороговое значение по координатам характеристической кривой было в пределах референтных значений и составило $222,5 \times 10^9/\text{л}$ с чувствительностью 60,9% и специфичностью 63,9%. ПЦПР концентрации тромбоцитов в прогнозе отсутствия пневмонии составила 36%, ПЦОР – 83%. Риск развития пневмонии при концентрации тромбоцитов менее $222,5 \times 10^9/\text{л}$, рассчитанный по таблице сопряжённости, составил ОШ 2,73 (95%ДИ 1,34-5,55, $p=0,005$).

Площадь под характеристической кривой в прогнозе развития пневмонии для концентрации ИЛ-6 составила 0,747 (95%ДИ 0,655-0,839, $p<0,001$) (рис.7).

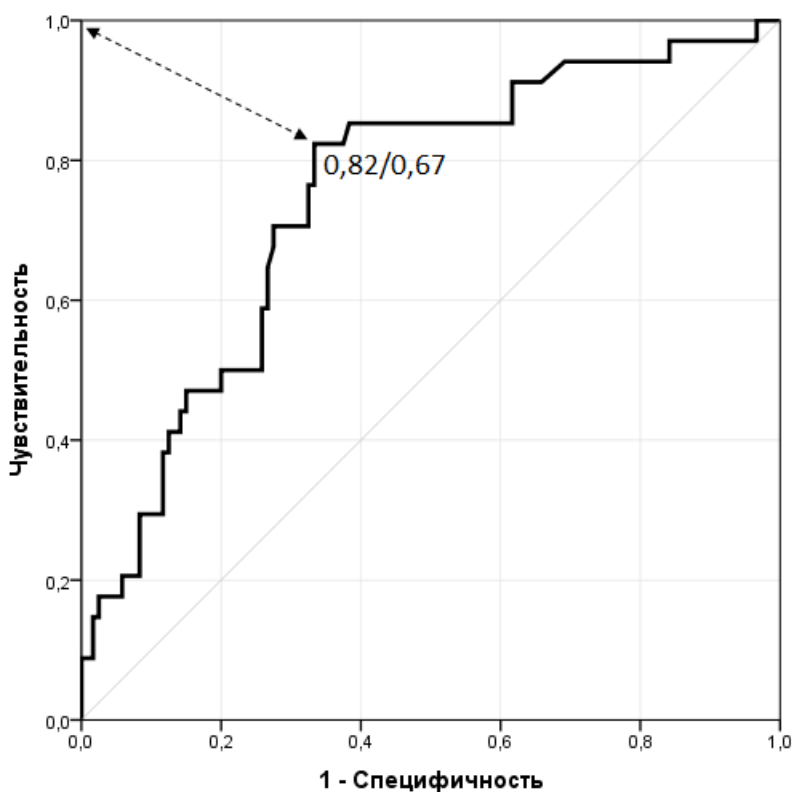


Рисунок 7. Характеристическая кривая концентрации ИЛ-6 по наличию пневмонии.

Пороговое значение по координатам характеристической кривой было в пределах референтных значений и составило 3,45 пг/мл с чувствительностью 82,4% и специфичностью 66,7%. ПЦПР концентрации ИЛ-6 в прогнозе развития пневмонии составила 40%, ПЦОР – 92%. Риск развития пневмонии при концентрации ИЛ-6 более 3,45 пг/мл, рассчитанный по таблице сопряженности, составил ОШ 7,71 (95%ДИ 3,09-19,24, $p < 0,001$).

Площадь под характеристической кривой в прогнозе развития пневмонии по уровню мочевины составила 0,744 (95%ДИ 0,660-0,827, $p < 0,001$). Пороговое значение по координатам характеристической кривой было в пределах референтных значений и составило 6,45 ммоль/л с чувствительностью 74,5% и специфичностью 66,9%. ПЦПР концентрации мочевины в прогнозе развития пневмонии составила 45%, ПЦОР – 88%. Риск развития пневмонии при уровне мочевины более 6,45 ммоль/л, рассчитанный по таблице сопряженности, составил ОШ 5,9 (95%ДИ 2,79-12,5, $p < 0,001$).

Площадь под характеристической кривой в прогнозе развития пневмонии по концентрации СРБ составила 0,677 (95%ДИ 0,572-0,783, $p = 0,001$) (рис.8). Пороговое значение по координатам характеристической кривой выше референтных пределов и составило 1640,4 мг/л с чувствительностью 65,8% и

специфичностью 74,8%. ПЦПР концентрации СРБ в прогнозе развития пневмонии составила 45%, ПЦОР – 80%. Риск развития пневмонии при концентрации СРБ более 1640 мг/л, рассчитанный по таблице сопряженности, составил ОШ 5,71 (95%ДИ 2,61-12,5, $p < 0,001$).

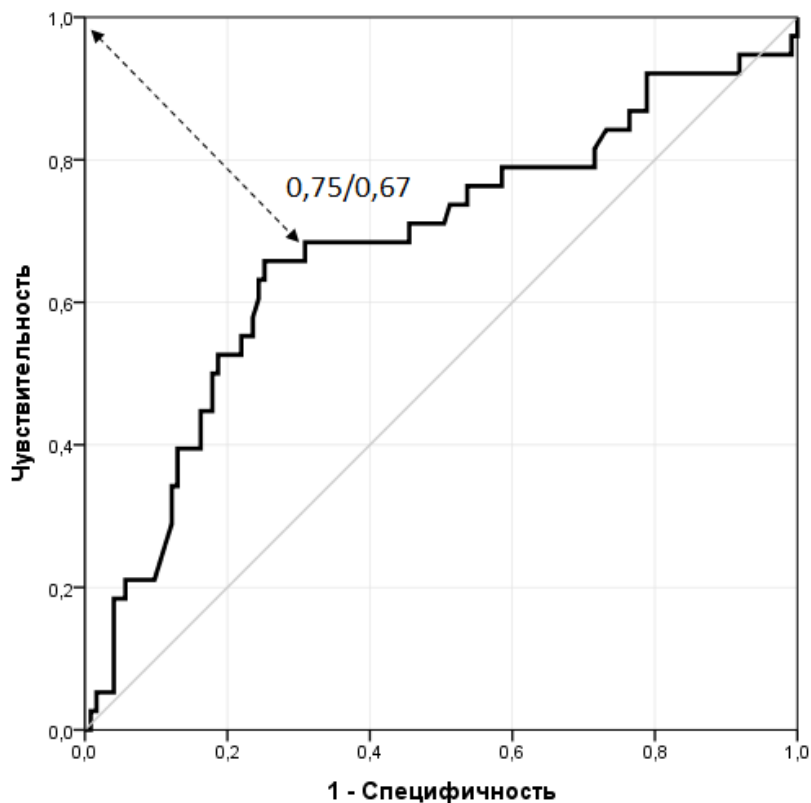


Рисунок 8. Характеристическая кривая концентрации СРБ по наличию пневмонии.

Площадь под характеристической кривой в прогнозе развития пневмонии по активности КФК составила 0,608 (95%ДИ 0,508-0,708, $p = 0,031$). Пороговое значение по координатам характеристической кривой выше референтных пределов и составило 230,5 Ед/л с чувствительностью 46,7% и специфичностью 74,4%. ПЦПР активности КФК в прогнозе развития пневмонии составила 39%, ПЦОР – 80%. Риск развития пневмонии при активности КФК более 230,5 Ед/л составил ОШ 2,55 (95%ДИ 1,26-5,16, $p = 0,014$).

Преваленс пневмонии при ИИ составляет по данным литературы 26-50-62% (Е.А. Попова, 2007). Соответственно, для теста СРБ с пороговым значением более 1640,4 мг/л ПЦПР при указанных преваленсах составляет 55,9-78,3-85,5%, ПЦОР 81,8-61,3-49,2%, прогностическая эффективность 76,5-66,1-61%. По мере увеличения преваленса пневмонии при ИИ увеличивается ПЦПР и снижается ПЦОР. Для теста ИЛ-6 с пороговым значением более 3,48

пг/мл ПЦПР при указанных преваленсах составляет 63,8-83,4-89,1%, ПЦОР 81,4-60,6-48,6%, прогностическая эффективность 78,5-66,1-59,9%. По мере увеличения преваленса пневмонии при ИИ увеличивается ПЦПР и снижается ПЦОР. Для теста Тромбоциты с пороговым значением менее $222,5 \times 10^9/\text{л}$ ПЦПР при указанных преваленсах пневмонии составляет 42,6-67,8-77,5%, ПЦОР 78,7-56,4-44,2%, прогностическая эффективность 70,7-59,4-53,8%. По мере увеличения преваленса пневмонии увеличивается ПЦПР и снижается ПЦОР. Соответственно, для теста КФК с пороговым значением более 230,5 Ед/л ПЦПР при указанных преваленсах составляет 40,6-66-76%, ПЦОР 78,8-56,7-44,5%, прогностическая эффективность 69,3-59,4-54,5%. По мере увеличения преваленса пневмонии при ИИ увеличивается ПЦПР и снижается ПЦОР. Для теста Мочевина с пороговым значением более 6,45 ммоль/л ПЦПР при указанных преваленсах составляет 40,6-66-76%, ПЦОР 78,8-56,7-44,5%, прогностическая эффективность 69,3-59,4-54,5%. По мере увеличения преваленса пневмонии при ИИ увеличивается ПЦПР и снижается ПЦОР.

Выявление как биомаркёров развития пневмонии тех молекул, которые являются в организме активными участниками воспалительных процессов – ИЛ-6, СРБ, закономерно с точки зрения их биологической роли при воспалении и обусловлено ранней их активацией до развития симптомов пневмонии, то есть, предрасположенностью, вызванной, возможно, уже имеющимися воспалительными процессами.

Тромбоциты тоже, как известно, участвуют в процессах воспаления, являясь источником веществ, которые регулируют или опосредуют воспалительные реакции. Также при воспалении образуются и выделяются из различных клеток медиаторы, которые активируют тромбоциты. Всё перечисленное вызывает активное вовлечение тромбоцитов в воспалительные реакции, предшествующие их клиническому проявлению, что, соответственно, приводит к потреблению тромбоцитов, которое можно назвать «субклиническим потреблением» и которое проявляется снижением концентрации тромбоцитов до нижнего предела референтного интервала.

Повышение КФК и мочевины, вероятно, отображают усиление катаболизма белков вследствие субклинических воспалительных процессов, сопровождающих ранний период ишемического инсульта.

Оценка значимости лабораторных показателей в прогнозе функциональных исходов ишемического инсульта

Поиск лабораторных биомаркеров прогноза динамики тяжести ИИ позволил выявить 7 наиболее значимых показателей: лейкоциты, креатинин,

мочевину, t-PA, ММП-9, PAI-1, СА15-3. Факторный анализ показал, что наиболее связанным с динамикой степени тяжести инсульта является СА15-3 в обратной зависимости – улучшение состояния по шкале тяжести инсульта NIHSS ассоциируется с меньшими значениями данного показателя. Белок СА-15-3 является участником межклеточных взаимодействий, в том числе, гематоэнцефалического барьера и клеток мозга, от динамики состояния которых во многом зависит динамика неврологического статуса, что объясняет взаимосвязь данного белка со шкалой оценки неврологического статуса NIHSS. Однако анализ характеристической кривой не подтвердил значимость СА15-3 для прогноза динамики степени тяжести ИИ по шкале NIHSS - кривая практически наложилась на диагональную опорную линию характеристического квадрата, площадь под характеристической кривой составила 0,563 (95%ДИ 0,459-0,667) со статистической незначимостью $p=0,244$.

В качестве прогностического маркера хорошего функционального исхода по шкале Рэнкина был выявлен показатель TIMP-2. Анализ характеристической кривой позволил выявить пороговое значение TIMP-2, которое составило 270 нг/мл при низкой чувствительности 47,5% и высокой специфичности 84,4%. ПЦПР TIMP-2 в прогнозе хорошего функционального исхода по шкале Рэнкина составила 79%, ПЦОР – 56%. Площадь под характеристической кривой составила 0,645 (95%ДИ 0,518-0,772, $p=0,036$). Отношение шансов вероятности хорошего исхода при концентрации TIMP-2 более 270 нг/мл при использовании для расчётов таблицы сопряжённости составило 4,89 (95%ДИ 1,57-15,3) при статистической значимости $p^{\chi^2}=0,006$.

Взаимосвязь хорошего функционального восстановления по шкале Рэнкина с концентрацией TIMP-2 свидетельствует о значимости раннего ингибирования металлопротеиназ, образующихся в результате некроза клеток в ишемизированной зоне и расширяющих зону некроза, и коллаген-зависимой репарации при ИИ - сохранения субстрата для восстановления ткани, прежде всего коллагена, который активно лизируется тканевыми металлопротеиназами. Вполне вероятно, что создание лекарственных препаратов на основе TIMP-2 и коллагенов и их применение в острейшем периоде ИИ будет способствовать более эффективной и быстрой реабилитации больных с ИИ.

Статистическую значимость в прогнозе развития средней и тяжелой степени инвалидизации по индексу Бартел показал ИЛ-6. Анализ характеристической кривой позволил выявить пороговое значение ИЛ-6, которое составило 2,94 пг/мл при низкой чувствительности 57,5% и средней

специфичности 70,7%. ПЦПР составила 58%, ПЦОР – 71%. Это свидетельствует о том, что при повышении концентрации данного биомаркёра более 2,94 пг/мл сложно предсказать выраженную инвалидизацию исход, но при снижении менее указанного порога - плохого исхода у 70,7% пациентов не будет. Площадь под характеристической кривой составила 0,630 (95%ДИ 0,517-0,744, $p=0,029$). Таким образом, прослеживается взаимосвязь между выраженностью воспалительных реакций и функциональным восстановлением.

Оценка значимости лабораторных показателей у пациентов с ишемическим инсультом при проведении тромбоэкстракции

В работе отдельно анализировались результаты лабораторных исследований в группе из 86 пациентов, в которую вошли 28 пациентов с тромбоэкстракцией и 58 пациентов без тромбоэкстракции и тромболитической терапии, которых отбирали из выборки пациентов только со стандартной терапией методом простой рандомизации. Лабораторные тесты для исследования в динамике были выбраны перед началом исследования из наиболее перспективных в качестве прогностических групп маркёров по результатам литературного обзора, поэтому их перечень не соответствовал перечню прогностически значимых маркёров, полученным в результате исследования, проведённого по оценке значимости исходных значений маркёров. Дополнительно на 4 сутки проводилось исследование рутинных лабораторных показателей, а также уровней белка S100, витронектина, фибронектина, t-PA, D-димера, PCI, PAI, NSE, TIMP-2, тромбомодулина, GFAP, ММП-9, НЭ. Оценивалась динамика показателей в абсолютных значениях и долях от исходного уровня.

Группы пациентов, отобранные для исследования, согласно доверительным интервалам показателей клинической характеристики, были репрезентативны, статистической значимости различий по доверительным интервалам не выявлено. Однако наблюдалась тенденция большего объёма очага поражения, большей тяжести состояния по NIHSS, большей частоты инсультов в анамнезе и меньшей частоты заболеваний периферических сосудов у пациентов с тромбоэкстракцией. При этом по количеству пациентов с летальным исходом ($n=22$) и тромботическими осложнениями ($n=14$) за весь период госпитализации между группами без тромбоэкстракции (ЛИ $n=14$, тромбоэмболия $n=8$) и с тромбоэкстракцией (ЛИ $n=8$, тромботические осложнения $n=6$) статистически значимых различий не выявлено (рис.9).

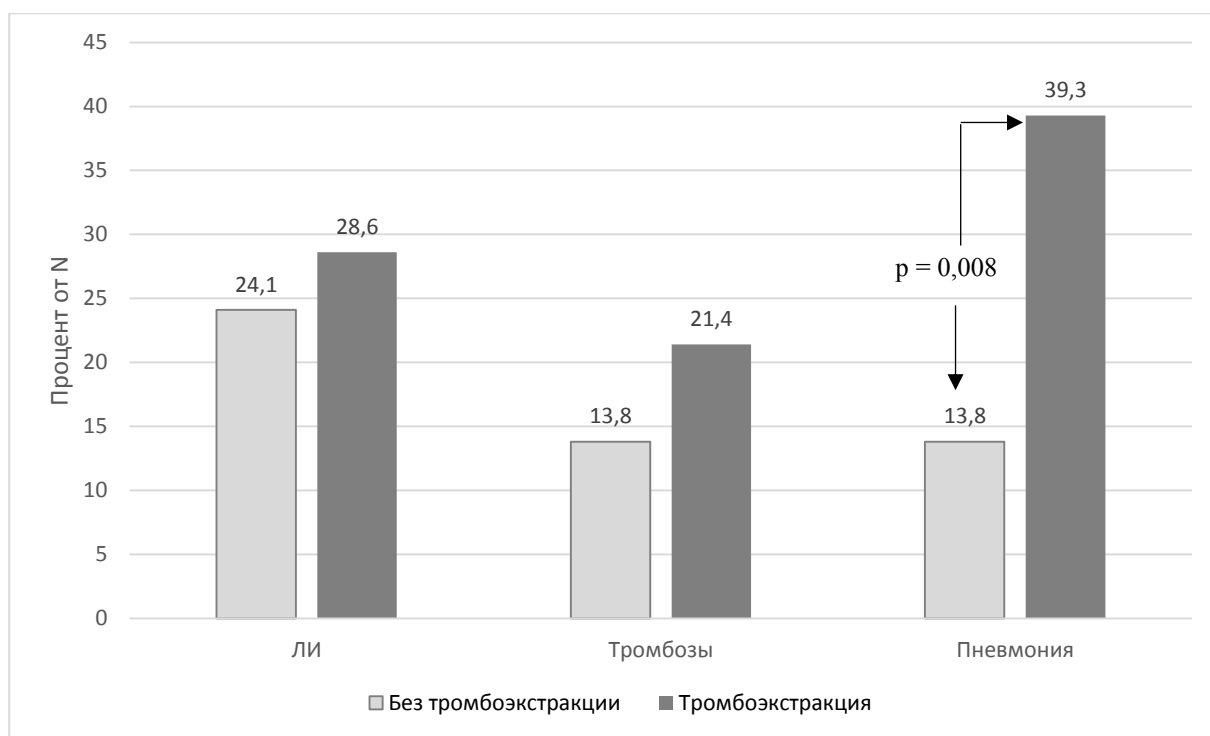


Рисунок 9. Частота осложнений у пациентов без проведения и с проведением тромбозэкстракции.

Вероятно, это объясняется тем, что для проведения тромбозэкстракции отбирались те пациенты, которые находились в тяжёлом состоянии по шкалам оценки состояний и нередко после неэффективной тромболитической терапии. Поэтому отсутствие статистически значимых различий по количеству пациентов с ЛИ и тромботическими осложнениями является показателем высокой эффективности тромбозэкстракции в прогнозе выживаемости и отсутствия тромбозов. Статистически значимо большая частота развития пневмонии ($n=19$) в группе пациентов с тромбозэкстракцией ($n=11$) также могла быть обусловлена более тяжёлым состоянием пациентов в этой группе.

Анализ лабораторных данных у пациентов с проведенной тромбозэкстракцией не выявил значимых в прогнозе осложнений и летального исхода лабораторных показателей. По-видимому, исходно пациенты в данной группе находились в настолько тяжелом состоянии, что даже специфическая терапия не позволила снизить летальность и частоту тромботических осложнений.

Однако в качестве маркера прогноза легкой степени инвалидизации по индексу Бартел можно использовать снижение концентрации тканевого активатора плазминогена более чем на 55% к 4 суткам наблюдения. Чувствительность данной точки (55%) t-РА по таблице сопряженности составила 86%, специфичность – 20%, ПЦПР в прогнозе легкой степени

инвалидизации по индексу Бартел – 43%, ПЦОР – 67%. Отношение шансов легкой степени инвалидизации по индексу Бартел при снижении концентрации t-PA более чем на 55% составило 1,75 (95%ДИ 1,102-3,32) при статистической значимости $p=0,041$.

Оценка значимости некоторых микроРНК в прогнозе осложнений и функциональных исходов ишемического инсульта

В выборке пациентов, набранных для сравнительного исследования значимости лабораторных показателей у больных с ИИ без проведения и при проведении тромбоэкстракции, было дополнительно проведено исследование микроРНК в слюне и в плазме крови на 1-е и 4-е сутки наблюдения. Перечень микроРНК был определён на основании данных литературы и в соответствии с финансовыми возможностями исследования.

В качестве предикторов летального исхода были выявлены микроРНК-125 в плазме крови на 1 сутки и микроРНК-21 в слюне на 4 сутки, в прогнозе развития тромботических осложнений - микроРНК-125 в плазме на 4 сутки и микроРНК-21 в слюне на 4 сутки, пневмонии - микроРНК-145 в плазме на 1 сутки и динамика микроРНК-21 в слюне. Их характеристики как биомаркеров представлены в таблице 5.

Таблица 5. Характеристики прогностически значимых микроРНК.

Конечная точка	микроРНК	Пороговое значение	Площадь под кривой, р	ПЦПР	ПЦОР	ОШ, р
Летальный исход	микроРНК-125	413341 копий	0,791, $p<0,001$	50%	100%	0,514*, $p<0,001$
	микроРНК-21	9 393 488 копий	0,730, $p=0,012$	88%	41%	4,81, $p=0,009$
Тромботические осложнения	микроРНК-125	819004 копий	0,786, $p<0,001$	27%	94%	5,40, $p=0,28$
	микроРНК-21	3202640 копий	0,792, $p<0,001$	86%	20%	7,78, $p=0,011$
Пневмония	микроРНК-145	183319 копий	0,675, $p=0,042$	33%	91%	5,0, $p=0,014$
	микроРНК-21	-85,7%	0,775, $p=0,021$	94%	29%	6,46*, $p=0,037$

* – риск отсутствия

В прогнозе ЛИ наибольшей значимостью обладает микроРНК-125 в плазме на 1 сутки, вне зависимости от единиц измерения, причем обращает на себя внимание значимость именно отрицательного результата (при уровне ниже порогового значения высока вероятность выживания пациентов с ИИ). Вероятно, это объясняется меньшей степенью ишемического повреждения у пациентов с инсультом, при которой не требуется значительная активация

механизмов пролиферации и дифференцировки клеток, в которых активно участвует микроРНК-125. Обратная картина наблюдается по микроРНК-21 в слюне на 4 сутки – уровень выше порогового значения ассоциирован с отсутствием летального исхода, что наиболее вероятно обусловлено биологической ролью данного микроРНК - повышенные уровни микроРНК-21 стимулируют запуск антиапоптотических и противовоспалительных процессов, которые могут оказать влияние на выживаемость пациентов.

Значимость микроРНК в прогнозе функциональных исходов ИИ определялась в 2 этапа: выбор микроРНК по результатам анализа статистической значимости различий между группами с хорошим и плохим функциональным исходом, расчёт пороговых значений с визуализацией и представлением их характеристик прогностической значимости по выбранным микроРНК. В качестве предиктора плохого функционального исхода по шкале Рэнкина была выявлена динамика микроРНК-125 в копиях в слюне. Площадь под характеристической кривой составила 0,686 (95%ДИ 0,506-0,866, $p=0,049$). Пороговое значение по координатам характеристической кривой составило 30,9% с чувствительностью 63,6% и специфичностью 82,4%. ПЦПР в прогнозе плохого функционального исхода по шкале Рэнкина для микроРНК-125 составила 82%, ПЦОР – 64%. Риск плохого функционального исхода по шкале Рэнкина при динамике микроРНК-125 в слюне, более чем на 30,9% к 4 суткам наблюдения, составил ОШ 8,17 (95%ДИ 1,79-37,3, $p=0,008$). С учётом биологической роли микроРНК-125 можно предположить, что наличие значительной активации механизмов пролиферации и дифференцировки клеток ко времени окончательного формирования очага поражения свидетельствует о необходимости в этом и это является неблагоприятным фактором для последующего функционального восстановления.

Площадь под характеристической кривой в прогнозе легкой степени инвалидизации по индексу Бартел для концентрации микроРНК-21 в плазме крови, выраженной в количестве копий, в 1 сутки наблюдения составила 0,746 (95%ДИ 0,598-0,894, $p=0,005$). Пороговое значение по координатам характеристической кривой составило 3321742 копий с чувствительностью 75% и специфичностью 80%. ПЦПР в прогнозе легкой степени инвалидизации по индексу Бартел для микроРНК-21 составила 62%, ПЦОР – 74%. Вероятность легкой степени инвалидизации по индексу Бартел для микроРНК-21 в плазме крови при повышении более чем на 3321742 копий в 1 сутки наблюдения, составила ОШ 4,6 (95%ДИ 1,49-14,2, $p=0,008$).

Наиболее перспективной из всех исследуемых микроРНК является микроРНК-21, повышение которой приводит к снижению частоты летальных исходов, тромботических осложнений и плохих функциональных исходов. В настоящее время активно ведутся работы по изучению эффектов лекарственных препаратов на основе аналогов (имитаторы) и ингибиторов (антагомиры) микроРНК. Возможно, разработка и применение препаратов на основе микроРНК-21 (имитаторов) и включение их в схему базисной терапии позволит в дальнейшем повысить частоту благоприятных исходов ишемического инсульта.

Профиль микроРНК у пациентов с ишемическим инсультом и хронической сердечной недостаточностью

Хроническая сердечная недостаточность является распространённым сопутствующим заболеванием у пациентов с ИИ. Известно, что инсульт у пациентов с ХСН взаимосвязан с неблагоприятным исходом и высокой частотой летального исхода (К.Г. Haeusler, 2012). Актуальность диагностики ХСН в сомнительных случаях, особенно в состоянии компенсации или при сохранённой диастолической функции у пациентов с ИИ обусловлена необходимостью особой тактики лечения при наличии данного заболевания (В.Ю. Мареев и соавт., 2018).

В выборке пациентов с ИИ, отобранных для исследования микроРНК, доля больных с ХСН составила 67,4% (95%ДИ 57,3-76,9%, 58 человек). Наличие ХСН в данной выборке оказалось статистически значимым фактором риска ЛИ, и незначимым по риску тромботических осложнений, риску развития пневмонии, риску плохих исходов по шкале Рэнкина и индексу Бартел.

Статистическая значимость отличий уровней микроРНК при наличии ХСН по доверительным интервалам центральной тенденции не была выявлена ни по одной микроРНК, но при использовании статистических критериев была получена значимость отличия уровней трёх микроРНК в различном биоматериале – микроРНК-126 в плазме на 1 сутки, микроРНК-145 в слюне на 1 сутки и микроРНК-21 в плазме на 4 сутки. Клиническую необходимость, определяющую последующую тактику лечения, имеет диагностика ХСН в 1 сутки наблюдения. В соответствии с указанной необходимостью и полученными результатами оценки представляет интерес диагностическая значимость выявленных отличий между группами с наличием и отсутствием ХСН концентрации микроРНК-126 в плазме в количестве копий и концентраций микроРНК-145 в слюне в о.е. и количестве копий. Данные микроРНК показали статистическую значимость отсутствия ХСН по

характеристическим кривым (рис.10). По-видимому, активация барьерных механизмов в ротовой полости с участием провоспалительной микроРНК-145 имеет важное значение для больных с ИИ в предотвращении пневмонии, и данная сохранность сопряжена с отсутствием ХСН, за счёт сохранения периферического кровообращения, соответственно и трофики тканей, в том числе в ротовой полости, которое нарушено при наличии ХСН.

Площадь под характеристической кривой по отсутствию ХСН концентрации микроРНК-126 в плазме крови в 1 сутки наблюдения по количеству копий составила 0,655 (95%ДИ 0,525-0,785, $p=0,039$). Пороговое значение по координатам характеристической кривой составило 133145 копий с чувствительностью 58,5% и специфичностью 71,4%. Диагностическая точность составила 62%, отношение правдоподобий положительного результата – 2,0, отношение правдоподобий отрицательного результата – 0,58, ОШ 3,52 (95%ДИ 1,18-10,5, $p=0,038$).

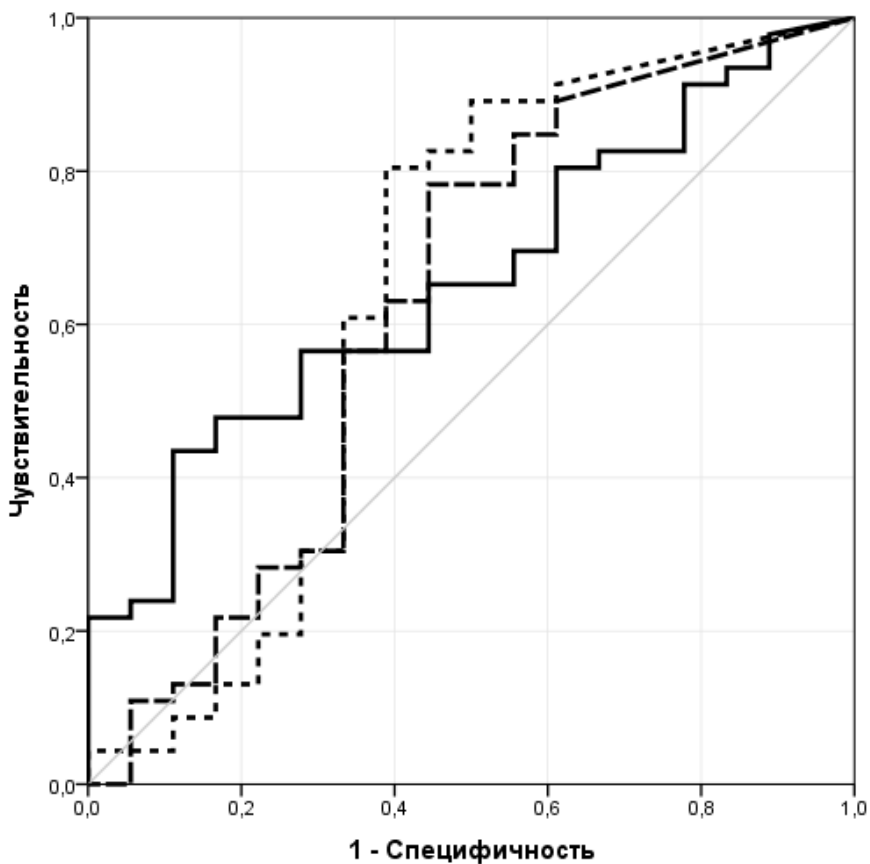


Рисунок 10. Характеристические кривые микроРНК в 1 сутки наблюдения по наличию ХСН. Сплошная чёрная линия – микроРНК-126 по количеству копий в плазме крови, прерывистая чёрная – микроРНК-145 по о.е. в слюне, прерывистая чёрная линия с длинными штрихами – микроРНК-145 по количеству копий в слюне.

Полученный результат можно объяснить тем, что синтез микроРНК-126, способствующий ангиогенезу, восстановлению целостности сосудов и заживлению раны, вероятно, не истощён или не нарушена его активация при отсутствии ХСН, что сопровождается своевременной его активацией при развитии ИИ и повышением микроРНК-126 в плазме крови.

Площадь под характеристической кривой по отсутствию ХСН концентрации микроРНК-145 в слюне в 1 сутки наблюдения по о.е. составила 0,663 (95%ДИ 0,493-0,832, $p=0,038$). Пороговое значение по координатам характеристической кривой составило 0,003 о.е. с чувствительностью 79,6% и специфичностью 63,2%. Диагностическая точность составила 75%, отношение правдоподобий положительного результата – 2,2, отношение правдоподобий отрицательного результата – 0,32, ОШ 6,69 (95%ДИ 2,09-21,4, $p=0,001$).

Площадь под характеристической кривой в диагностике по отсутствию ХСН концентрации микроРНК-145 в плазме крови в 1 сутки наблюдения по количеству копий составила 0,653 (95%ДИ 0,499-0,808, $p=0,045$). Пороговое значение по координатам характеристической кривой составило 321715 копий с чувствительностью 76,5% и специфичностью 60% 23. Диагностическая точность составила 72%, отношение правдоподобий положительного результата – 1,9, отношение правдоподобий отрицательного результата – 0,39, ОШ 6,69 (95%ДИ 2,09-21,4, $p=0,001$), ОШ 4,88 (95%ДИ 1,62-14,7, $p=0,005$).

В целом, подводя итоги исследования микроРНК у пациентов с инсультом, обращает на себя внимание различие уровней одних и тех же микроРНК в плазме крови и слюне (буккальном соскобе). Это не позволяет рекомендовать неинвазивный метод взятия биоматериала для исследования количества данных микроРНК как альтернативу взятию венозной крови. Необходимы дальнейшие исследования на более крупных выборках, которые смогут объяснить выявленные различия.

В ходе работы была выявлена различная прогностическая и диагностическая значимость количества микроРНК, выраженного в копиях и в относительных единицах. При этом у пациентов наблюдался большой разброс уровней микроРНК-16, по которой проводилась дополнительная нормировка, что также пока не позволяет рекомендовать такую нормировку к использованию.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов лабораторных исследований выявил, что значения 21 из 72 лабораторного показателя по мерам центральной тенденции превышали

верхнюю границу референтного интервала, причем значения 4 из этих 21 (BDNF, PCI, sPLA2, ФНО- α) были выше верхней границы в 8 и более раз. Уровень пяти показателей в выборке больных с ИИ оказался ниже границы референтного интервала: CNP, витронектин, ЛПВП, плазминоген, урокиназа.

Таким образом, по данным лабораторных исследований пациенты с ИИ характеризуются следующим паттерном патофизиологических процессов:

1. Окислительный стресс – повышение оЛПНП;
2. Разрушение нервных клеток – повышение GFAP, белка S100, сБСЖК;
3. Активация процессов воспаления и повреждения эндотелия – повышение sPLA2 (в 33 раза), ФНО- α (в 8 раз), СРБ, ICAM-1, sE-селектина, неоптерина, НЭ, гомоцистеина;
4. Активацией процессов, предупреждающих кровопотерю вследствие нарушения ГЭБ – снижение уровня локального вазодилатора CNP, сдвиг в сторону гиперкоагуляции: повышение PCI (в 12 раз), PAI-1, PAR-комплекса, t-PA, снижение концентрации витронектина, плазминогена, урокиназы;
5. Активацией пристеночного протеолиза – повышение ММП-9 и ММП-13;
6. Компенсаторной активацией нейропротекторных механизмов – 25-кратное повышение BDNF;
7. Метаболические нарушения – повышение концентрации глюкозы и ЛПНП, снижение ЛПВП.

Наиболее значимые изменения при сравнении доверительных интервалов лабораторных показателей с референтными интервалами (отсутствие пересечения интервалов) обнаружилось для sPLA2, ФНО- α , СРБ, НЭ, PCI, BDNF, оЛПНП, GFAP, что указывает на выраженную активацию воспалительных и коагуляционных процессов в ответ на повреждение нервных клеток и эндотелия вследствие оксидативного стресса и компенсаторный запуск процессов нейрорегенерации и нейропротекции.

При этом большинство из вышеописанных показателей не были значимыми в прогнозе осложнений и исходов ИИ. Прогностическая значимость была выявлена для другого ряда показателей, некоторые из которых находились в референтных пределах: концентрация лейкоцитов (в комплексе с сБСЖК), концентрация тромбоцитов, мочевины, КФК, сБСЖК, комплекс t-PA/PAI-1, фибронектин, СРБ, ИЛ-6, TIMP-2. Из них только один показатель, СРБ, оказался одновременно и прогностическим биомаркером, и биомаркером, отражающим патофизиологические процессы, происходящие в организме пациента.

Обращает на себя внимание более высокая ценность именно отрицательного результата вышеперечисленных биомаркеров в прогнозе развития летального исхода, тромботических осложнений и пневмонии. Это означает, что более низкие их значения сопряжены с высокой вероятностью отсутствия осложнений и неблагоприятных исходов.

Проведенное исследование продемонстрировало необходимость раннего определения паттерна лабораторных показателей, которые являются биомаркерами осложнений и исходов ишемического инсульта. Часть из них (лейкоциты и тромбоциты, входящие в клинический анализ крови, мочевины, КФК, СРБ) присутствуют в номенклатуре медицинских услуг (Приказ Минздрава России № 804н от 13.10.2017) и, соответственно, могут быть назначены в рамках системы обязательного медицинского страхования. Однако СРБ на сегодняшний день не входит в перечень обязательных исследований для пациентов с ИИ, а назначается лишь в определенных клинических ситуациях. Результаты работы свидетельствуют о необходимости включения СРБ в перечень рутинных лабораторных исследований, которые должны проводиться каждому пациенту с ИИ в первые сутки от начала развития заболевания с целью включения в группу риска по развитию внутрибольничной пневмонии.

Определение концентрации комплекса t-PA/PAI-1, TIMP-2 и фибронектина в настоящее время могут выполняться только в рамках научных исследований, так как в России отсутствуют соответствующие зарегистрированные наборы реагентов, по информации с сайта Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения <http://www.roszdravnadzor.ru>. Это обуславливает необходимость проведения дальнейшей работы по обоснованию потребности в данных исследованиях и регистрации соответствующих диагностических наборов.

В таблице 6 представлены сводные данные о выявленных в работе лабораторных биомаркерах, с указанием примерной себестоимости исследования для тестов, которые в настоящее время отсутствуют в номенклатуре медицинских услуг. Себестоимость рассчитывалась на основе цены набора реагентов при его закупке для исследования в данной работе, а также в соответствии с методическими рекомендациями Фонда обязательного медицинского страхования и Минздрава России, размещенными на сайте фонда ОМС.

Таблица 6. Сводные номенклатурно-экономические данные о выявленных лабораторных биомаркерах.

Показатель		Наличие в номенклатуре медицинских услуг	Примерная себестоимость анализа, руб	Наличие зарегистрированного набора реагентов
Стандартные исследования	Лейкоциты	Да		Да
	Тромбоциты	Да		Да
	Мочевина	Да		Да
	КФК	Да		Да
Специфические исследования	СРБ	Да		Да
	ИЛ-6		1000	Да
	сБСЖК		200*	Да
Научные исследования	Комплекс t-РА/РАI-1		1000	Нет
	Фибронектин		1000	Нет
	TIMP-2		1000	Нет

* качественный экспресс-тест

Такие лабораторные показатели, как ИЛ-6 и сБСЖК, не выполняются в рамках ОМС, однако на территории РФ есть зарегистрированные наборы реагентов, которые используются в коммерческих клиниках и лабораториях. Полученные в исследовании результаты демонстрируют необходимость включения данных тестов в номенклатуру медицинских услуг и высокую вероятность их представления в клинических рекомендациях после проведения дополнительных более крупных исследований с целью последующего формирования новых стандартов оказания медицинской помощи при ИИ с внесением вышеуказанных лабораторных исследований.

На основании полученных результатов был разработан персонифицированный алгоритм формирования групп риска по летальному исходу, тромботическим осложнениям, пневмонии и плохому функциональному восстановлению среди пациентов с ишемическим инсультом (схема).

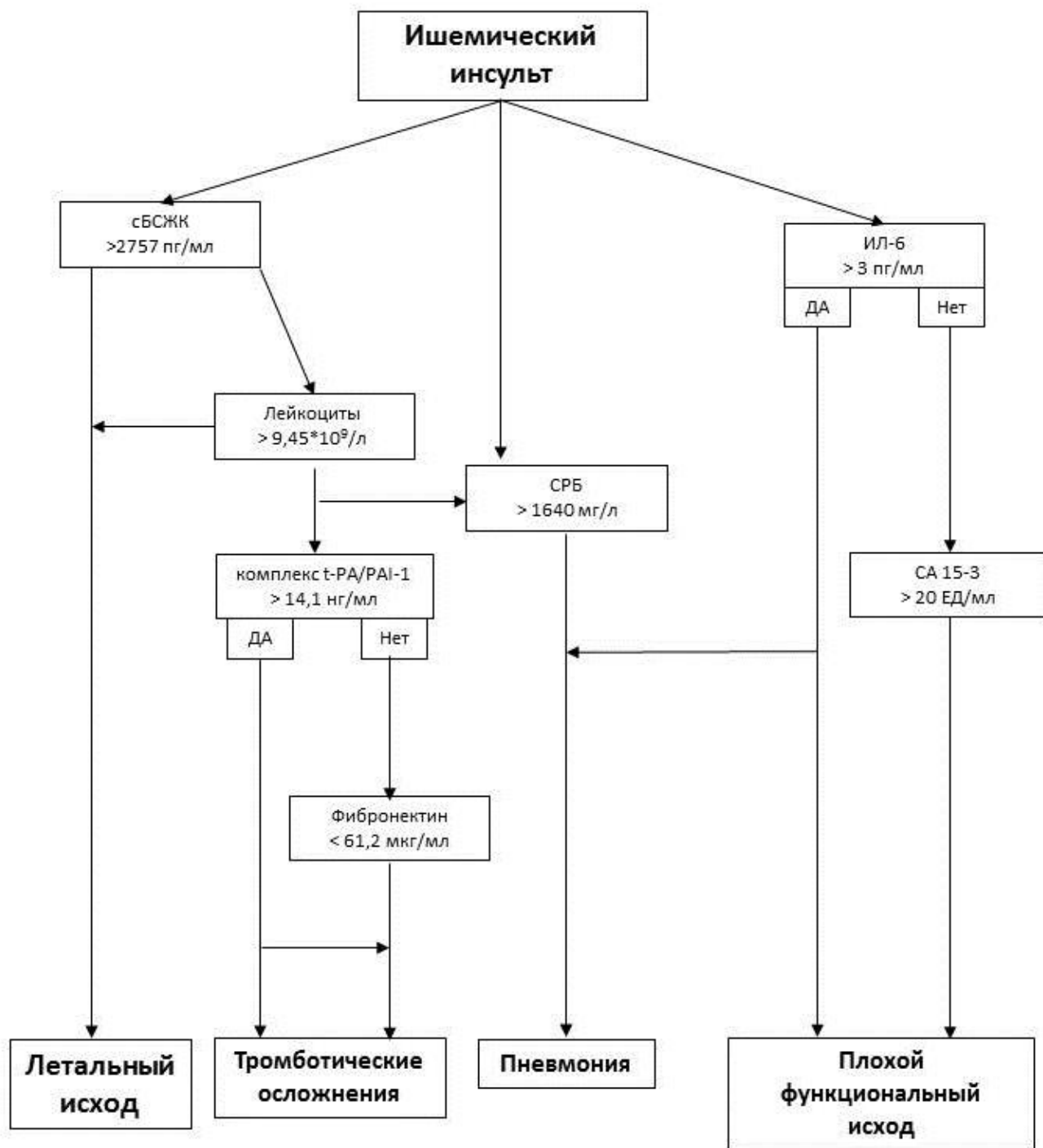


Схема. Персонализированный алгоритм формирования групп риска по летальному исходу, тромботическим осложнениям, пневмонии и плохому функциональному восстановлению

ВЫВОДЫ

1. Острейший период ишемического инсульта характеризуется особым паттерном лабораторных показателей, характеризующих воспалительные, метаболические, коагуляционные, нейрорегенеративные и нейропротективные процессы: повышенные по мерам центральной тенденции уровни оЛПНП, GFAP, белка S100, сБСЖК, СРБ, ICAM-1, sE-селектина, неоптерина, НЭ, гомоцистеина, PAI-1, PAF-комплекса, t-PA, ММП-9, ММП-13, глюкозы, ЛПНП, в разы повышенные уровни sPLA2, ФНО- α , PCI, BDNF, сниженный уровень ЛПВП, CNP, витронектина, плазминогена, урокиназы. Наиболее значимое повышение с отсутствием пересечения доверительных и референтных интервалов было выявлено для sPLA2, ФНО- α , СРБ, НЭ, PCI, BDNF, оЛПНП, GFAP, из которых только СРБ впоследствии был выявлен как прогностический биомаркер.
2. Впервые сБСЖК выявлен в качестве независимого биомаркера риска летального исхода на госпитальном этапе у больных с ишемическим инсультом, с пороговым значением более 2757 пг/мл. Вероятность выживания составляет 100% при значениях сБСЖК ниже 2757 пг/мл и концентрации лейкоцитов менее $9,45 \cdot 10^9$ /л, что подтверждает значимость метаболизма жирных кислот и активности воспалительных процессов при urgentных состояниях.
3. Провоспалительный неблагоприятный эффект цитокина ИЛ-6 проявляется уже в интервале референтных значений, концентрация ИЛ-6 более 3 пг/мл ассоциирована с повышенной частотой осложнений и плохих функциональных исходов ишемического инсульта.
4. Выраженная активация механизмов пролиферации и дифференцировки клеток в острейшем периоде ишемического инсульта не является прогностически благоприятным фактором, более значимым является их сохранение на уровне, соответствующем концентрации микроРНК-125 в плазме крови менее 413341 копий на 1 сутки – в прогнозе выживаемости, и на 4 сутки в конце периода формирования очага поражения – в прогнозе отсутствия тромботических осложнений. При повышении концентрации микроРНК-125 в слюне к 4 суткам более чем на 30,9%, увеличивается в 8,17 раза риск плохого функционального восстановления по шкале Рэнкина.
5. Избыточность активации противовоспалительных и антиапоптотических процессов, проявляющаяся повышением уровня микроРНК-21 в слюне, сопряжена с высоким риском осложнений у больных с ишемическим инсультом, в том числе летального исхода при концентрации более 9

393 488 копий. Сохранение активности противовоспалительных процессов на уровне микроРНК-21 в крови более 3 321 742 копий повышает в 4,6 раза вероятность легкой степени инвалидизации по индексу Бартел.

6. Предрасположенность к развитию пневмонии у больных с ишемическим инсультом существует с первых суток заболевания, что сопровождается повышением в крови уровня обладающей провоспалительными эффектами микроРНК-145 выше 183319 копий, и которую можно выявить путём исследования уровня СРБ - при повышении концентрации СРБ более 1640 мг/л в 5,7 раза увеличивается риск развития пневмонии.
7. Нарушение регуляции баланса свободного и латентного PAI-1 связано с риском развития тромботических осложнений при ишемическом инсульте, что выражается повышенной концентрацией комплекса t-PA/PAI-1 более 14,1 нг/мл при повышенной концентрации общего PAI-1. Большое значение в предотвращении тромботических осложнений имеет сохранение механизмов опсонизации, в которых участвует фибронектин, при его концентрации более 61,2 мкг/мл в 4,38 раза повышается вероятность отсутствия тромботических осложнений.
8. Снижение концентрации тканевого активатора плазминогена более чем на 55% к 4 суткам после тромбоэкстракции у больных с ишемическим инсультом отражает устранение этиологической причины активации фибринолиза и в 1,75 раза повышает вероятность легкой степени инвалидизации по индексу Бартел.
9. Дополнительными диагностическими маркерами хронической сердечной недостаточности, как фактора риска развития тромботических осложнений и пневмонии при ишемическом инсульте, являются уровни микроРНК-126 более 133145 копий в плазме крови и микроРНК-145 более 321715 копий в слюне в 1 сутки с отношением правдоподобий положительного результата 2,0 и 1,9 соответственно.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При обследовании пациентов с ишемическим инсультом в первые сутки заболевания рекомендуется определять уровень сБСЖК с целью отнесения к группе риска летального исхода и организации более интенсивного наблюдения за состоянием пациентов.
2. С целью раннего прогноза развития пневмонии рекомендуется исследование уровня СРБ в первые сутки ишемического инсульта.

3. В мероприятия по ранней оценке риска развития тромботических осложнений у больных с ишемическим инсультом рекомендуется включать исследования концентрации фибронектина и комплекса t-РА/РАI-1.
4. Планирование мероприятий по реабилитации после проведения тромбоэкстракции целесообразно проводить с учётом динамики тканевого активатора плазминогена в острейшем периоде ишемического инсульта.
5. При необходимости подтверждения отсутствия хронической сердечной недостаточности, особенно в случаях с сохранённой диастолической функцией сердца, в первые сутки ишемического инсульта рекомендуется исследование микроРНК-126 в плазме крови или микроРНК-145 в слюне.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ:

Статьи в журналах, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus:

1. Архипкин, А.А. Альфа-фетопротейн в прогнозе выживаемости и функционального восстановления больных с ишемическим инсультом / А.А. Архипкин, О.В. Лянг, А.Г. Кочетов // Клиническая лабораторная диагностика. - 2014. - Т. 59. - №10. - С. 12-15.
2. Архипкин, А.А. Фетальные белки в прогнозе развития пневмонии у больных с ишемическим инсультом / А.А. Архипкин, О.В. Лянг, А.Г. Кочетов // Клиническая лабораторная диагностика. - 2014. - Т.59. - № 12. - С. 13-16.
3. Ромакина, В.В. МикроРНК как биомаркеры сердечно-сосудистых заболеваний / В.В. Ромакина, И.В. Жиров, С.Н. Насонова, А.В. Засеева, А.Г. Кочетов, О.В. Лянг, С.Н. Терещенко // Кардиология. - 2018. - Т.58. - № 1. - С. 66-71.

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК РФ:

4. Архипкин, А.А. Влияние уровня альфа-фетопротейна на прогноз выживаемости и функционального восстановления после ишемического инсульта / А.А. Архипкин, О.В. Лянг, А.Г. Кочетов // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2014. – №3. – С.123-127.
5. Кочетов, А.Г. Перспективы применения микроРНК в диагностике и терапии сердечной недостаточности / А.Г. Кочетов, И.В. Жиров, В.П. Масенко, Р.Р. Гимадиев, О.В. Лянг, С.Н. Терещенко // Кардиологический вестник. – 2014. – Т.IX. - №2. – С.62-67.
6. Архипкин, А.А. Роль фетальных белков в патогенезе развития отека мозга у больных с ишемическим инсультом / А.А. Архипкин, О.В. Лянг, А.Г. Кочетов // Вестник РУДН. Серия: Медицина. - 2014. - №3. - С.31-36.

7. Кочетов, А.Г. Экспрессия циркулирующих микроРНК при развитии хронической сердечной недостаточности у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями / А.Г. Кочетов, О.В. Лянг, Р.Р. Гимадиев, И.В. Жиров, А.А. Скворцов, А.В. Засеева, Е.Г. Босых, В.П. Масенко, С.Н. Терещенко // Лабораторная служба. - 2016. - №1. - С. 26-32.
8. Жиров, И.В. МикроРНК в диагностике хронической сердечной недостаточности: состояние, проблемы и результаты пилотного исследования / И.В. Жиров, А.Г. Кочетов, А.В. Засеева, О.В. Лянг, А.А. Скворцов, А.А. Абрамов, Р.Р. Гимадиев, В.П. Масенко, С.Н. Терещенко // Системные гипертензии. - 2016. - Т.13. - № 1. - С. 39-46.
9. Кочетов, А.Г. Оценка экспрессии циркулирующих микроРНК у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями / А.Г. Кочетов, О.В. Лянг, Р.Р. Гимадиев, А.А. Абрамов, И.В. Жиров, А.А. Скворцов, А.В. Засеева, Е.Г. Босых, В.П. Масенко, С.Н. Терещенко // Лабораторная служба. - 2016. - №2. - С. 28-31.
10. Лянг, О.В. Значимость окисленных липопротеинов низкой плотности в прогнозе течения ишемического инсульта / О.В. Лянг, О.В. Черничук, И.А. Жирова, А.Г. Кочетов // Лабораторная служба. – 2018. - №1. – С. 25-29.
11. Лянг, О.В. Информативность концентрации фибронектина в прогнозе функциональных исходов у больных с ишемическим инсультом при проведении тромболитической терапии / О.В. Лянг, Е.Н. Шачнев, А.Г. Кочетов, Н.А. Шамалов, Л.В. Стаховская // Лабораторная служба. – 2018. - №2. - С.34-39.
12. Лянг, О.В. Концентрация фибронектина в прогнозе выживаемости и развития симптомной геморрагической трансформации у больных с ишемическим инсультом при проведении тромболитической терапии / О.В. Лянг, А.Г. Кочетов, А.А. Архипкин, Ю.В. Новоженова, Е.Н. Шачнев, Н.А. Шамалов, Л.В. Стаховская // ConsiliumMedicum. – 2018. – Т.20. – №2. - С.8-13.
13. Черничук, О.В. Этиологическая роль окисленных липопротеинов низкой плотности в развитии ишемического инсульта / О.В. Черничук, О.В. Лянг, А.Г. Кочетов, Н.А. Шамалов, Л.В. Стаховская // Фарматека. - 2018. - №5. - С. 11-17.
14. Лянг, О.В. Результаты пилотного исследования микроРНК у больных с ишемическим инсультом / О.В. Лянг, А.Г. Кочетов, Р.Р. Гимадиев, А.А. Абрамов, Н.А. Шамалов, Л.В. Стаховская // ConsiliumMedicum. – 2018. – Т.20. - №9. - С.8-11.

Монографии:

15. Алферова, В.В. Клинические рекомендации по ведению больных с ишемическим инсультом и транзиторными ишемическими атаками. Монография под ред. проф. Л.В. Стаховской / В.В. Алферова, А.А. Белкин, И.А. Вознюк, М.Ю. Герасименко, Л.А. Гераскина, М.Н. Гордеев, Л.В. Губский, Н.С. Ефремов, Г.Е. Иванова, С.В. Котов, А.Г. Кочетов, Г.Г. Кривобородов, А.В. Лебедева, В.Г. Лелюк, О.В. Лянг, М.Ю. Мартынов, Е.В. Мельникова, Н.А. Павлов, В.А. Парфенов, С.С. Петриков, В.А. Сорокоумов, Л.В. Стаховская, Д.Р. Хасанова, А.В. Фонякин, Н.А. Шамалов, А.В. Щеголев // М., 2017. – 208 с.

Прочие публикации:

16. Архипкин А.А., Кочетов А.Г., Лянг О.В., Новоженова Ю.В., Скворцова В.И. Сывороточные уровни фетальных белков по патогенетическим вариантам ишемического инсульта / Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Нарушения мозгового кровообращения: диагностика, профилактика, лечение», Самара, 24-26 апреля 2012, с. 45-47.
17. Кочетов А.Г., Лянг О.В., Архипкин А.А., Новоженова Ю.В., Скворцова В.И. Клинико-лабораторная оценка сывороточного уровня фетальных белков в качестве специфических маркеров развития пневмонии у больных ишемическим инсультом / Материалы X Всероссийского съезда неврологов с международным участием, Нижний Новгород, 2012, с.94
18. Кочетов А.Г., Лянг О.В., Архипкин А.А., Новоженова Ю.В., Скворцова В.И. Оценка значимости фетальных белков в прогнозе развития ТЭЛА у больных с ишемическим инсультом / Материалы X Всероссийского съезда неврологов с международным участием, Нижний Новгород, 2012, с.94-95
19. Шамалов Н.А., Кочетов А.Г., Лянг О.В., Анисимов К.В., Рамазанов Г.Р., Архипкин А.А., Новоженова Ю.В., Скворцова В.И. Динамика ММР-9 и лейкоцитарной эластазы в оценке безопасности тромболитической терапии у больных с ишемическим инсультом / Материалы X Всероссийского съезда неврологов с международным участием, Нижний Новгород, 2012, с. 185.
20. Кочетов А.Г., Архипкин А.А., Лянг О.В., Новоженова Ю.В. Оценка значимости фетальных белков в прогнозе развития пневмонии у больных с кардиоэмболическим вариантом ишемического инсульта / Материалы конференции «Возможности современной кардиологии в рамках модернизации», Москва, 2013, с. 25.
21. Кочетов А.Г., Архипкин А.А., Лянг О.В., Новоженова Ю.В. Оценка значимости фетальных белков в прогнозе развития ТЭЛА у больных с

- кардиоэмболическим вариантом ишемического инсульта / Материалы конференции «Возможности современной кардиологии в рамках модернизации», Москва, 2013, с.25.
22. Кочетов А.Г., Новоженова Ю.В., Лянг О.В., Архипкин А.А. Протеиназы в прогнозе исходов тромболитической терапии у больных с кардиоэмболическим вариантом ишемического инсульта / Материалы конференции «Возможности современной кардиологии в рамках модернизации», Москва, 2013, с. 30.
23. Кочетов А.Г., Гимадиев Р.Р., Абрамов А.А., Лянг О.В., Масенко В.П., Терещенко С.Н. Исследование содержания микроРНК в плазме крови у больных с хронической сердечной недостаточностью и дилатационной кардиомиопатией / Сборник материалов XXI Российского национального конгресса «Человек и лекарство», 7-11 апреля 2014, с. 64-65.
24. Кочетов А.Г., Гимадиев Р.Р., Лянг О.В., Абрамов А.А. МикроРНК – новый биомаркер сердечно-сосудистых заболеваний / XX Международная научно-практическая конференция памяти академика Н.Н. Бурденко «Актуальные вопросы современного здравоохранения», сборник статей, 16-17 мая 2014 г., г. Пенза, с. 51-61.
25. Лянг О.В., Архипкин А.А., Кочетов А.Г. Роль фетальных белков в развитии осложнений ишемического инсульта / XX Международная научно-практическая конференция памяти академика Н.Н. Бурденко «Актуальные вопросы современного здравоохранения», сборник статей. 16-17 мая 2014 г., г. Пенза, с. 68-78.
26. Архипкин А.А., Звездина Е.И., Лянг О.В., Новоженова Ю.В., Кочетов А.Г. Референтные интервалы фетальных белков, рассчитанные для пациентов с неонкологическими заболеваниями / Материалы научно-практического форума стран СНГ «Гармонизация лабораторной службы стран СНГ, обмен опытом. Фундаментальные основы, инновационные технологии, клиническая значимость лабораторных тестов», 5-6 июня 2014 г., г. Астана, с. 57-62.
27. Лянг О.В., Гимадиев Р.Р., Кочетов А.Г., Абрамов А.А. Оценка уровней микроРНК при хронической сердечной недостаточности / Материалы научно-практического форума стран СНГ «Гармонизация лабораторной службы стран СНГ, обмен опытом. Фундаментальные основы, инновационные технологии, клиническая значимость лабораторных тестов», 5-6 июня 2014 г., г. Астана, с. 74-76.

28. Лянг О.В., Гимадиев Р.Р., Кочетов А.Г., Абрамов А.А. Оценка уровней микроРНК при воспалительной кардиомиопатии — пилотное исследование / Материалы научно-практического форума стран СНГ «Гармонизация лабораторной службы стран СНГ, обмен опытом. Фундаментальные основы, инновационные технологии, клиническая значимость лабораторных тестов», 5-6 июня 2014 г., г. Астана, с. 76-79.
29. Кочетов А.Г., Лянг О.В., Архипкин А.А., Новоженова Ю.В., Звезда Е.И. Прогностическая значимость уровня альфа-фетопротеина у больных с ишемическим инсультом / Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Материалы III Российского международного конгресса «Цереброваскулярная патология и инсульт» 6-10 октября 2014 г., Казань, 2014, Т.114, № 8, с. 31-32.
30. Кочетов А.Г., Лянг О.В., Архипкин А.А., Новоженова Ю.В., Звезда Е.И. Фетальный белок СА 72-4 в прогнозе развития пневмонии у больных с ишемическим инсультом / Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Материалы III Российского международного конгресса «Цереброваскулярная патология и инсульт» 6-10 октября 2014 г., Казань, 2014, Т.114, № 8, с. 81-82.
31. Кочетов А.Г., Лянг О.В., Гимадиев Р.Р., Абрамов А.А. Уровень циркулирующих микроРНК при хронической сердечной недостаточности / Материалы Российского конгресса лабораторной медицины, 30 сентября – 2 октября 2015, Москва. Клиническая лабораторная диагностика, 2015, Т.60, №9, с. 90.
32. Кочетов А.Г., Лянг О.В., Гимадиев Р.Р., Абрамов А.А. Циркулирующие микроРНК у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями / Материалы Российского конгресса лабораторной медицины, 30 сентября – 2 октября 2015, Москва. Клиническая лабораторная диагностика, 2015, Т.60, №9, с. 90.
33. Кочетов А.Г., Лянг О.В., Гимадиев Р.Р., Абрамов А.А., Садовникова А.С. Оценка экспрессии микроРНК-21, 423-5p, 208a, 499a и 34a при развитии хронической сердечной недостаточности у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями / Материалы Российского конгресса лабораторной медицины, 30 сентября – 2 октября 2015, Москва. Клиническая лабораторная диагностика, 2015, Т.60, №9, с. 91.
34. Лянг О.В. Биомаркеры сердечной недостаточности у больных с ХСН и сохраненной систолической функцией левого желудочка / Тезисы II Российского конгресса лабораторной медицины, 12-14 октября 2016, Москва. Клиническая лабораторная диагностика, 2016, Т.61, №9, с. 539-540.

35. Шачнев Е.Н., Лянг О.В., Кочетов А.Г., Шамалов Н.А., Стаховская Л.В. Плазменный фибронектин в прогнозе функциональных исходов ишемического инсульта при проведении тромболизиса / Избранные вопросы нейрореабилитации [Электронный ресурс] : материалы X международного конгресса «Нейрореабилитация — 2018» (Москва, 31 мая –1 июня 2018 г.) / редкол. : Г. Е. Иванова [и др.]. — Электрон.дан. — М., 2018. - С. 225-226
36. Лянг О.В., Черничук О.В., Кочетов А.Г. Окисленные липопротеины низкой плотности при ишемическом инсульте / Избранные вопросы нейрореабилитации [Электронный ресурс] : материалы X международного конгресса «Нейрореабилитация — 2018» (Москва, 31 мая –1 июня 2018 г.) / редкол. : Г. Е. Иванова [и др.]. — Электрон.дан. — М., 2018. С. 140-141.
37. Лянг О.В., Черничук О.В., Кочетов А.Г., Стаховская Л.В. Информативность окисленных ЛПНП и антител к ним в прогнозе функционального восстановления больных с ишемическим инсультом / Сборник тезисов Юбилейного конгресса с международным участием «XX Давиденковские чтения», 27-28 сентября 2018 г., Санкт-Петербург, с. 244.
38. Лянг О.В., Черничук О.В., Кочетов А.Г., Стаховская Л.В. Влияние антител к окисленным липопротеинам низкой плотности на развитие геморрагической трансформации у больных с ишемическим инсультом / Сборник тезисов Юбилейного конгресса с международным участием «XX Давиденковские чтения», 27-28 сентября 2018 г., Санкт-Петербург, с. 245.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

BDNF – нейротрофический фактор головного мозга
CA – раковый антиген (cancer antigen)
GFAP – глиальный фибриллярный кислый протеин
ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии
NIHS - шкала инсульта Национального института здоровья США
PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена 1 типа
r-tPA – рекомбинантный тканевой активатор плазминогена
sE-селектин – растворимый E-селектин
sPLA2 – секреторная фосфолипаза A2
TIMP – тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ
t-PA – тканевой активатор плазминогена
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
ИИ – ишемический инсульт
ИЛ-6 – интерлейкин-6
КФК - креатинфосфокиназа
ЛИ – летальный исход
ММП – матриксная металлопротеиназа
НЭ – нейтрофильная эластаза
ОШ – отношение шансов
ПЦОР – прогностическая ценность положительного результата
ПЦПР – прогностическая ценность отрицательного результата
сБСЖК – сердечный белок, связывающий жирные кислоты
СРБ – С-реактивный белок
ТЛТ – тромболитическая терапия
ФНО- α – фактор некроза опухоли альфа
ХСН – хроническая сердечная недостаточность