

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄՈՒԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ԱՌԱՔԵԼՈՎԱ ԷԼԻՆԱ ԱԼԵՔՍԱՆԴՐԻ

ԲՈՐԲՈՔԱՅԻՆ ՊԱՏԱՄԽԱՆԻ ԶԱՐԳԱՑՄԱՆ ՄՈՒԵԿՈՒԼԱՅԻՆ
ՊԱԹՈՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ ԵՎ ՆՐԱ ՓՈԽԿԱՊԱԿՑՎԱԾՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԱՐՅՈՒՆՈՒՂԵՂԱՅԻՆ ՊԱՏՆԵՇԻ ԿԱՐԳԱՎԻՃԱԿԻ ՀԵՏ ՍՈՒՐ ԻՇԵՄԻԿ
ԿԱԹՎԱԾԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Գ.00.03 – «Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանություն» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի
հայցման ատենախոսություն

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2011

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

АРАКЕЛОВА ЭЛИНА АЛЕКСАНДРОВНА

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПАТОМЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА
И ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С СОСТОЯНИЕМ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА
ПРИ ОСТРОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности: 03.00.03 – «Молекулярная и клеточная биология»

ЕРЕВАН – 2011

Ատենախոսության թեման հաստատվել է՝ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտի գիտական խորհրդում

Գիտական ղեկավար՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Ա.Ս. Բոյաջյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր, Զ.Ա. Կարալյան

կենս. գիտ. դոկտոր, Զ.Ռ. Տեր-Պողոսյան


Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի պետական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2011թ. դեկտեմբերի 26-ին, ժամը 14⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ Ն. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտում գործող 042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ, 0014, ք. Երևան, Պ.Սևակ փ. 5/1):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Ն. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտի գրադարանում և <http://aab.sci.am> կայքում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2011թ. նոյեմբերի 25-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ

 Ն.Լ. Հայրապետյան

Тема диссертации утверждена в Институте молекулярной биологии НАН РА

Научный руководитель: доктор биол. наук, профессор А.С. Бояджян

Официальные оппоненты: доктор биол. наук З.А. Каралян

доктор биол. наук З.Р.Тер-Погосян

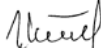
Ведущая организация: Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится 26 декабря 2011г. в 14⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 042, действующего в Институте биохимии НАН РА имени Г. Бунятына (РА, 0014, г. Ереван, ул. П.Севака 5/1).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биохимии НАН РА имени Г. Бунятына и на сайте <http://aab.sci.am>.

Автореферат разослан 25 ноября 2011г.

Ученый секретарь специализированного совета 042
кандидат биол. наук, доцент

 Ք.Լ. Այրապետյան

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Среди патологических состояний организма острый ишемический инсульт занимает третье место в мире по числу летальных исходов. Лишь треть от общего числа лиц, перенесших инсульт, полностью реабилитируется после заболевания, большая часть остается на всю жизнь инвалидами либо погибает. В США инсульт поражает 500 тыс. человек в год, 150 тыс. из них умирает, а экономический ущерб от инсульта составляет 51 млрд. долларов в год. В Европе заболеваемость инсультом в год в среднем составляет 220 случаев на 100 тыс. человек, при этом более половины лиц, перенесших инсульт, остаются инвалидами до конца своей жизни. В России ежегодно диагностируется более чем 450 тыс. новых случаев инсульта, и он занимает второе место среди причин смертности. В Армении заболеваемость инсультом в год в среднем составляет 30-40 случаев на 10 тыс человек. Согласно прогнозам ВОЗ, в дальнейшем заболеваемость инсультом будет катастрофически увеличиваться в связи со старением популяции. При этом сегодня 25% от общего числа больных инсультом составляют люди активного возраста. [Гимоян, 2002; Markus, 2004; Kinlay et al, 2011].

Формирование инфаркта мозга при инсульте происходит по двум основным механизмам: некротической гибели нейронов и апоптоза - вокруг первичного очага инсульта с мертвыми некротизированными клетками образуется зона (пенумбра), содержащая поврежденные, но еще живые клетки. Постепенно эти клетки погибают, и формируется окончательная зона инфаркта, по своим размерам намного превышающая исходный очаг инсульта [Graham & Chen, 2001; Mattson et al, 2001]. Формирование ишемической пенумбры является ключевой концепцией терапии инсульта, основная задача которой состоит в изыскании и разработке таких подходов и лекарственных средств, которые могли бы предотвратить гибель клеток в зоне пенумбры и уменьшить конечный размер инфаркта [Fisher & Ratan, 2003; Markus, 2004].

Основным патологическим процессом, индуцируемым ишемией и ответственным за трансформацию пенумбры в инфаркт, является постишемический воспалительный ответ [Fisher & Ratan, 2003; Markus, 2004]. С одной стороны, он направлен на удаление мертвых клеток из зоны ишемии, с другой стороны, он приводит к гибели живых клеток, увеличению размера инфаркта и нарастанию неврологического дефицита [Becker, 2001; Ginsberg, 2003]. Кроме того, помимо ЦНС, при ишемическом инсульте наблюдается также переход воспалительного ответа и на системный уровень, что еще больше отягощает течение заболевания [Stanimirovic, 2001; Arakelian et al, 2005; DiNapoli et al, 2006; Vouajyan et al, 2006].

Молекулярные механизмы негативных эффектов воспалительного ответа при остром ишемическом инсульте до настоящего времени не ясны, что затрудняет идентификацию мишеней для направленного терапевтического воздействия с целью предотвращения этих эффектов. Клинические испытания, направленные на подавление постишемического ответа, пока еще терпят поражение, что, по-видимому, отражает факт отсутствия достаточного количества преклинических данных. Большинство из них получено в модельных экспериментах на животных, тогда как показано, что так называемые «животные» модели инсульта неадекватно отражают патогенез этого заболевания у человека [Ginsberg, 2003].

Важнейшими компонентами воспалительного ответа являются цитокины, система комплемента и С-реактивный белок (СРБ). Исследования, ранее проведенные в нашей лаборатории, свидетельствуют о вовлечении этих медиаторов воспаления в

патогенез ишемического инсульта у человека, а также позволяют выдвинуть предположение о том, что нарушение регуляторных механизмов, контролирующих развитие воспалительных процессов, ответственно за негативные эффекты постишемического воспалительного ответа и его переход с локального уровня на системный [Бояджян и др., 2004; Bouayjan et al, 2005; Айвазян и др., 2005; Аракелян и др., 2005; Arakelyan et al, 2005; Bouayjan et al, 2006; DiNapoli et al, 2006; Бояджян и др., 2007]. Это предположение нуждалось в дальнейшем экспериментальном подтверждении и подкреплении независимыми доказательствами.

Среди факторов риска развития инсульта весомая роль принадлежит сахарному диабету, которым, по данным мировой статистики, сегодня страдают от 2 до 4% населения. Эпидемиологические исследования показывают, что 20% перенесших инсульт пациентов страдают сахарным диабетом, а риск смерти от инсульта среди больных сахарным диабетом в 2,8-3,8 раза выше по сравнению с таковыми, не имеющими данное заболевание. Сахарный диабет значительно осложняет течение инсульта и возможности реабилитации соответствующих больных [UKPDS Group, 1988; Bonow & Gheorghade, 2004; Мищенко и Перцева, 2009; Huysman & Mathieu, 2009].

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является динамической границей раздела между системой кровообращения и ЦНС, контролирующей приток и отток веществ, необходимых для обеспечения нормального метаболизма мозга и функционирования нейронов. Ряд экспериментальных данных свидетельствует, что одним из патологических процессов, отягощающих состояние больных острым ишемическим инсультом, является нарушение структурно-функциональной целостности ГЭБ. Так, у 70% больных инсультом наблюдается необратимое повреждение участков мозга и миграция лейкоцитов через сосудистый эндотелий мозга в центральный кровоток. Есть доказательства того, что нарушение целостности ГЭБ при инсульте обусловлено развитием индуцируемого ишемией воспалительного ответа организма. С другой стороны, нарушения на уровне ГЭБ могут, в свою очередь, способствовать увеличению притока иммуномодуляторов в ЦНС и усиливать воспалительный ответ [Becker et al, 2001; Stanimirovic et al, 2001; DiNapoli et al, 2006].

К сожалению, молекулярные патомеханизмы нарушения структурно-функциональной целостности ГЭБ при инсульте и связь между этими нарушениями и воспалительными реакциями недостаточно ясны и для их выяснения требуются разнонаправленные исследования. Здесь особый интерес представляют большие ишемическим инсультом, отягощенным сахарным диабетом, поскольку, основываясь на представленных выше данных, есть все основания полагать, что нарушение целостности ГЭБ при диабете может являться одной из причин широкой распространенности, тяжелого течения и летального исхода инсульта у больных диабетом [Lorenzi, 1990; Nogani & Mooradian, 2003; Bonow & Gheorghade, 2004].

Цель и задачи исследования. Основная цель настоящей работы состояла в выяснении молекулярных патомеханизмов развития постишемического воспалительного ответа и нарушения структурно-функциональной целостности ГЭБ при остром ишемическом инсульте, отягощенном и не отягощенном сахарным диабетом типа 2 (ДБ2), и выявлении возможной взаимосвязи между этими процессами.

Задачи исследования, в рамках отмеченной цели, включали:

- оценку статуса цитокиновой сети при остром ишемическом инсульте и сравнение функциональных активностей провоспалительных и хемотаксических цитокинов - интерлейкина(IL)-1 β , IL-6, фактора некроза

опухолей- α (TNF- α), моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1) и CXС-хемокина лиганда-1 (CXCL1) при инсульте, не отягощенном и отягощенном диабетом типа 2, в динамике развития постиншемического воспалительного ответа;

- оценку структурно-функциональной целостности ГЭБ при остром ишемическом инсульте и сравнение проницаемости ГЭБ при ишемическом инсульте, не отягощенном и отягощенном диабетом типа 2, в динамике развития постиншемического воспалительного ответа, основываясь на уровнях нейронспецифических белков – нейронспецифической энolahзы (НСЭ) и S100В и специфичных к ним антител в периферической крови;
- сравнительный анализ конечного продукта активации системы комплемента – цитолитического мембраноатакующего комплекса (МАК) при ишемическом инсульте, не отягощенном и отягощенном диабетом типа 2;
- изучение регулятора системы комплемента – фактора Н (ФН), ассоциации его уровней и Y402Н функционального полиморфизма его гена с инсультом;
- выявление наличия возможных корреляционных связей между исследуемыми параметрами.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы. С точки зрения фундаментальных знаний результаты настоящей работы в значительной степени обогащают и дополняют современные представления о молекулярных патомеханизмах генерации и развития постиншемического воспалительного ответа при остром ишемическом инсульте, отягощенном и не отягощенном сахарным диабетом типа II, у человека и о «вкладе» ассоциированных с диабетом патогенетических процессов в нарушение целостности ГЭБ и неконтролируемую гиперактивацию воспалительных реакций при инсульте.

Эти исследования впервые наглядно показывают, что патогенез острого ишемического инсульта у человека характеризуется гиперпродукцией провоспалительных и хемотаксических цитокинов - IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 и CXCL1, положительно коррелирующей с повышенными уровнями нейронспецифических белков - НСЭ и S100В и ассоциирующей с повышенным содержанием антител к этим белкам в периферической крови.

Благодаря проведенным исследованиям, также впервые установлено, что патогенез ишемического инсульта характеризуется гиперактивацией терминального каскада комплемента, приводящей к гиперпродукции МАК, положительно коррелирующей с высоким уровнем СРБ в крови соответствующих больных.

Одним из наиболее значимых результатов настоящей работы является выявление органической взаимосвязи между развитием постиншемического воспалительного ответа на системном уровне и нарушением структурно-функциональной целостности ГЭБ.

Кроме того, в результате проведенных экспериментов также впервые показано, что патогенез ишемического инсульта у человека характеризуется повышенным уровнем экспрессии мутантного 402Н аллельного варианта Y402Н полиморфизма гена ФН, что обуславливает низкое сродство последнего к своим лигандам, понижение эффективности его действия как ингибитора альтернативного каскада комплемента и, соответственно, неконтролируемую гиперактивацию альтернативного каскада комплемента, ранее наблюдаемую нами при инсульте. Установлено также, что повышенный, по сравнению с нормой, уровень экспрессии мутантного 402Н варианта Y402Н полиморфизма ФН при остром ишемическом инсульте коррелирует с повышенным уровнем СРБ в крови

соответствующих больных и в определенной степени ответственен за ассоциирующие с инсультом гиперпродукцию МАК и высокий уровень СРБ.

Далее, получены неопровержимые доказательства того, что при ИИД воспалительный ответ организма на системном уровне протекает гораздо интенсивнее, чем при ИИ, а также установлено, что ИИД характеризуется более выраженным нарушением целостности ГЭБ при ИИ. Показано, что вышеотмеченное различие между ИИ и ИИД обусловлено исходным повреждением ГЭБ при ДБ2.

С точки зрения прикладной значимости, результаты настоящего исследования позволяют рекомендовать комбинированное использование нейтропротекторов с ингибиторами провоспалительных и хемотаксических цитокинов и системы комплемента для эффективной терапии острого ишемического инсульта, реабилитации постинсультных больных, а также профилактики инсульта у больных сахарным диабетом типа 2.

Апробация работы. Основные результаты настоящей работы были представлены и обсуждены на Международной конференции «Биотехнология и здоровье-2», Армения, 2008; на II Международном конгрессе по биохимии и молекулярной биологии, Иран, 2007; на Международном междисциплинарном симпозиуме «От экспериментальной биологии к превентивной и интегративной медицине», Украина, 2008; на Международном конгрессе молодых ученых (ЕГМУ), Армения, 2010; на Международной конференции «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии», Армения, 2010; на I Международном конгрессе по аллергологии и иммунологии, Италия, 2010; а также на лабораторных семинарах и заседаниях ученого совета Института молекулярной биологии НАН РА (Ереван, 2007-2011).

Публикации. Результаты настоящего исследования отражены в 14 работах (8 статей, 6 тезисов) и опубликованных в отечественных и международных изданиях.

Объем и структура работы. Работа изложена на 140 страницах машинописного текста, иллюстрирована 12 таблицами, 24 рисунками. Состоит из списка использованных сокращений и обозначений, введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (272 источника). Обзор литературы включает 4 главы. В одной из них обобщены современные представления о структурно-функциональной значимости сети цитокинов, во второй представлена роль цитокинов как медиаторов иммунной системы, в третьей и четвертой главах подробно рассмотрены важнейшие представители семейства интерлейкинов и хемокинов, соответственно, ответственные за развитие воспалительных реакций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в лаборатории макромолекулярных комплексов Института молекулярной биологии НАН РА.

Субъектами исследования являлись больные острым ишемическим инсультом (ИИ); больные острым ИИ, отягощенным сахарным диабетом типа 2 (ИИД); больные сахарным диабетом типа 2 (ДБ2) без ожирения (во избежании высокого фонового уровня цитокинов, продуцируемых адипоцитами [Fried et al, 1998]); физически здоровые лица (ЗЛ) без наследственной отягощенности ИИ, инфарктом миокарда или ДБ2. Больные находились на лечении/учете в Медицинском центре «Святой Григорий Просветитель» и Республиканском медицинском центре «Армения» МЗ РА. Исследования были одобрены

Комитетом по этике Института молекулярной биологии НАН РА (IORG 0003427).

Анализ сыворотки крови на наличие специфических антител к НСЭ и S100B проводили методами электрофореза в полиакриламидном геле (в присутствии додецилсульфата натрия) и Вестерн-блота, согласно инструкциям Bio-Rad Laboratories, Inc. (США) [номера по каталогу - 165-3301 и 170-3930]. **Концентрации НСЭ и S100B** в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА/ELISA) при использовании коммерческих наборов реагентов SMART NSE ELISA kit и SMART S100B ELISA kit (SYN-X Pharma Inc., Канада), согласно инструкциям производителя. Концентрации выражали в нг на мл сыворотки. **Концентрации IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 и CXCL1** в сыворотке крови определяли методом ИФА при использовании коммерческих наборов реагентов (Quantikine ELISA Kit; R&D Systems Europe Ltd.), согласно инструкциям производителя. Концентрации выражали в пг на мл сыворотки. **Определение уровней МАК** в образцах сыворотки крови субъектов исследования проводили методом ИФА, согласно ранее описанной процедуре [Morgan et al, 1988], и выражали в мкг на мл сыворотки. **Уровни СРБ** в сыворотке крови определяли иммунонефелометрическим методом при использовании коммерческого набора реагентов (Dade Behring, Inc., Германия), согласно инструкции производителя. Концентрацию выражали в мг на литр сыворотки. **Определение уровней ФН** в сыворотке крови проводили методом ИФА, согласно ранее описанной процедуре [Накобыан et al, 2008]. Концентрацию выражали в мг на л сыворотки. **Анализ функционального T \rightarrow C однонуклеотидного полиморфизма (1277T>C)** девятого экзона гена ФН (rs1061170), приводящего к замещению тирозина (Y) на гистидин (H) в позиции 402 (Y402H) полипептидной цепи ФН, проводили согласно ранее описанному методу [Накобыан et al, 2008].

Статистическую обработку полученных данных проводили, используя программные пакеты «GraphPad Prism 3.03» (GraphPad Software, Inc., США) и «SPSS 13.0». (IBM SPSS, Inc., США). Данные предварительно анализировали при помощи W-критерия Шапиро-Уилка для определения типа их распределения. В случае нормального распределения данных их обработка включала методы параметрической статистики (непарный t-тест Стюдента, корреляционный анализ Спирмана), в случае отклонения от нормального распределения применяли методы непарметрической статистики (U-тест Манна-Уитни, корреляционный анализ Пирсона). Обработку данных, полученных при изучении функционального полиморфизма гена ФН, проводили при использовании программного пакета «SNPAnalyzer 2.0» [Yoo et al, 2005]. Распределение частот встречаемости генотипов исследуемого полиморфизма гена ФН в обследованных группах проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот встречаемости генотипов, аллелей и носителей аллелей между различными группами использовали χ^2 критерий Пирсона. Значения $p \leq 0,05$ были приняты как статистически достоверные.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Сравнительный анализ уровней провоспалительных и хемотаксических цитокинов в крови больных ИИ, ИИД, ДБ2 и ЗЛ.

Для оценки статуса цитокиновой сети при остром ишемическом инсульте у человека и сравнения функциональной активности провоспалительных и хемотаксических цитокинов при ИИ и ИИД нами был проведен анализ уровней IL-1 β ,

IL-6, TNF- α , MCP-1 и CXCL1 в сыворотке крови больных ИИ, ИИД, ДБ2 и ЗЛ.

Согласно полученным данным, с 1 по 5 день от начала инсульта наблюдается значительное и достоверное повышение уровней всех определяемых цитокинов в сыворотке крови больных ИИ и ИИД по сравнению с нормой ($p < 0,05$). При этом, уровни цитокинов при ИИД достоверно превышают аналогичные параметры при ИИ ($p < 0,05$). Далее, согласно полученным нами данным, максимально высокие уровни цитокинов наблюдаются на 1 день от начала инсульта, затем концентрации цитокинов начинают понижаться. К 7 дню уровни IL-1 β , IL-6, TNF- α и CXCL1 практически доходят до характерных для нормы значений, однако уровень MCP-1 все еще достоверно превышает уровень нормы. В случае больных ДБ2 нами не были обнаружены статистически достоверные изменения в уровнях цитокинов в сыворотке крови по сравнению с нормой ($p > 0,05$). На рис. 1 показана динамика изменения уровня IL-1 β при ИИ и ИИД на 1-7 дни от начала инсульта. Согласно полученным данным, на 1 день от начала инсульта уровни IL-1 β в сыворотке крови больных ИИД и ИИ достоверно превышают те же показатели ЗЛ ($p < 0,05$) в среднем в 8,9 и 5,65 раз, соответственно, в то время как уровни этого интерлейкина в сыворотке крови больных ДБ2 ($M \pm \sigma$: 6,0 \pm 1,1 пг/мл) практически не отличались от того же параметра в норме ($M \pm \sigma$: 5,1 \pm 0,8 пг/мл). Уровень IL-1 β в сыворотке крови больных ИИД в среднем в 1,6 раз достоверно превышал аналогичный параметр при ИИ ($p < 0,05$). На рис. 2 показана динамика изменения уровня IL-6 при ИИ и ИИД на 1-7 дни от начала инсульта. Согласно полученным данным, на 1 день от начала инсульта уровни IL-6 в сыворотке крови больных ИИД и ИИ достоверно превышают те же показатели в сыворотке крови у ЗЛ ($p < 0,05$) в среднем в 3 и 2 раза, соответственно, в то время как уровни этого интерлейкина в сыворотке крови больных ДБ2 ($M \pm \sigma$: 19,2 \pm 3,8 пг/мл) практически не отличались от того же параметра в норме ($M \pm \sigma$: 18,4 \pm 3,1 пг/мл). Уровень IL-6 в сыворотке крови больных ИИД в среднем в 1,51 раз достоверно превышал аналогичный параметр при ИИ ($p < 0,05$). На рис. 3 показана динамика изменения уровня TNF- α при ИИ и ИИД на 1-7 дни от начала инсульта. Согласно полученным данным, на 1 день от начала инсульта уровни TNF- α в сыворотке крови больных ИИД и ИИ достоверно превышают те же показатели ЗЛ ($p < 0,05$) в среднем в 5,2 и 3,7 раз, соответственно, в то время как уровни этого интерлейкина в сыворотке крови больных ДБ2 ($M \pm \sigma$: 15,00 \pm 2,9 пг/мл) практически не отличались от того же параметра в норме ($M \pm \sigma$: 13,37 \pm 2,5 пг/мл). Уровень TNF- α в сыворотке крови больных ИИД в среднем в 1,38 раз достоверно превышал аналогичный параметр при ИИ ($p < 0,05$). На рис. 4 показана динамика изменения уровня MCP-1 при ИИ и ИИД на 1-7 дни от начала инсульта. Согласно полученным данным, на 1 день от начала инсульта уровни MCP-1 в сыворотке крови больных ИИД и ИИ достоверно превышают те же показатели в сыворотке крови у ЗЛ ($p < 0,05$) в среднем в 3,4 и 2,4 раза, соответственно, в то время как уровни этого интерлейкина в сыворотке крови больных ДБ2 ($M \pm \sigma$: 280 \pm 49,3 пг/мл) практически не отличались от того же параметра в норме ($M \pm \sigma$: 254 \pm 46,2 пг/мл). Уровень MCP-1 в сыворотке крови больных ИИД в среднем в 1,43 раз достоверно превышал аналогичный параметр при ИИ ($p < 0,05$). На рис. 5 показана динамика изменения уровня CXCL1 при ИИ и ИИД на 1-7 дни от начала инсульта. Согласно полученным данным, на 1 день от начала инсульта уровни CXCL1 в сыворотке крови больных ИИД и ИИ достоверно превышают те же показатели в сыворотке крови у ЗЛ ($p < 0,05$) в среднем в 2,43 и 1,62 раза, соответственно, в то время как уровни этого интерлейкина в сыворотке крови больных ДБ2 ($M \pm \sigma$: 180 \pm 31,6 пг/мл) практически не

отличались от того же параметра в норме ($M \pm \sigma$: $120 \pm 20,7$ пг/мл). Уровень CXCL1 в сыворотке крови больных ИИД в среднем в 1,5 раз достоверно превышал аналогичный параметр при ИИ ($p < 0,05$). Среднестатистические значения уровней всех изучаемых цитокинов для всех исследуемых групп представлена в табл. 1.

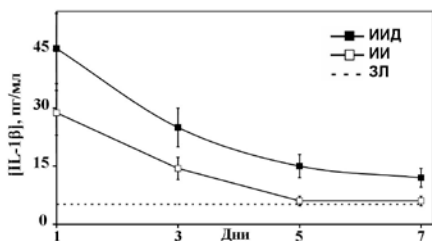


Рисунок 1. Динамика изменения уровня IL-1β ($M \pm \sigma$) в сыворотке крови при ИИ и ИИД на 1-7 дни от начала инсульта.

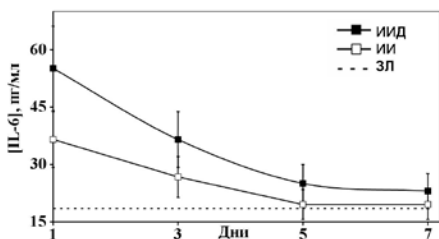


Рисунок 2. Динамика изменения уровня IL-6 ($M \pm \sigma$) в сыворотке крови при ИИ и ИИД на 1-7 дни от начала инсульта.

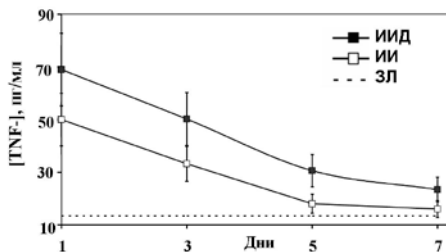


Рисунок 3. Динамика изменения уровня TNF-α ($M \pm \sigma$) в сыворотке крови при ИИ и ИИД на 1-7 дни от начала инсульта.

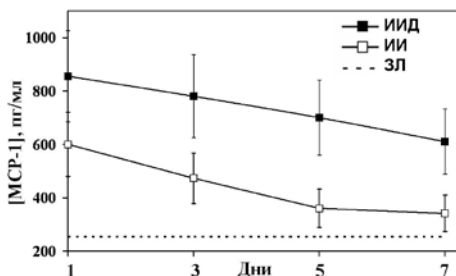


Рисунок 4. Динамика изменения уровня MCP-1 ($M \pm \sigma$) в сыворотке крови при ИИ и ИИД на 1-7 дни от начала инсульта.

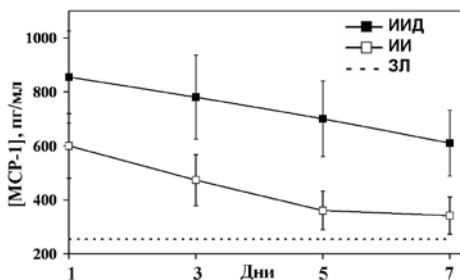


Рисунок 5. Динамика изменения уровня CXCL1 ($M \pm \sigma$) в сыворотке крови при ИИ и ИИД на 1-7 дни от начала инсульта.

Таблица 1. Концентрации (пг/мл) цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1, CXCL1 ($M \pm \sigma$) в сыворотке крови больных ИИД, ИИ (1 день), ДБ2 и ЗЛ.

Группа	[IL-1 β]	[IL-6]	[TNF- α]	[MCP-1]	[CXCL1]
ИИД ^a	45,4 \pm 9,1	55,1 \pm 10,8	69,00 \pm 13,7	855 \pm 140,4	180 \pm 31,6
ИИ ^b	28,8 \pm 4,8	36,5 \pm 6,7	50,00 \pm 9,6	600 \pm 101,7	120 \pm 20,7
ДБ2 ^c	6,0 \pm 1,1	19,2 \pm 3,8	15,00 \pm 2,9	280 \pm 49,3	78 \pm 13,2
ЗЛ ^c	5,1 \pm 0,8	18,4 \pm 3,1	13,37 \pm 2,5	254 \pm 46,2	74 \pm 12,9

a против б/в/г - $p < 0,05$; б против в/г - $p < 0,05$; в против г - $p > 0,05$.

2. Сравнительный анализ уровней нейронспецифических белков НСЭ и S100В и специфичных к ним антител в крови больных ИИ, ИИД, ДБ2 и ЗЛ и выявление возможной корреляции между уровнями этих белков и уровнями провоспалительных и хемотаксических цитокинов.

Для оценки структурно-функциональной целостности ГЭБ при остром ишемическом инсульте у человека и сравнения проницаемости ГЭБ при ИИ и ИИД мы определили уровни нейронспецифических белков НСЭ и S100В и специфичных к ним антител в сыворотке крови больных ИИ, ИИД, ДБ2 и ЗЛ.

Согласно полученным данным, достоверно повышенные концентрации НСЭ и S100В в сыворотке крови по сравнению с нормой наблюдались во все дни от начала инсульта. Динамика изменений уровней НСЭ и S100В в значительной степени отличалась от таковой, наблюдаемой в случае цитокинов. Максимально высокие концентрации этих белков наблюдаются на 3 день от начала инсульта и далее они продолжали оставаться на том же уровне, включая 7 день. На рис. 6 и 7 показана динамика изменения уровней нейронспецифичных белков в сыворотке крови при ИИ и ИИД на 1-7 дни от начала инсульта. Как и в случае цитокинов, уровни НСЭ и S100В при ИИД достоверно превышают аналогичные параметры при ИИ ($p < 0,05$).

В сыворотке крови больных ИИ, ИИД и ДБ2 нами также наблюдалось наличие специфичных к НСЭ и S100В антител.

Далее, для выявления возможной взаимосвязи между постишемическим воспалительным ответом и структурно-функциональной целостностью ГЭБ при ИИ и ИИД нами проведен анализ корреляции между уровнями нейронспецифических белков, с одной стороны, и уровнями провоспалительных и хемотаксических цитокинов, с

другой, в крови у субъектов исследования. Согласно полученным данным, у больных ИИ и ИИД наблюдалась положительная корреляция между уровнями НСЭ и S100В, с одной стороны, и уровнями IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 и CXCL1, с другой, что свидетельствует о взаимосвязи процессов, приводящих к изменению этих параметров при инсульте.

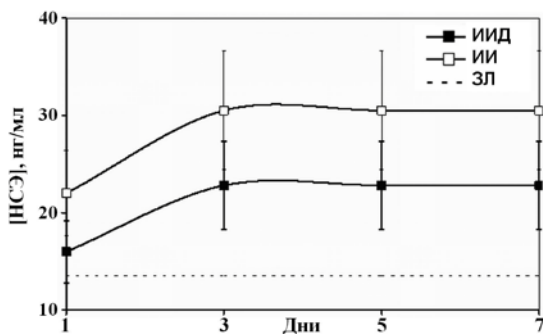


Рисунок 6. Динамика изменения уровня НСЭ ($M \pm \sigma$) в сыворотке крови при ИИ и ИИД на 1-7 дни от начала инсульта.

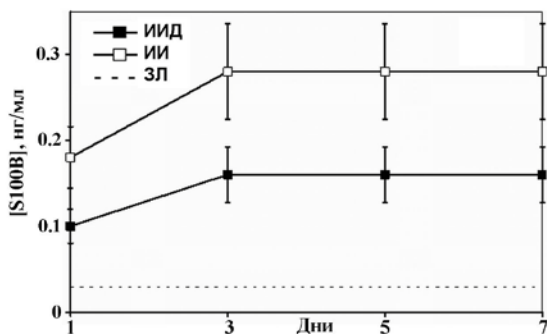


Рисунок 7. Динамика изменения уровня S100В ($M \pm \sigma$) в сыворотке крови при ИИ и ИИД на 1-7 дни от начала инсульта.

3. Сравнительный анализ уровней МАК в крови больных ИИ, ИИД, ДБ2 и ЗЛ.

Для оценки цитотоксической активности системы комплемента при остром ишемическом инсульте у человека и сравнения степени выраженности этой активности при ИИ и ИИД мы определили уровни МАК в крови больных ИИ, ИИД, ДБ2 и ЗЛ.

Таблица 2. Уровни МАК ($M \pm \sigma$) в крови больных ИИД, ИИ (1 день), ДБ2 и ЗЛ

Группа	[МАК], мкг/мл
ИИД ^а	13,7 \pm 3,3
ИИ ^б	10,7 \pm 2,6
ДБ2 ^в	11,1 \pm 3,3
ЗЛ ^г	6,9 \pm 1,7

а против *б*/*в*/*г* - $p < 0,05$; *б* против *в* - $p > 0,05$; *б* против *г* - $p < 0,05$; *в* против *г* - $p < 0,05$.

В результате проведенных исследований было установлено, что уровни МАК в сыворотке крови больных ИИ и ИИД в среднем в 1,6 и 2 раза превышают уровни МАК в сыворотке крови ЗЛ ($p < 0,05$). При этом уровень МАК у больных ИИД в среднем в 1,3 раза превышал аналогичный показатель больных ИИ ($p < 0,05$). Уровни МАК у больных ДБ2 в среднем в 1,6 раза превышали уровни МАК ЗЛ ($p < 0,05$) и практически не отличаются от таковых, наблюдаемых при ИИ ($p > 0,05$). Полученные данные представлены в табл. 2.

Комплемент представляет собой важнейший эффектор иммунной системы организма, обеспечивающей в норме элиминацию патогенов, некротических и апоптотических клеточек и иммунных комплексов. Однако, неконтролируемая активация комплемента в патологических условиях может приводить к повреждению здоровых тканей организма [Sarma & Ward, 2011].

На моделях инсульта было показано, что комплемент играет важную роль в исходе инсульта, и что при истощении или инактивации компонентов комплемента неврологический дефицит после инсульта выражен в гораздо меньшей степени [DiNapoli et al, 2006]. Несколько исследований, в том числе и проведенных в нашей лаборатории, демонстрируют повышение, по сравнению с нормой, активности системы комплемента, уровней его компонентов и образующихся из них при активации комплемента продуктов при остром ишемическом инсульте как на уровне ЦНС, так и на периферии (кровь) [Lindsberg et al, 1996; Pedersen et al, 2004; Бояджян и др., 2004; Boyajyan et al, 2005; Айвазян и др., 2005; Бояджян и др., 2007; Széplaki et al, 2009].

Существуют три пути активации комплемента - классический, альтернативный и лектиновый, отличающиеся составом компонентов и пусковыми механизмами. Конечный этап, так называемый терминальный каскад комплемента, идентичен для всех трех путей. Этот каскад запускается расщеплением С3 компоненты комплемента на активные фрагменты (С3а и С3б) под действием С3-конвертазы (продукта активации всех трех путей) и приводит к формированию МАК или терминального комплекса комплемента. Встраиваясь в мембрану клетки, МАК приводит к ее перфорации и лизису клетки [Sarma & Ward, 2011].

В наших предыдущих исследованиях было показано, что в крови у больных ИИ наблюдается активация как альтернативного, так и классического каскадов комплемента, а также повышенное содержание ряда его компонентов, в том числе и С3 компоненты [Бояджян и др., 2004; Boyajyan et al, 2005; Айвазян и др., 2005; Бояджян и др., 2007]. Результаты настоящего исследования являются еще одним доказательством гиперактивации системы комплемента при ИИ, а кроме того демонстрируют, что наблюдаемые в случае ИИД нарушения функциональной активности комплемента проявляются в большей степени.

4. Сравнительный анализ уровней СРБ в крови больных ИИ, ИИД, ДБ2 и ЗЛ и выявление возможной корреляции между уровнями СРБ и уровнями МАК.

В настоящей работе мы сравнили уровни СРБ в крови больных ИИ и ИИД (на 1 день от начала инсульта), а также больных ДБ2 и ЗЛ и провели анализ на выявление возможной корреляции между уровнями СРБ и МАК у субъектов исследования.

Согласно полученным данным, содержание СРБ в сыворотке крови больных ИИ и ИИД достоверно превышало характерный для ЗЛ уровень в среднем в 6 и 7,5 раз соответственно ($p < 0,05$). При этом уровень СРБ у больных ИИД в среднем в 1,2 раза превышал аналогичный показатель больных ИИ ($p < 0,05$). При ДБ2 уровень СРБ в

сыворотке крови был намного ниже, чем в случае ИИ и ИИД (в среднем в 2,7 и 3,3 раза соответственно; $p < 0,05$), однако превышал таковой ЗЛ (в среднем в 2,3 раза; $p < 0,05$). Результаты статистического анализа полученных данных представлены в табл.3. Отмеченные сдвиги в уровнях СРБ у больных ИИ, ИИД и ДБ2 положительно коррелировали с наблюдаемыми нами повышенными уровнями МАК в крови этих больных. СРБ стимулирует иммунные/воспалительные реакции, в том числе фагоцитоз, участвует во взаимодействии Т- и В-лимфоцитов и активирует систему комплемента [Perys & Hirschfield, 2003]. Последнее объясняет наблюдаемую нами положительную корреляцию между уровнями МАК, конечного продукта активации комплемента, и уровнями СРБ в крови больных ИИ, ИИД и ДБ2.

Таблица 3. Уровни СРБ ($M \pm \sigma$) в крови больных ИИД, ИИ (1 день), ДБ2 и ЗЛ

Группа	[СРБ], мг/л
ИИД ^а	26,9 \pm 10,3
ИИ ^б	21,9 \pm 8,6
ДБ2 ^в	8,20 \pm 3,4
ЗЛ ^г	3,6 \pm 1,4

а против б/в/г - $p < 0,05$; б против в/г - $p < 0,05$; в против г - $p < 0,05$.

5. Сравнительное определение уровней ФН и его 402Н и 402У вариантов в крови больных ИИ и ЗЛ, анализ функционального полиморфизма Y402Н гена ФН при ИИ и выявление возможной корреляции между уровнями 402Н и 402У вариантов ФН и уровнем СРБ.

ФН ингибирует альтернативный путь активации комплемента, связывая продукт протеолитического расщепления С3 компоненты комплемента - С3b, ускоряя распад С3 и С5 конвертаз и действуя в качестве кофактора фактора I - пептидазы, катализирующей гидролитическую деградацию С3b [Sarma & Ward, 2011]. Распространенный Т>С одиночный нуклеотидный полиморфизм девятого экзона гена ФН (rs1061170), приводящий к замещению тирозина (Tyr/Y) на гистидин (His/H) в 402 положении полипептидной цепи ФН (Y402Н), затрагивает область (SCR7 регион гена) в которой локализован центр связывания ряда лигандов ФН, включая С3b [Morgan et al, 2011] и СРБ [Giannakis et al, 2003]. С учетом данных, ранее полученных в нашей лаборатории о гиперактивации альтернативного каскада комплемента при остром ишемическом инсульте у человека [Бояджян и др., 2004; Воуаюян et al, 2005; Айвазян и др., 2005; Бояджян и др., 2007], нам представлялось интересным исследовать ФН при данной патологии. В настоящей работе впервые проведен сравнительный анализ уровней ФН и его 402Н и 402У вариантов в крови у больных ИИ (1 день от начала инсульта) и ЗЛ. Проведена также оценка частот встречаемости аллелей и носителей аллелей полиморфизма Y402Н ФН в отмеченных группах субъектов исследования. Кроме того, проведен анализ на выявление возможной корреляции между уровнями 402Н и 402У вариантов ФН и уровнем СРБ у субъектов исследования.

Согласно полученным данным, уровни ФН в сыворотке крови больных ИИ достоверно превышали уровни ФН в крови ЗЛ ($(M \pm \sigma)$ 294,1 \pm 44,8 мг/л против 265,6 \pm 28,4 мг/л; $p < 0,05$). Распределение частот встречаемости генотипов исследуемого Y402H полиморфизма ФН соответствовало уравнению Харди-Вайнберга. Результаты проведенных нами исследований не выявили статистически достоверных различий в распределении частот встречаемости генотипов, аллелей и носителей аллелей Y402H полиморфизма ФН у больных ИИ и ЗЛ ($p > 0,05$). Данные относительно ассоциации Y402H полиморфизма ФН с ИИ, представленные ранее в двух работах, были противоречивы [Robert et al, 2006; Volcik et al, 2008]. Полученные нами данные, свидетельствующие об отсутствии ассоциации между Y402H полиморфизмом ФН и ИИ находятся в соответствии с одной из отмеченных работ [Volicik et al, 2008] и в противоречии с другой [Robert et al, 2006], отражая, таким образом, популяционные особенности.

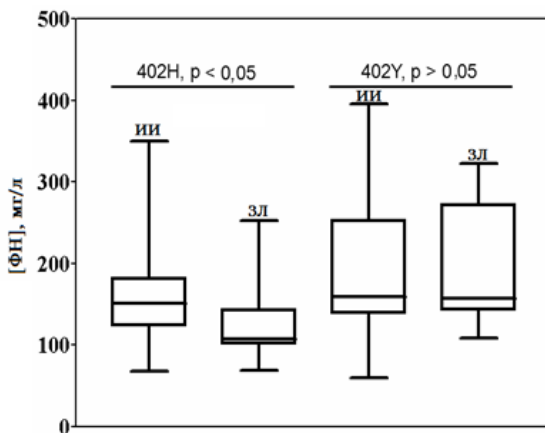


Рисунок 8. Уровни 402H и 402Y в сыворотке крови гетерозиготных больных ИИ и ЗЛ. Данные представлены в виде диаграмм размаха «прямоугольники-отрезки» (box-whiskers), где прямоугольники отображают интерквартильные расстояния (размах от 25-го до 75-го процентиля), вертикальные отрезки вне прямоугольников - размах от 10-го до 90-го процентиля. Медиана отмечена горизонтальной линией.

Как показал дальнейший анализ полученных данных, у гетерозиготных по 402H аллельному варианту ФН больных ИИ уровень 402H в сыворотке крови достоверно превышал таковой гетерозиготных по 402H аллельному варианту ФН ЗЛ ($p < 0,05$), тогда как средние значения уровня 402Y в сыворотке крови между больными ИИ и ЗЛ практически не отличались ($p > 0,05$). Эти данные свидетельствуют о том, что уровень ФН больных ИИ превышает таковой ЗЛ за счет повышенной экспрессии его мутантной 402H аллели, что может быть ответственно за ранее наблюдаемую гиперактивацию альтернативного каскада комплемента при ИИ [Бояджян и др., 2004; Vouajuan et al, 2005; Айвазян и др., 2005; Бояджян и др., 2007], поскольку сродство 402H мутантного варианта ФН к лигандам ФН ниже, чем у дикого 402Y варианта ФН [Giannakis et al, 2003]. Иными словами, низкое сродство ФН к такому лиганду, как C3b (как было отмечено ранее, связывание ФН с C3b ингибирует активацию альтернативного каскада

комплемента), обусловленное наличием 402Н мутантной аллели, ответственно за то, что у носителей 402Н мутантной аллели ФН как ингибитор альтернативного каскада комплемента менее эффективен, чем у носителей дикой 402У аллели ФН. Полученные данные представлены на рис. 8. Корреляционный анализ выявил наличие положительной корреляции между уровнями 402Н варианта ФН и уровнями СРБ в сыворотке крови у гетерозиготных по Y402Н полиморфизму ФН больных ИИ, в то время как у этой группы больных ИИ не наблюдалось какой-либо достоверной корреляции между уровнями 402У варианта ФН и уровнями СРБ в сыворотке крови. Эти данные, скорее всего, также отражают более низкое сродство 402Н варианта ФН к лигандам ФН (одним из которых является СРБ), по сравнению с 402У вариантом ФН [Giannakis et al, 2003; Laine et al, 2007]. В этой связи следует отметить, что, если в свободном виде СРБ индуцирует активацию системы комплемента [Pepys & Hirschfield, 2003], то в связанном состоянии, т.е. в комплексе с ФН, он интенсифицирует ингибирование альтернативного каскада комплемента под действием ФН [Mold et al, 1999; Giannakis et al, 2003].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что высокие уровни СРБ и гиперактивация альтернативного каскада комплемента при ишемическом инсульте в определенной степени обусловлены также высокими уровнями экспрессии 402Н мутантного варианта ФН у соответствующих больных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе нами впервые при исследовании относительно большой когорты больных острым ишемическим инсультом проведен сравнительный анализ динамики изменений уровней IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 и CXCL1 в крови больных ИИ и ИИД с 1 по 7 день от начала инсульта. Кроме того, с целью оценки структурно-функциональной целостности ГЭБ при остром ишемическом инсульте у человека и выявления взаимосвязи между состоянием ГЭБ и интенсивностью развития постишемического воспалительного ответа организма при отмеченном заболевании в крови больных ИИ и ИИД параллельно с уровнями вышеотмеченных цитокинов были определены также уровни других индикаторов воспаления - СРБ и МАК, и нейронспецифических белков - НСЭ и S100В и специфичных к ним антител.

Полученные данные свидетельствуют, что как ИИ, так и ИИД характеризуются нарушением структурно-функциональной целостности ГЭБ, что отражается на уровне повышения, по сравнению с нормой, концентрации нейронспецифических белков в сыворотке крови больных ИИ и ИИД, коррелирует с повышением концентрации провоспалительных и хемотаксических цитокинов в сыворотке крови отмеченных больных и ассоциирует с высокими уровнями МАК и СРБ. При этом ИИД характеризуется более выраженным нарушением целостности ГЭБ и более интенсифицированным процессом развития воспалительных реакций чем ИИ, что, по-видимому, обусловлено исходным повреждением ГЭБ при ДБ2.

Результаты наших экспериментов свидетельствуют о наличии органической взаимосвязи между развитием постишемического воспалительного ответа организма и нарушением структурно-функциональной целостности ГЭБ при остром ишемическом инсульте у человека. Скорее всего, нарушение целостности ГЭБ индуцируется развитием триггируемого ишемией воспалительного ответа в мозге. С другой стороны, нарушение проницаемости ГЭБ может, в свою очередь, усиливать воспалительный ответ как на уровне мозга, способствуя увеличению притока иммуномодуляторов в ЦНС, так и на

системном уровне, поскольку локальное поражение сосудистого эндотелия в дальнейшем приобретает генерализованный характер, стимулируя развитие системного «острофазового ответа» на периферии.

Результаты настоящего исследования однозначно свидетельствуют, что отягощенность инсульта сахарным диабетом второго типа в значительной степени интенсифицирует как нарушение проницаемости ГЭБ, так и прогрессию воспалительных реакций при данном заболевании, что, по-видимому, и является одной из причин повышенной инцидентности, более тяжелого течения и большей частоты негативных исходов инсульта у больных ДБ2 по сравнению с теми, кто им не страдает. Так, основываясь на полученных данных по сравнительному определению уровней индикаторов воспаления - провоспалительных и хемотаксических цитокинов, МАК и СРБ в крови больных ИИ и ИИД, становится очевидным, что при ИИД негативные эффекты постишемического воспалительного ответа, в частности, его переход на системный уровень, выражены в гораздо большей степени, чем в случае ИИ.

Одновременно, основываясь на полученных в настоящей работе данных по сравнительному определению уровней нейронспецифических белков НСЭ и S100В в крови больных ИИ и ИИД, очевидно, что при инсульте, отягощенном сахарным диабетом второго типа, нарушение структурно-функциональной целостности ГЭБ выражено в большей степени, чем при инсульте, не отягощенном диабетом. Воспалительные процессы играют важную патогенетическую роль как в возникновении ДБ2, так и в развитии его поздних осложнений [Huysman & Mathieu, 2009; Donath & Shoelson, 2011], что, по-видимому, является одной из причин наблюдаемого нами нарушения целостности ГЭБ при ДБ2 и объясняет гораздо более интенсивное развитие постишемического воспалительного ответа и более выраженную степень повреждения целостности ГЭБ при ИИД чем при ИИ, наглядно демонстрируемое результатами настоящего исследования.

Отдельное место в проведенном исследовании занимает изучение ФН и его Y402H полиморфизма при остром ишемическом инсульте у человека, а также выявление корреляции между повышенной экспрессией мутантного 402H варианта ФН и СРБ. Полученные данные свидетельствуют, что уровень ФН у больных ИИ превышает таковой ЗЛ за счет повышенной экспрессии мутантной 402H аллели гена ФН, что может быть ответственно за гиперактивацию альтернативного каскада комплемента при ИИ [Бояджян и др., 2004; Bouayjan et al, 2005; Айвазян и др., 2005; Бояджян и др., 2007], а также одновременно с цитокинами являться одним из факторов, ответственных за высокие уровни СРБ [DiNapoli et al, 2006] при остром ишемическом инсульте.

ВЫВОДЫ

1. Патогенез ишемического инсульта характеризуется гиперпродукцией провоспалительных и хемотаксических цитокинов - IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 и CXCL1, положительно коррелирующей с повышенными уровнями нейронспецифических белков - НСЭ и S100В и ассоциирующей с повышенным содержанием антител к этим белкам в периферической крови.
2. Патогенез ишемического инсульта характеризуется гиперактивацией терминального каскада комплемента, приводящей к гиперпродукции мембраноатакующего комплекса, положительно коррелирующей с повышенным уровнем С-реактивного белка в периферической крови.

3. Патогенез ишемического инсульта характеризуется наличием органической взаимосвязи между развитием постишемического воспалительного ответа организма на системном уровне и нарушением структурно-функциональной целостности ГЭБ.
4. Патогенез ишемического инсульта характеризуется повышенной экспрессией мутантного 402Н варианта Y402Н полиморфизма фактора Н, что обуславливает низкое сродство фактора Н к своим лигандам, понижение эффективности его действия как ингибитора альтернативного каскада комплемента и, соответственно, неконтролируемую гиперактивацию альтернативного каскада комплемента при этой патологии.
5. Повышенный по сравнению с нормой уровень экспрессии мутантного 402Н варианта Y402Н полиморфизма фактора Н при ишемическом инсульте коррелирует с повышенным уровнем С-реактивного белка в периферической крови и в определенной степени ответственен за гиперпродукцию мембраноатакующего комплекса и высокий уровень С-реактивного белка, ассоциирующих с данной патологией.
6. При ишемическом инсульте, отягощенном сахарным диабетом второго типа, воспалительный ответ организма на системном уровне протекает гораздо интенсивнее, чем при инсульте, не отягощенном диабетом.
7. Ишемический инсульт, отягощенный сахарным диабетом второго типа, характеризуется более выраженным нарушением целостности ГЭБ чем инсульт, не отягощенный диабетом.
8. Более интенсифицированный процесс развития воспалительных реакций и выраженное нарушение целостности ГЭБ при ишемическом инсульте, отягощенном сахарным диабетом второго типа, чем при инсульте, не отягощенном диабетом обусловлено исходным повреждением ГЭБ при диабете.
9. Сочетание нейротекторов с ингибиторами провоспалительных и хемотаксических цитокинов и системы комплемента может быть рекомендовано в качестве эффективного терапевтического средства для лечения больных острым ишемическим инсультом, реабилитации постинсультных больных, а также профилактики инсульта у больных сахарным диабетом типа 2.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Аракелова Э.А., Овсепян М.Р., Бояджян А.С., Аракелян А.А., Геворкян А.А., Мамиконян А.А. Мембраноатакующий комплекс, как показатель гиперактивации комплемента при сахарном диабете типа 2. Сахарный диабет (Москва), 2011, 52(3), 17-21.
2. Arakelova E.A., Arakelyan A.A., Mkrtchyan G.M., Hovsepian M.R., Ayvazyan V.A., Avetisyan G.V., Boyajyan A.S. Molecular pathomechanisms of ischemic stroke. Medical Science of Armenia, 2011, 1, 88-99.
3. Аракелова Э.А., Аракелян А.А., Бояджян А.С., Цаканова Г.В., Акопян С.С., Морган Б.П., Григорян Г.С. Сравнительное определение уровней терминального комплекса комплемента при ишемическом инсульте, отягощенном и не отягощенном сахарным

- диабетом. Иммунология (Москва), 2010, 31 (6), 316-319.
4. Arakelova E.A. The terminal complement complex in ischemic stroke. *Electronic Journal of Natural Sciences (NAS RA)*, 2010, 2(15), 46-48.
 5. Аракелова Э.А. Терминальный комплекс комплемента в крови больных сахарным диабетом. *Кровь*, 2010, 1(10), 92-94.
 6. Arakelyan A., Hakobyan S., Zhamgaryan L., Hambardzumyan M., Arakelova E., Hovsepyan T., Grigoryan G., Morgan P.B., Boyajyan A. Complement factor H Y402H functional polymorphism in patients with ischemic stroke. *Biological Journal of Armenia*, 2010, 62 (2), 34-39.
 7. Бояджян А.С., Аракелова Э.А., Айвазян В.А., Манукян Л.А. Интерлейкины и хемокины при ишемическом инсульте, осложненном и не осложненном диабетом. Цитокины и воспаление (Санкт Петербург), 2008, 7(1), 41-45.
 8. Бояджян А.С., Аракелова Э.А., Айвазян В.А., Мкртчян Г.М., Цаканова Г.В., Аветисян Г.В., Оганесян Л.П., Хоецян А.Г., Манукян Л.А., Аракелян А.А., Овсепян М.Р., Маилян К.Р., Акопян С.С. Взаимосвязь между постишемическим воспалительным ответом и нарушением целостности гематоэнцефалического барьера, *Кровь*, 2007, 1(5), 47-54.

Материалы конференций

9. Boyajyan A., Arakelova E., Tsakanova G., Arakelyan A., Ayvazyan V., Hakobyan S., Morgan P.B., Hovsepyan T., Devejyan H., Avetisyan G. Over-production of membrane-attack complex in stroke. Abstracts of the I International Congress on Controversies in Allergology and Immunology, Sorrento, Italy, 2010, abstract # A-225-0018-00042.
10. Tsakanova G., Arakelova E., Hovsepyan T., Zhamgaryan L., Hambardzumyan M., Avetisyan G., Ayvazyan V., Arakelyan A., Boyajyan A. Blood levels of membrane-attack complex, complement factor H Y402H functional polymorphism, C-reactive protein and soluble antioxidant system capacity in patients with ischemic stroke. Materials of the International Conference "Actual Issues in Haematology and Transfusiology", Yerevan-Stepanakert, 2010; published in: *Blood*, 2010, 1(10), 21-22.
11. Arakelyan A., Boyajyan A., Hovsepyan T., Hambardzumyan M., Arakelova E. Systemic inflammatory response in human ischemic stroke. Abstracts of the International Congress of Young Scientists (Yerevan State Medical University), Yerevan, 2010; published in: *The New Armenian Medical Journal*, 2010, 4(1), 20-21.
12. Boyajyan A.S., Arakelova E.A., Grigoryan G.S., Sim R.B., Arakelyan A.A., Manukyan L.L., Avetisyan G.A., Ayvazyan V.A. Involvement of inflammatory mediators in pathogenesis of ischemic stroke. Proceedings of the International Interdisciplinary Symposium "From Experimental Biology to Preventive and Integrative Medicine", Crimea, Ukraine, 2008, p.20-22.
13. Arakelova E. Neuron-specific proteins as indicators of brain blood barrier disturbances in stroke. Proceedings of the International Conference "Biotechnology and Health-2", Yerevan, 2008, p.148-149.
14. Manukyan L., Arakelova E., Ayvazyan V., Avetisyan G., Arakelyan A., Hovsepyan M., Boyajyan A. Cytokines and neuro-specific proteins as indicators of neuro-inflammation and systemic inflammation in stroke. Plenary Lectures and Young Colleagues Thesis Presentation of the IX Iranian Congress of Biochemistry and the II International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Shiraz-Iran, IRI, 2007; published in: *Achieves of Iranian Medicine*, 2007, 10(4(Suppl.1)), p. S15.

Առաքելովա Էլինա Ալեքսանդրի

ԲՈՐԲՈՔԱՅԻՆ ՊԱՏԱՍԽԱՆԻ ԶԱՐԳԱՑՄԱՆ ՄՈՒԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ
ՊԱԹՈՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ ԵՎ ՆՐԱ ՓՈԽԿԱՊԱԿՑՎԱԾՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԱՐՅՈՒՆՈՒՂԵՂԱՅԻՆ ԿԱՐԳԱՎԻՃԱԿԻ ՇԵՏ ՍՈՒՐ ԻՇԵՄԻԿ ԿԱԹՎԱԾԻ
ԺԱՄԱՆԱԿ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բաներ՝ արյունուղեղային պատնեշ, երկրորդ տիպի շաքարախտ, հետիշտմիկ բորբոքային պատասխան, թաղանթ-գրոհող համալիր, նեյրոն-սպեցիֆիկ սպիտակուցներ, սուր իշեմիկ կաթված, ցիտոկիններ, H գործոնի Y402H ֆունկցիոնալ պոլիմորֆիզմ:

Տվյալ աշխատանքի հիմնական նպատակն է հանդիսացել հետիշտմիկ բորբոքային պատասխանի մոլեկուլային պարթմեխանիզմների և արյունուղեղային պատնեշի (ԱՈԻՊ) կառուցվածքաֆունկցիոնալ ամբողջականության խախտումների ուսումնասիրությունը, ինչպես նաև վերջիններիս միջև հնարավոր կապի բացահայտումը երկրորդ տիպի շաքարախտով (Շ2) բարդացված և չբարդացված մարդու սուր իշեմիկ կաթվածի ժամանակ:

Վերոհիշյալ նպատակի իրականացման համար կատարվել է.

- ցիտոկինային ցանցի կարգավիճակի գնահատում, ինչպես նաև IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 և CXCL1 բորբոքային և քեմոտոքսիկ ցիտոկինների ֆունկցիոնալ ակտիվությունների համեմատություն շաքարախտով չբարդացված (ԻԿ) և բարդացված (ԻԿՇ) սուր իշեմիկ կաթվածի ժամանակ հետիշտմիկ բորբոքային պատասխանի զարգացման դինամիկայում;
- ԱՈԻՊ կառուցվածքաֆունկցիոնալ ամբողջականության գնահատում սուր իշեմիկ կաթվածի ժամանակ և ԱՈԻՊ թափանցելիության համեմատում ԻԿ և ԻԿՇ հիվանդների մոտ հետիշտմիկ բորբոքային պատասխանի զարգացման դինամիկայում՝ հիմնվելով ծայրամասային արյան մեջ նեյրոն-սպեցիֆիկ էնդլագա և S100B նեյրոն-սպեցիֆիկ սպիտակուցների մակարդակների և դրանց նկատմամբ սպեցիֆիկ հակամարմինների առկայության վրա;
- կոմպլեմենտի համակարգի վերջնանյութի՝ ցիտոլիտիկ թաղանթ-գրոհող համալիրի համեմատական վերլուծություն ԻԿ և ԻԿՇ ժամանակ;

- կոմպլեմենտի համակարգի կարգավորիչի՝ H գործոնի մակարդակների և նրա գենի Y402H ֆունկցիանալ պոլիմորֆիզմի ասոցիացիայի ուսումնասիրություն՝ ԻԿ-ի հետ;
- ուսումնասիրվող չափանիշների միջև հնարավոր կորելյացիաների բացահայտում:

Հետազոտության մեջ ներգրավված էին ԻԿ, ԻԿՇ, Շ2, ինչպես նաև առողջ անձինք; ուսումնասիրությունների օբյեկտ է հանդիսացել նշված սուբյեկտների արյունը:

Տվյալ աշխատանքի արդյունքները զգալիորեն հարստացնում և լրացնում են ԻԿ և ԻԿՇ ժամանակ հետիշեմիկ բորբոքային պատասխանի առաջացման և զարգացման մոլեկուլային պաթոմեխանիզմների, ինչպես նաև ԱՌԻՊ ամբողջականության խախտման և բորբոքային ռեակցիաների անկառավարելի գերակտիվացման մեջ Շ2 հետ ասոցացված պաթոգեն ֆորձընթացների ներդրման մասին ժամանակակից պատկերացումները:

Մտացված արդյունքները թույլ են տալիս նաև առաջարկել նեյրոպրոտեկտորների համակցված կիրառում բորբոքային ու քեմոտոքսիկ ցիտոկինների և կոմպլեմենտի համակարգի արգելակիչների հետ՝ սուր իշեմիկ կաթվածի արդյունավետ բուժման, հետկաթվածային հիվանդների վերականգնման, ինչպես նաև Շ2 հիվանդների մոտ կաթվածի կանխորոշման համար:

Arakelova Elina

MOLECULAR PATHOMECHANISMS OF THE DEVELOPMENT OF INFLAMMATORY RESPONSE AND ITS ASSOCIATION WITH THE STATE OF BLOOD BRAIN BARRIER IN ACUTE ISCHEMIC STROKE

SUMMARY

Keywords: acute ischemic stroke, blood brain barrier, cytokines, neuron-specific proteins, membrane attack complex, postischemic inflammatory response, type 2 diabetes mellitus, Y402H functional polymorphism of factor H.

The present study aimed to evaluate the molecular pathomechanisms responsible for development of postischemic inflammatory response and alterations in structural and functional integrity of blood brain barrier (BBB) in acute ischemic stroke complicated and none-complicated with diabetes mellitus type 2 (DM2) in human as well as to reveal a possible interrelation between these processes.

To achieve this goal we performed:

1. assessment of the state of cytokine network in acute ischemic stroke and comparison of functional activities of proinflammatory and chemotactic cytokines, including IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 и CXCL1, in stroke complicated and none-complicated with DM2 (IS and ISD2, respectively) in postischemic inflammatory response progression;
2. assessment of structural and functional integrity of BBB in acute ischemic stroke and comparison of the BBB permeability in IS and ISD2 in postischemic inflammatory response progression based upon the peripheral blood levels of neuron-specific proteins, neuron-specific enolase and S100B, and specific to them antibodies;
3. comparative analysis of the complement system activation end product, cytolytic membrane attack complex, in IS and ISD2;
4. investigation of the complement system regulator, factor H, associations of its levels and Y402H functional polymorphism of its gene with ischemic stroke;

5. investigation of possible correlative relations between all parameters determined.

The study was performed using blood samples of patients with IS, ISD2, DM2 and healthy subjects.

The results obtained have sufficiently extended the existing knowledge on molecular pathomechanisms of generation and development of postischemic inflammatory response in IS and ISD2 and on the implication of DM2-associated pathogenic processes in BBB-related alterations and uncontrolled hyperactivation of the inflammatory reactions in stroke.

The data obtained have enabled to recommend combined use of neuroprotectors together with the inhibitors of proinflammatory and chemotactic cytokines and the complement system for the efficient therapy of the acute ischemic stroke, rehabilitation of post-stroke patients and prophylaxis of stroke in DM2 patients.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mas' with a superscript '1'.

