

На правах рукописи

**КРОХАЛЕВА ЮЛИЯ АЛЕКСАНДРОВНА**

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО  
ПОЛИМОРФИЗМА И ЭКСПРЕССИИ TOLL-ПОДОБНЫХ  
РЕЦЕПТОРОВ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКИМ  
ИНСУЛЬТОМ**

**14.03.03. – ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Томск 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения России

**Научный руководитель:**

канд. мед. наук, доцент Страмбовская Наталья Николаевна

**Научный консультант:**

заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор Кузник Борис Ильич

**Официальные оппоненты:**

Жукова Наталья Григорьевна – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры неврологии нейрохирургии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Бодиенкова Галина Михайловна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований в гигиене» Федерального агентства научных организаций Российской Федерации.

**Ведущая организация:**

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 года в \_\_\_\_\_ на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (634050, г.Томск, Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (634050, Томск, пр. Ленина, 107) и на сайте: [www.ssmu.ru](http://www.ssmu.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

И.В. Петрова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** По данным Всемирной федерации неврологических обществ, ежегодно в мире регистрируется не менее 15 млн. инсультов, в России – свыше 450 тыс. эпизодов, при этом заболеваемость составляет 2,5 – 4 на 1000 человек и является одной из самых высоких в мире (Широков Е.А., 2011). В последние годы ишемический инсульт, имея тенденцию к увеличению, занимает второе место в структуре общей смертности и первое среди причин стойкой утраты работоспособности и инвалидизации населения многих стран. Очень велики экономические и социальные последствия заболевания (Шурдумова М.Х., 2011). Всё сказанное свидетельствует об актуальности изучаемой проблемы, а исследование этиопатогенетических механизмов возникновения инсульта можно с полным основанием определить как чрезвычайно важные.

В настоящее время исследователи стали уделять особое внимание роли толл-подобных рецепторов в патогенезе как инфекционных, так и неинфекционных заболеваний, поскольку, взаимодействуя с лигандами, toll-like рецепторы активируют синтез цитокинов, от которых зависит интенсивность воспалительной реакции. Полиморфизм генов TLRs за счет специфических аллелей вносят существенный вклад в персональные особенности развития защитных реакций, а также предрасположенность к целому ряду заболеваний (Симберцев А.С., 2005, Щепляков Д.В., 2010, Хорева М.В., 2012, Маложик Л.П., 2012, Саха Сумита, 2013, Романова С.В., 2013, Питиримова А.Л., 2014, Руденко К.А., 2014). Достаточно работ посвящено изучению роли данных рецепторов и полиморфизма их генов при аутоиммунных, онкологических заболеваниях, сепсисе, хроническом гепатите С, артритах (М. А. Hofmann, 2008, Д.В. Щепляков, 2010, Sui – Lung Su, 2012, Бережная Н.М., 2013, Дубинская Г.М., 2014, Wang Haiyan, 2014, Марковский А.В., 2015). Суперэкспрессия этих рецепторов также служит важнейшим патогенетическим фактором воспалительных неинфекционных заболеваний (Ю.А.Крохалева, А.В.Марковский, 2016). Имеются исследования участия толл-белков в развитии гипертонической болезни, ишемической болезни сердца, ожирения, атеросклероза, являющихся факторами риска острого нарушения мозгового кровообращения (Сульская Ю.В., 2009, Скочко О.В., 2011, Хорева М.В., 2012, Луна Лю, 2012, Хуторная М.В., 2013, Alvaro – González, L.C., 2002, Lutz Hamann, 2013). Однако особый интерес вызывает изучение генетического полиморфизма toll-like рецепторов и влияние его на основные патогенетические звенья ишемического инсульта.

### **Степень разработанности темы исследования**

В настоящее время проведено немало исследований, посвященных участию толл-подобных рецепторов в патогенезе некоторых невоспалительных заболеваний головного мозга и заболеваний, сопровождающихся повреждением ЦНС. К ним относятся рассеянный склероз, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и некоторые другие

(Nagai Y., 1996, Barbanti P., 2000, Linnea Stridh, 2011, Laure Aurelian, 2015, Zhong Zhangfeng, 2015). Доказано, что сигнальная система TLRs воздействует на тяжесть аутоиммунного воспаления в ЦНС (Andersson A., 2008, Miranda – Hernandez S., 2011, Cohen S. J., 2010). Увеличение экспрессии некоторых TLRs на моноцитах при цереброваскулярной патологии ассоциировано с возникновением ишемического инсульта и тяжестью его течения (Шурдумова М.Х., 2011). По данным David Brea López (2010) взаимодействие белков теплового шока с TLRs на клетках периферической крови увеличивает уровень экспрессии данных рецепторов. На основании приведенных данных высказано предположение, что размер инфаркта должен зависеть от степени экспрессии TLRs, а блокада лигандов и TLRs может быть эффективным методом для ослабления воспалительной реакции. Однако нам не встретились работы, посвященные роли генетического полиморфизма толл-подобных рецепторов в патогенезе ишемического инсульта, а также влияние SNP на экспрессию toll-like рецепторов при этой патологии.

#### **Цель исследования:**

Изучить прогностическую и патогенетическую роль аллельного полиморфизма генов некоторых толл-подобных рецепторов, а также уровень их экспрессии у больных ишемическим инсультом.

#### **Задачи исследования:**

1. Оценить частоту аллелей и генотипов генетического полиморфизма толл-подобных рецепторов (*TLR2* (Arg753Gln), *TLR3* (Phe412Leu), *TLR4* (Asp299Gly), *TLR6* (Ser249Pro), *TLR9* (T-1237C)) у больных ишемическим инсультом в Забайкальском крае. Выявить генетические предикторы заболевания, тяжести ишемического инсульта и развития повторного сосудистого эпизода.
2. Исследовать уровень экспрессии *TLR2*, *TLR4* на моноцитах периферической крови у больных ишемическим инсультом, в том числе с учетом носительства генетического полиморфизма *TLR2*(Arg753Gln), *TLR4*(Asp299Gly) и генетического индекса. Оценить клиничко-прогностическое значение экспрессии *TLR2* и *TLR4*.
3. Определить содержание IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 в плазме у больных ишемическим инсультом в динамике заболевания, в том числе в зависимости от носительства генетического полиморфизма *TLR2*(Arg753Gln), *TLR3*(Phe412Leu), *TLR4*(Asp299Gly), *TLR6*(Ser249Pro), *TLR9*(T-1237C) и генетического индекса.
4. Изучить феномен лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА) и агрегационную активность тромбоцитов (спонтанную и индуцированную) у больных ишемическим инсультом в динамике заболевания, в том числе с учетом носительства генетического

полиморфизма *TLR2*(Arg753Gln), *TLR3*(Phe412Leu), *TLR4*(Asp299Gly), *TLR6*(Ser249Pro), *TLR9*(T-1237C) и генетического индекса.

5. Провести анализ и определить причинно-следственные связи между выявленными маркерами заболевания у больных ишемическим инсультом.

**Научная новизна.** Впервые изучено и проанализировано носительство генетического полиморфизма *TLR2* (Arg753Gln), *TLR3* (Phe412Leu), *TLR4* (Asp299Gly), *TLR6* (Ser249Pro), *TLR9* (T-1237C) у больных ишемическим инсультом в Забайкальском крае и обозначены предикторы заболевания: *TLR2* -753Arg, *TLR6* -249Pro, *TLR9* -1237C и *TLR4* -299Asp/Asp -генотип. Установлено, что наличие в геноме дикого аллеля *TLR4* (Asp299Gly) ассоциировано с тяжелым течением болезни. Присутствие же в геноме большого количества предрасполагающих аллелей SNP TLRs увеличивает риск возникновения ишемического инсульта и ассоциируется с тяжелым его течением.

Впервые установлено, что общее количество моноцитов, количество активированных моноцитов, в том числе и экспрессирующих *TLR2*, *TLR4* у больных ишемическим инсультом увеличивается. При тяжелом течении инсульта отмечалось снижение данных показателей, что может иметь клиничко-прогностическое значение. При повторном ОНМК к моменту завершения формирования зоны инфаркта мозга индекс экспрессии возрастает. Кроме этого, среди больных инсультом в группе с высоким IGI по сравнению с низким обнаружено снижение количества моноцитов, в том числе и экспрессирующих *TLR2* ( $p < 0,05$ ).

Впервые у пациентов с ишемическим инсультом при наличии -753Gln *TLR2* в геноме обнаружено значительное увеличение концентрации IL-1 $\beta$ , IL-6 в крови на всем протяжении острого периода ОНМК, а комплексное носительство предиктивных аллелей генов toll-like рецепторов как в норме, так и у больных инсультом, к концу острого периода заболевания вызывает цитокиновый дисбаланс с увеличением концентрации провоспалительных интерлейкинов.

Впервые показано, что в острейший период ОНМК чем больше предиктивных аллелей SNP TLRs в геноме, тем выраженнее лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия (ЛТА). При этом *in vitro* наблюдаются сравнительно низкие показатели степени и скорости индуцированной агрегации кровяных пластинок, при одновременном увеличении их среднего радиуса.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. У больных ишемическим инсультом в геноме часто обнаруживаются *TLR2* -753Arg, *TLR6* -249Pro, *TLR9* -1237C аллели и *TLR4* -299Asp/Asp-генотип. Для развития заболевания имеет значение количество предиктивных аллеломорфов SNP TLRs в геноме. Носительство *TLR4* -299Asp-аллеля ассоциировано с тяжелым течением заболевания.

2. У пациентов с ишемическим инсультом в крови увеличено число активированных моноцитов, экспрессирующих TLR2, TLR4. Носительство двух и более предиктивных аллелей полиморфизма генов toll-like рецепторов сопровождается снижением количества активированных моноцитов, экспрессирующих TLR2. Увеличение количества моноцитов, экспрессирующих TLR4, ассоциировано со снижением концентрации IL-1 $\beta$ .

3. Носительство -753Gln *TLR2* увеличивает концентрацию IL-1 $\beta$ , IL-6 в периферической крови на всем протяжении острого периода ОНМК. Комплексное носительство предиктивных аллелей полиморфизма генов toll-like рецепторов в динамике ишемического инсульта вызывает цитокиновый дисбаланс с увеличением концентрации провоспалительных интерлейкинов (IL-1 $\beta$ , IL-6), усиление лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии и вторичную индуцированную гипоагрегацию тромбоцитов с увеличением радиуса агрегатов

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты исследования позволяют уточнить некоторые иммунологические аспекты в патогенезе ишемического инсульта, в том числе с учетом степени тяжести и вторичности сосудистого эпизода, оценить влияние носительства генетического полиморфизма toll-like рецепторов на выраженность иммунологических реакций и на степень экспрессии TLR2, TLR4 и, в связи с этим, прогнозировать развитие заболевания, а также характер осложнений. Полученные данные дадут возможность для более детального изучения рассматриваемых механизмов, что позволит в будущем улучшить диагностические мероприятия у этой категории больных.

**Внедрение результатов исследования в практику.** Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедрах патологической физиологии, неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики ФГБОУ ВО ЧГМА (г. Чита).

**Методология и методы исследования.** При обследовании людей соблюдались этические принципы согласно Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской ассоциации (WRRld Medical Association Declaration of Helsinki 1964, в редакции 2013 г., изменения внесены на 64-ой Генеральной Ассамблее ВМАЮ Форталеза, Бразилия, октябрь 2013).

Все участники исследования были разделены на 2 группы: клиническую и контрольную. В клиническую группу включены 115 больных ишемическим инсультом, госпитализированные в первые сутки от начала заболевания. Все больные ишемическим инсультом по степени тяжести заболевания (согласно шкале NIHSS) были разделены на три группы: 1-я группа (34 человека) включала больных с легким течением заболевания – оценка степени тяжести инсульта до 5 баллов; 2-я (47 человек) – пациентов со средней степенью тяжести инсульта – средний балл от 5 до 9 баллов; 3-я группа (34 человека) – больных с тяжелой степенью инсульта – с оценкой 10 баллов и более.

Контрольную группу составили 94 относительно здоровых респондента. Все наблюдаемые подписывали информированное согласие на участие в исследовании.

В работе использовались клинические, инструментальные, лабораторные и статистические методы исследования.

### **Лабораторные методы исследования.**

**Молекулярно-генетические исследования.** В качестве материала использовали образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической крови с помощью реагентов ДНК-Экспресс-кровь (НПФ «Литех», Москва). Амплификация фрагментов генов проводилась в термоциклере «Бис-М112» (ООО «Бис-Н», Новосибирск). В работе использовались стандартные наборы реактивов *TLR2*(Arg753Gln), *TLR3*(Phe412Leu), *TLR4*(Asp299Gly), *TLR6*(Ser249Pro), *TLR9*(T – 1237 C) НПФ «Литех» (Москва). Визуализация продуктов амплификации осуществлялась с помощью электрофореза в 3% агарозном геле с добавлением бромистого этидия, в проходящем в ультрафиолетовом свете. Полученные результаты анализировали согласно инструкции набора. Забор крови для данного исследования осуществлялся однократно в обеих группах наблюдения.

**Определение цитокинов (IL – 1 $\beta$ , IL – 6, IL – 10)** проводили в плазме крови с помощью твердофазного иммуноферментного анализа («сэндвич» – метод) с использованием тест-систем фирмы «Вектор –Бест» (Россия). Кровь у больных ишемическим инсультом исследовалась в 1-е, на 10-е и 21-е сутки, у индивидуумов контрольной группы – единожды.

**Исследование уровня экспрессии TLR2, TLR4 на моноцитах периферической крови.** Общее количество моноцитов (абс. и относит.) периферической крови (CD14+), количество моноцитов, экспрессирующих TLR2 (CD14+CD282+), TLR4 (CD14+CD284+), количество активированных моноцитов (CD14+HLADR+) и количество активированных моноцитов, экспрессирующих TLR2 (CD14+CD282+HLADR+) и TLR4 (CD14+CD284+HLADR+) изучали мультипараметрическим методом иммунофлюоресцентного анализа с использованием панели моноклональных антител (Nucultbiotechnology, Голландия), (Beckman Coulter, США). Пробоподготовку проводили путем удаления эритроцитов с применением лизирующего раствора «OptiLise C» (Immunotex, Франция) по прилагаемому протоколу. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре «Cytomics FC–500» (Beckman Coulter, США) по стандартному протоколу. Полученные данные трактовали с помощью программы «СХР Cytometer» (Beckman Coulter, США). Также оценивали уровень экспрессии исследуемых поверхностных рецепторов по средней интенсивности флюоресценции (MFI – mean fluorescence intensity).

**Определение агрегационной активности тромбоцитов.** Спонтанную и индуцированную агрегацию тромбоцитов изучали с использованием двухканального лазерного анализатора АЛАТ–2 в модификации 230 LA–2

(НПФ «БИОЛА», Россия) у больных ишемическим инсультом в 1-е, 10-е и 21-е сутки заболевания, у исследуемых контрольной группы – однократно. В качестве индукторов использовались: АДФ в конечной концентрации 5 мг/мл; АДФ (1,25 мг/мл); коллаген (1 мг/мл); адреналин (5 мг/мл); ристомицин (15 мг/мл). Оценивали тип агрегатограммы и определяли степень агрегации – максимальный процент светопропускания плазмы и размер радиуса агрегатов (опт. ед.), скорость агрегации (опт. ед.).

#### **Определение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА)**

Проводили на свежей цитратной крови обследуемых (метод Ю. А. Витковского и соавт. (1999)). Лимфоцитарно-тромбоцитарные коагрегаты подсчитывали на 100 клеток путем световой микроскопии в камере Горяева. Лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс (ЛТИ) оценивали как среднее арифметическое количество тромбоцитов, присоединившихся к одному лимфоциту.

**Общий анализ крови** исследовали благодаря автоматическому гематологическому анализатору «Pentra –120» («HRRiba ABX», Франция) в момент госпитализации, на 10-14 сутки от начала заболевания и к окончанию острого периода инсульта (21 сутки). У здоровых респондентов забор крови осуществлялся однократно.

#### **Статистическая обработка материала**

Статистический анализ результатов исследования проводился с помощью программ BIOSTAT, Microsoft Excel 2007, Statistica 6,0 (StatSoftInc.,USA). Предварительно до начала анализа вариационные ряды проверялись на нормальность методом асимметрии и эксцессов. Медиану, 25 и 75 процентиля вычисляли при помощи описательной статистики. Для сравнения двух несвязанных групп использовали критерий Манна-Уитни. Достоверными признавались различия при  $p < 0,05$ . Взаимосвязь между количественными признаками выявлялась с помощью корреляционного анализа Спирмена, статистически значимым считался результат при  $r_s > 0,3$ ,  $p < 0,05$ . Кроме этого, вычисляли индивидуальный генетический индекс (IGI) являющийся ранжированной величиной, характеризующей совокупный эффект носительства изучаемого генетического полиморфизма (кумулятивная полимерия) у индивидуума с учетом, что нормальная гомозигота – это «1», гетерозигота – «2», мутантная гомозигота – «3» для *TLR6* (Ser249Pro) и *TLR9* (T1237-C), для *TLR2* (Arg753Gln) и *TLR4* (Asp299Gly) нормальная гомозигота принималась за «3», гетерозигота – за «2», мутантная гомозигота – за «1».

Формула расчета:

**индивидуальный генетический индекс (IGI) у одного исследуемого:**

$$IGI = \frac{A_{HP\ TLR2(Arg753Gln)} + A_{HP\ TLR4(Asp299Gly)} + A_{HP\ TLR6(Ser249Pro)} + A_{HP\ TLR9(T-1237C)}}{N}$$

где, A – числовое значение генотипа; HP – выявленный генотип полиморфизма определенного толл-подобного рецептора; N – количество генотипов.



После унификации (когда качественные показатели переводятся в количественные, соизмеримые по значимости) и суммации баллов находили М (медиану) и сравнивали с подобными значениями здоровых пациентов с помощью критерия Мана-Уитни.

#### **Степень достоверности и апробация результатов диссертации:**

О достоверности результатов свидетельствует достаточно большой материал исследования (115 больных ишемическим инсультом, 94 практически здоровых лиц, 272 результата исследования лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии, 290 результатов исследования сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, 274 результата определения концентрации IL-1 $\beta$ , IL-6; 209 результатов молекулярно-генетического исследования, 60 результатов определения количества моноцитов, экспрессирующих TLR2, TLR4)), использование современных методик исследования, в том числе адекватного статистического анализа, публикации основных результатов диссертационной работы в ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК.

Результаты исследования представлены на Региональной межвузовской научно-практической конференции молодых ученых «Медицина завтрашнего дня» г. Чита, 2012 г., 2013г, 2015г; 70-й итоговой научной конференции молодых ученых и студентов Дальневосточного государственного медицинского университета с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины», г. Хабаровск, 2013 г.; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 60-летию Читинской государственной медицинской академии, «Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины», г. Чита, 2013 г.; VI Всероссийской конференции с международным участием «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии», г. Москва, 2013 г., 2016 г.; III Российском Международном Конгрессе «Цереброваскулярная патология и инсульт», г. Казань, 2014 г. ; 82-ой Всероссийской Байкальской научно –практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием, посвященной 95-летию ИГМУ, «Актуальные вопросы современной медицины», г. Иркутск, 2015 г.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 20 работ, из них 5 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации результатов диссертации на соискание учёной степени кандидата медицинских наук.

**Объем и структура работы:** Диссертация содержит 150 страниц машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, заключения, выводов и списка использованной литературы (105 отечественных и 80 зарубежных источников). Работа иллюстрирована 49 таблицами, 1 рисунком.

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Сравнительная частота генетического полиморфизма toll-like рецепторов (*TLR2*(Arg753Gln), *TLR3*(Phe412Leu), *TLR4*(Asp299Gly), *TLR6*(Ser249Pro), *TLR9*(T – 1237 C)) у больных ишемическим инсультом в Забайкальском крае. По итогам молекулярно-генетического исследования выявлены все искомые аллели в гомо- и гетерозиготном состоянии. Распределение частот генотипов среди представителей контрольной группы соответствовало равновесию Харди-Вайнберга (Hardy-Weinberg Equilibrium). У представителей клинической группы отклонение от равновесия Харди-Вайнберга обнаружено для полиморфизма *TLR4* (Asp299Gly), *TLR6* (Ser249Pro) преимущественно за счет разницы наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности (таблица 1).**

Таблица 1.

Генетический полиморфизм toll-like рецепторов у больных ишемическим инсультом в Забайкальском крае

полиморфизм	Генотип, аллель	Частота генотипа n (%), аллеля Р		р	χ <sup>2</sup>	RR [95% CI:]
		Клиническая группа (n=115)	Контрольная группа (n=94)			
<i>TLR2</i> (Arg753Gln)	-753Arg/Arg	95 (82,6)	62 (66)	0,02	7,78	2,45 [1,29 – 4,67]
	-753Arg/Gln	19 (16,5)	31 (33)			0,4 [0,21 – 0,77]
-753Gln/Gln	1 (0,9)	1 (1)	0,82 [0,05 – 13,2]			
	-753Arg	0,909	0,824	0,01	6,52	2,12 [1,18 – 3,80]
	-753Gln	0,091	0,176			0,47 [0,26 – 0,85]
<i>TLR3</i> (Phe412Leu)	-412Phe/Phe	53 (46)	47 (50)	0,31	2,35	0,85 [0,50 – 1,48]
	-412Phe/Leu	54 (47)	36 (38,3)			1,43 [0,82 – 2,48]
	-412Leu/Leu	8 (7)	11 (11,7)			0,56 [0,22 – 1,47]
	-412Phe	0,696	0,691	0,93	0,01	1,02 [0,67 – 1,55]
	-412Leu	0,304	0,309			0,98 [0,65 – 1,49]
<i>TLR4</i> (Asp299Gly)	-299Asp/Asp	84 (72,2)	45 (47,9)	p<0,001	30,23	2,82 [1,59 – 5,02]
	-299Asp/Gly	14 (12,2)	43 (45,7)			0,16 [0,08 – 0,33]
	-299Gly/Gly	18 (15,7)	6 (6,4)			2,72 [1,03 – 7,16]
	-299Asp	0,783	0,707	0,08	3,11	1,49 [0,96 – 2,32]
	-299Gly	0,217	0,293			0,67 [0,43 – 1,05]
<i>TLR6</i> (Ser249Pro)	-249Ser/Ser	20 (17,4)	23 (24,5)	p=0,0002	16,99	0,65 [0,33 – 1,27]
	-249Ser/Pro	26 (22,6)	41 (43,6)			0,38 [0,21 – 0,69]
	-249Pro/Pro	69 (60)	30 (31,9)			3,2 [1,81 – 5,67]
	-249Ser	0,287	0,463	p=0,0002	13,78	0,47 [0,31 – 0,70]
	-249Pro	0,713	0,537			2,14 [1,43 – 3,21]
<i>TLR9</i> (T – 1237 C)	-1237T/T	80 (69,5)	77 (81,9)	0,1	4,58	0,5 [0,26 – 0,97]
	-1237T/C	31 (27)	16 (17)			1,8 [0,91 – 3,54]
	-1237C/C	4 (3,5)	1 (1,1)			3,35 [0,37 – 30,51]
	-1237T	0,830	0,904	0,03	4,79	0,52 [0,29 – 0,94]
	-1237C	0,170	0,096			1,93 [1,06 – 3,50]

Таблица 2.

Генетический индекс у больных ишемическим инсультом в  
Забайкальском крае

Группы наблюдения	Индивидуальный генетический индекс (IGI)			
	1,4–1,6	1,8–2	2,2–2,4	Более 2,4
Клиническая группа (n=115)	5,2% ( $\chi^2=8,9$ ; p=0,03) <sup>1</sup>	37,4%	48,7% ( $\chi^2=9,5$ ; p=0,02) <sup>1</sup>	8,7%
Контрольная группа (n=94)	14,9%	48,9%	28,7%	7,5%

Примечание:  $\chi^2$ <sup>1</sup> – сравнение показателей между больными ишемическим инсультом и здоровыми исследуемыми.

Мы отметили, что генетический индекс в пределах 2,2 – 2,4 чаще наблюдался у больных ишемическим инсультом по сравнению со здоровыми резидентами ( $\chi^2=9,5$ ; p=0,02), в то время как индекс 1,4–1,6 встречался реже, чем в контрольной группе ( $\chi^2=8,9$ ; p=0,03) (таблица 2). У пациентов с легкой степенью тяжести чаще встречался рискованный аллель *TLR4* (Asp299Gly), в то время как в группе наблюдаемых с тяжелой степенью ОНМК – нормальный аллель *TLR4* (Asp299Gly) ( $\chi^2=6,76$ ; p=0,009). Относительный риск составил 1,34 [95% CI:0,56–3,22] и 0,74 [95% CI:0,31 –1,78] соответственно.

**Экспрессия TLR2, TLR4 на моноцитах периферической крови у больных ишемическим инсультом, в том числе с учетом носительства полиморфизма генов толл-подобных рецепторов.**

Нами выявлено, что общее количество моноцитов, количество моноцитов, в том числе и активированных моноцитов, экспрессирующих TLR2, TLR4 в группе больных было больше, чем у здоровых резидентов (u, p<0,001). Индекс экспрессии одноименных белков также оказался выше у представителей клинической группы в сравнении с контрольной (u, p<0,001) (таблица 3). У пациентов с легкой степенью тяжести общее количество моноцитов, количество активированных моноцитов, в том числе и экспрессирующих TLR2, TLR4 было больше, нежели у больных с тяжелой степенью заболевания (u; p<0,001) (таблица 4). У пациентов с повторным ОНМК MFI был выше (u, p<0,001), а общее относительное количество моноцитов меньше (u, p<0,05) нежели у исследуемых с впервые диагностированным инсультом, что вероятно связано с большей миграцией моноцитов через поврежденный ГЭБ.

Как среди больных, так и у здоровых не удалось выявить связи между носительством различных аллелей изучаемого полиморфизма TLR2, TLR4 и экспрессией одноименных рецепторов на моноцитах. Однако нами отмечена зависимость количества активированных моноцитов в том числе, экспрессирующих TLR2 от количества изучаемых нами предиктивных для ОНМК аллелей в геноме. Среди больных инсультом в группе с высоким IGI обнаружено снижение количества моноцитов, экспрессирующих TLR2 в том числе и активированных моноцитов по сравнению с больными с низким IGI (таблица 5).

Таблица 3.

Количество моноцитов периферической крови, экспрессирующих TLR2, TLR4 у больных ишемическим инсультом, Me [P25–P75]

Группа наблюдения	CD14+ (%)	CD14+ (x10 <sup>2</sup> /мкл)	CD14+ CD282+ (%)	CD14+ CD282+ (x10 <sup>2</sup> /мкл)	CD14+ CD284+ (%)	CD14+ CD284+ (x10 <sup>2</sup> /мкл)	CD14+ HLADR+ (%)	CD14+ HLADR+ (x10 <sup>2</sup> /мкл)	CD14+ HLADR + 282+ (%)	CD14+ HLADR+ 282+ (x10 <sup>2</sup> /мкл)	CD14+ HLADR + 284+ (%)	CD14+ HLADR+ 284+ (x10 <sup>2</sup> /мкл)	MFI
Клиническая группа (n=20)	8,65 (7,6; 10,7) <sup>1</sup>	8,49 (6,96; 11,63) <sup>1</sup>	39,55 (32,6; 43,8) <sup>1</sup>	3,64 (2,2; 4,87) <sup>1</sup>	37,6 (34,6; 51,6) <sup>1</sup>	2,88 (2,69; 3,84) <sup>1</sup>	94,85 (91,87; 95,47)	8,07 (6,41; 10,67) <sup>1</sup>	36,85 (28,7; 44,45) <sup>1</sup>	3,45 (1,78; 4,17) <sup>1</sup>	34 (29,62; 48,6) <sup>1</sup>	2,58 (2,15; 3,06) <sup>1</sup>	337,75 (244,5; 446) <sup>1</sup>
Контрольная группа (n=40)	5,95 (5,1; 6,55)	4,55 (4,3; 5,68)	22,6 (21,8; 26,75)	1,16 (0,94; 1,61)	25,4 (22,3; 31,3)	1,32 (1,07; 1,42)	93,25 (91,5; 94,8)	4,31 (4,06; 5,27)	22,7 (20,4; 26,62)	0,98 (0,82; 1,42)	25,65 (22,5; 27,1)	1,13 (0,93; 1,31)	124 (95; 153,1)

Примечание: u,<sup>1</sup> – p<0,001 – статистически значимая разница показателей между больными инсультом и здоровыми резидентами.

Таблица 4.

Уровень экспрессии TLR2, TLR4 на моноцитах периферической крови у больных ишемическим инсультом разной степени тяжести, Me [P25–P75]

Группа наблюдения	CD14+ (%)	CD14+ (x10 <sup>2</sup> /мкл)	CD14+ CD282+ (%)	CD14+ CD282+ (x10 <sup>2</sup> /мкл)	CD14+ CD284+ (%)	CD14+ CD284+ (x10 <sup>2</sup> /мкл)	CD14+ HLADR+ (%)	CD14+ HLADR+ (x10 <sup>2</sup> /мкл)	CD14+ HLADR + 282+ (%)	CD14+ HLADR+ 282+ (x10 <sup>2</sup> /мкл)	CD14+ HLADR + 284+ (%)	CD14+ HLADR+ 284+ (x10 <sup>2</sup> /мкл)	MFI	
Клиническая группа (n=20)	Легкая степень (n=10)	11 (9,7; 11,45) <sup>2,3</sup>	12,2 (9,4; 13,6) <sup>2,3</sup>	42,9 (42,9; 43,8) <sup>1,3</sup>	4,97 (4,03; 5,28) <sup>2,3</sup>	36,7 (36,7; 51,1) <sup>3</sup>	3,98 (3,45; 6,91) <sup>2,3</sup>	95,1 (95,1; 95,5)	11,2 (8,94; 12,91) <sup>2,3</sup>	43,1 (42,5; 44,7) <sup>1,3</sup>	4,21 (3,8; 4,85) <sup>2,3</sup>	34,8 (33,2; 47,7) <sup>3</sup>	3,09 (2,97; 6,03) <sup>2,3</sup>	120,5 (98,5; 138,5)
	Тяжелая степень (n=10)	7,4 (4,92; 7,77) <sup>4</sup>	6,97 (6,84; 7,43) <sup>4</sup>	33,1 (29,3; 42,7)	2,31 (2; 3,07) <sup>4</sup>	38,1 (32,1; 38,6) <sup>4</sup>	2,69 (2,49; 2,75) <sup>5</sup>	92,1 (91,8; 94,6)	6,42 (6,31; 7,01) <sup>4</sup>	27,3 (26,4; 30,1)	1,82 (1,71; 2,81) <sup>4</sup>	30,6 (29,3; 38,1) <sup>5</sup>	2,23 (1,98; 2,48) <sup>5</sup>	168 (133,4; 246,1) <sup>1,4</sup>
Контрольная группа (n=40)	5,95 (5,1; 6,55)	4,55 (4,3; 5,68)	22,6 (21,8; 26,75)	1,16 (0,94; 1,61)	25,4 (22,3; 31,3)	1,32 (1,07; 1,42)	93,25 (91,5; 94,8)	4,31 (4,06; 5,27)	22,7 (20,4; 26,62)	0,98 (0,82; 1,42)	25,65 (22,5; 27,1)	1,13 (0,93; 1,31)	124 (95; 153,1)	

Примечание: u,<sup>1</sup> – p<0,05; u,<sup>2</sup> – p<0,001 – сравнение показателей больных с легкой степенью тяжести и пациентов с тяжелой степенью заболевания; u,<sup>3</sup> – p<0,001 – отличия между показателями у больных с легкой степенью тяжести и контрольной группы; u,<sup>4</sup> – p<0,05; u,<sup>5</sup> – p<0,001 – разница показателей больных с тяжелой степенью заболевания со здоровыми исследуемыми.

Таблица 5.

Степень экспрессии TLR2, TLR4 на моноцитах периферической крови в зависимости от генетического индекса у больных ишемическим инсультом, Me [P25–P75]

Показатели	генетический индекс (IGI)			
	клиническая группа, n=20		контрольная группа, n=40	
	1,4–2 (n=9)	более 2 (n=11)	1,4–2 (n=26)	более 2 (n=14)
CD14+CD282+ (%)	<b>44,9</b> (42,9;46,6) <sup>1,4</sup>	<b>35,2</b> (32,6;35,7) <sup>3</sup>	21,95 (18,15;29,07)	24,6 (22,5;26,62)
CD14+CD282+ (10 <sup>2</sup> /мкл)	3,25 (2,61;4,31) <sup>1</sup>	3,75 (2,42;5,07) <sup>3</sup>	1,02 (0,76;1,67)	1,27 (1,05;1,5)
CD14+CD284+ (%)	36,7 (33,45;52,95) <sup>1</sup>	38,55 (37;42,92) <sup>3</sup>	24,95 (21,17;31)	26,9 (24,3;30,7)
CD14+CD284+ (10 <sup>2</sup> /мкл)	2,78 (2,6;3,21) <sup>2</sup>	3,33 (2,69;4,95) <sup>3</sup>	1,25 (1,03;1,41)	1,38 (1,14;1,75)
CD14+HLADR+ (%)	<b>95,1</b> (94,72;96,37) <sup>4</sup>	<b>91,7</b> (91,25;92,75)	93,5 (92,52;95)	91,2 (90,75;93,67)
CD14+HLADR+ (10 <sup>2</sup> /мкл)	7,21 (6,82;9,01) <sup>1</sup>	8,81 (6,38;11,77) <sup>3</sup>	4,29 (3,79;5,22)	4,65 (4,13;5,29)
CD14+HLADR+CD282+ (%)	<b>42,8</b> (30,42;44,45) <sup>1,4</sup>	<b>30,65</b> (29,4;34,72) <sup>3</sup>	21,7 (17,92;28,57)	23,55 (21,95;25,37)
CD14+HLADR+CD282+ (10 <sup>2</sup> /мкл)	3,11 (2,41;3,94) <sup>1</sup>	3,05 (1,86;4,42) <sup>3</sup>	0,91 (0,68;1,49)	1,03 (0,89;1,31)
CD14+HLADR+CD284+ (%)	34 (30,27;52,65) <sup>1</sup>	34,35 (29,85;41,6) <sup>3</sup>	25,3 (17,5;27,57)	26,5 (23,47;26,97)
CD14+HLADR+CD284+ (10 <sup>2</sup> /мкл)	2,51 (2,29;2,82) <sup>2</sup>	2,74 (2,28;4,07) <sup>3</sup>	1,14 (0,67;1,27)	1,13 (0,97;1,38)
MFI	301,5 (173;376,3) <sup>1</sup>	364,8 (255,5;512,1) <sup>3</sup>	117,3 (89;147,3)	132,3 (109,7;162,2)

Примечание: u,<sup>1</sup> – p<0,05; u,<sup>2</sup> – p<0,001 – сравнение показателей больных ОНМК с индексом 1,4–2 с пациентами контрольной группы, имеющих аналогичный индекс; u,<sup>3</sup> – p<0,001 – сравнение показателей больных ОНМК с индексом более 2 с пациентами контрольной группы, имеющих аналогичный индекс; u,<sup>4</sup> – p<0,05 – разница показателей больных с IGI=1,4–2 с больными, имеющих индекс более 2; в группе контроля между показателями пациентов с IGI = 1,4–2 и доноров с IGI = более 2 значимой разницы не выявлено.

### Концентрация IL – 1 $\beta$ , IL – 6, IL – 10 у больных ишемическим инсультом – носителей полиморфизма генов толл-подобных рецепторов.

В динамике острого периода ишемического инсульта мы отметили увеличение уровня исследуемых цитокинов, причем IL–1 $\beta$  максимально к концу острого периода, IL–6 – к окончанию формирования инфаркта мозга (10-е сутки), пик уровня IL–10 наблюдался в острейший период заболевания (1-е сутки), что согласуется с результатами исследований ряда авторов (Жданов Г.Н., 2006, Ото J., 2008, Лысенко В.И., 2009, Мищенко Т.С., 2010, Морозова И.Ю., 2014). Кроме этого, было выявлено, что у лиц с повторным церебрососудистым эпизодом на 10-е сутки заболевания содержание IL–1 $\beta$

превышало в 9,6 раза ( $p < 0,05$ ) аналогичный показатель у больных с первичным инсультом.

Обнаружена обратная сильная связь концентрации IL-1 $\beta$  с количеством моноцитов, экспрессирующих TLR4 ( $R = -0,8$ ;  $p < 0,001$ ), отрицательная умеренная связь с количеством активированных моноцитов, экспрессирующих TLR4 ( $R = -0,6$ ;  $p = 0,03$ ).

Концентрация цитокинов у исследуемых-носителей различных аллелей полиморфизма генов толл-подобных рецепторов различна и вариабельна, тогда как носительство двух и более предиктивных по отношению к ишемическому инсульту аллелей в геноме более значимо влияет на уровень интерлейкинов, в частности, повышает уровень провоспалительных и снижает противовоспалительных белков к концу острого периода заболевания (таблица 6). Это, в свою очередь, создает цитокиновый дисбаланс, влияющий на завершение формирования зоны инфаркта мозга и, соответственно, на постинсультное восстановление неврологических функций.

Таблица 6.

Концентрация IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 у больных ишемическим инсультом в динамике заболевания с учетом генетического индекса, Me [P25-P75]

цитокины		Клиническая группа, (n=68)		Контрольная группа, (n=78)	
		генетический индекс		генетический индекс	
		1,4-2	более 2	1,4-2	более 2
IL-1 $\beta$ (пг/мл)	1 сутки	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	1,54 (1,05;3,22)
	10 сутки	5,35 (0;13,81) <sup>2</sup>	0 (1,19;9,3)		
	21 сутки	<b>1,25</b> (0;9,41) <sup>2</sup>	<b>7,48</b> (0;13,81) <sup>4</sup>		
IL-6 (пг/мл)	1 сутки	5,6 (3,57;11,97) <sup>1</sup>	6,24 (3,77;12,82) <sup>3</sup>	0 (0;0,11)	1,83 (1,14;3,3)
	10 сутки	8,52 (4,72;53,93) <sup>1</sup>	7,22 (4,33;15,95) <sup>3</sup>		
	21 сутки	<b>2,68</b> (1,61;3,46) <sup>5</sup>	<b>4,43</b> (2,87;6,56) <sup>3</sup>		
IL-10 (пг/мл)	1 сутки	0,33 (0;5,65)	0,12 (0;0,79)		
	10 сутки	<b>0,65</b> (0;5,11)	<b>0,08</b> (0;0,24)		

Примечание:  $u^1$  –  $p < 0,001$ ;  $u^2$  –  $p < 0,05$  – сравнение показателей пациентов клинической группы с IGI=1,4-2 со здоровыми исследуемыми, имеющими аналогичный индекс;  $u^3$  –  $p < 0,001$ ;  $u^4$  –  $p < 0,05$  – сравнение показателей пациентов клинической группы IGI=2 и более со здоровыми исследуемыми, имеющими аналогичный индекс;  $u^5$  –  $p < 0,05$  – разница между показателями больных с индексом 1,4-2 с больными с индексом более 2; в контрольной группе между показателями респондентов, имеющих индекс 1,4-2 и респондентами с индексом 2 и более отличий не выявлено.

**Лимфоцитарно -тромбоцитарная адгезия и агрегация тромбоцитов у больных ишемическим инсультом, в том числе с учетом носительства полиморфизма генов толл-подобных рецепторов.** Установлено значительное увеличение ЛТА и ЛТИ в остром периоде ОНМК, преимущественно на первые и 10-е сутки болезни ( $u$ ,  $p < 0,001$ ) с постепенным снижением данных показателей к завершению острого периода до контрольных значений.

В контрольной группе были найдены умеренные и сильные отрицательные связи между ЛТА и: общим количеством моноцитов ( $R = -0,7$ ;  $p < 0,001$ ), количеством моноцитов с экспрессированными TLR2 ( $R = -0,5$ ;  $p = 0,02$ ), TLR4 ( $R = -0,7$ ;  $p < 0,001$ ), количеством активированных моноцитов ( $R = -0,8$ ;  $p < 0,001$ ), в том числе и экспрессирующих TLR2 ( $R = -0,5$ ;  $p = 0,03$ ), TLR4 ( $R = -0,7$ ;  $p < 0,001$ ), а также MFI ( $R = -0,6$ ;  $p = 0,003$ ). Для ЛТИ обнаружена обратная умеренная связь с концентрацией IL-6 ( $R = -0,5$ ;  $p = 0,04$ ). Среди участников клинической группы выявлены средние прямые связи ЛТА с количеством моноцитов, экспрессирующих TLR2 ( $R = 0,6$ ;  $p = 0,04$ ), с количеством активированных моноцитов с экспрессированным на их мембране TLR2 ( $R = 0,7$ ;  $p = 0,012$ ). Для ЛТИ найдены умеренные положительные связи с количеством моноцитов, экспрессирующих TLR4 ( $R = 0,6$ ;  $p = 0,04$ ), с количеством активированных моноцитов с экспрессированным TLR4 на мембране ( $R = 0,6$ ;  $p = 0,04$ ). Таким образом, у больных ишемическим инсультом повышение как общего количества, так и количества активированных моноцитов экспрессирующих TLR2 сопровождается повышением ЛТА, увеличение общего количества моноцитов и активированных моноцитов, экспрессирующих TLR4 ассоциировано с высоким ЛТИ.

Изучение количества лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов и количества тромбоцитов, адгезированных к 1 лимфоциту у больных ишемическим инсультом в зависимости от генетического полиморфизма toll-like рецепторов выявило разнонаправленные сдвиги показателей у носителей различных аллелей генетического полиморфизма толл-подобных рецепторов. Определено, что в 1-е сутки заболевания у носителей минорного аллеля *TLR9* (T-1237C) количество адгезированных тромбоцитов на лимфоците больше, чем у обладателей дикого аллеля ( $u$ ,  $p < 0,05$ ). Больные, имеющие IGI=2,4 и более имели большее значение ЛТА и ЛТИ в 1-е ( $u$ ,  $p < 0,05$ ) и 10-е ( $u$ ,  $p > 0,05$ ) сутки инсульта в отличие от больных с меньшим IGI. Нами отмечена следующая тенденция: чем больше предиктивных аллелей в геноме у больного ишемическим инсультом, тем меньшее количество ЛТ-агрегатов регистрируется в кровотоке к 21 суткам заболевания. Возможно носительство рискованных аллелей опосредованно через экспрессию toll-like рецепторов и систему цитокинов влияют на лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию.

При расчете коэффициента корреляции Спирмена у здоровых участников исследования выявлены положительные связи разной силы между общим количеством моноцитов, количеством активированных моноцитов, в том числе с экспрессированными TLR2 и TLR4 со степенью и скоростью агрегации, индуцированной адреналином и степенью агрегации при внесении АДФ 5 мкг/мл. В группе больных ишемическим инсультом обнаружены сильные связи прямые по направлению между степенью агрегации, индуцированной АДФ 1,25 мкг/мл и общим количеством моноцитов, экспрессирующих TLR2 ( $R = 0,7$ ;  $p = 0,03$ ), TLR4 ( $R = 0,8$ ;  $p = 0,01$ ), количеством активированных моноцитов, экспрессирующих TLR2 ( $R = 0,7$ ;

$p=0,04$ ) и TLR4 ( $R=0,7$ ;  $p=0,04$ ). Степень агрегации при внесении адреналина имеют сильную отрицательную связь с общим количеством моноцитов ( $R=-0,7$ ;  $p=0,03$ ), в том числе экспрессирующих TLR2 ( $R=-0,7$ ;  $p=0,03$ ), количеством активированных моноцитов ( $R=-0,8$ ;  $p=0,01$ ), в том числе с экспрессированным на мембране TLR2 ( $R=-0,8$ ;  $p=0,02$ ) и MFI ( $R=-0,8$ ;  $p=0,008$ ). У больных-обладателей двух и более предиктивных для развития ишемического инсульта аллелей в геноме индуцированная (преимущественно коллагеном и низкими дозами АДФ) агрегация сопровождается увеличением радиуса агрегатов в динамике заболевания, а также более низкой степенью светопропускающей способности при индукции агрегации.

### Выводы

1. Предикторами ишемического инсульта являются аллели:  $-753Arg$  TLR2,  $-249Pro$  TLR6,  $-1237C$  TLR9 и генотипы  $-753Arg/Arg$  TLR2,  $-299Asp/Asp$  TLR4,  $-249Pro/Pro$  TLR6 с отношением шансов от 1,49 до 3,35. Для развития инсульта имеет значение не только качество полиморфных маркеров, но и количество предикторных аллельных вариантов. Комбинация аллелей  $-753Arg$  TLR2  $\times$   $-299Asp$  TLR4  $\times$   $-249Pro$  TLR6  $\times$   $-1237C$  TLR9 в геноме встречается у 25,2% заболевших против 17% в группе контроля.
2. С тяжелым течением ишемического инсульта ассоциировано носительство TLR4-299Asp - аллели в гомозиготном состоянии, а также наличие большого количества аллеломорфов в геноме, проявивших приверженность к болезни.
3. У пациентов с ишемическим инсультом увеличено число моноцитов, экспрессирующих TLR2, TLR4. Чем тяжелее инсульт, тем выше MFI (индекс экспрессии) и количество моноцитов, экспрессирующих TLR2 и TLR4. При повторном инсульте к моменту завершения формирования зоны инфаркта мозга MFI возрастает.
4. Общее число моноцитов, в том числе экспрессирующих TLR2, у больных ишемическим инсультом к окончанию периода формирования инфаркта мозга зависит от совокупного носительства (2 и более) предиктивных аллеломорфов полиморфизма генов TLRs.
5. В остром периоде ишемического инсульта в периферической крови увеличивается концентрация в большей мере провоспалительных (IL-1 $\beta$ , IL-6), в меньшей – противовоспалительных (IL-10) цитокинов. Уровень исследуемых интерлейкинов зависит от стадии и тяжести заболевания. У больных инсультом при увеличении экспрессии TLR4 отмечается снижение концентрации IL-1 $\beta$ . Носительство  $-753Gln$  TLR2,  $-1237C$  TLR9 сопровождается увеличением уровня IL-1 $\beta$  и IL-6 в крови на всем протяжении острого периода мозгового кровообращения. Комплексное носительство предиктивных аллелей генов toll-like рецепторов как в норме, так и у больных инсультом к концу острого периода заболевания вызывает цитокиновый дисбаланс с увеличением концентрации IL-1 $\beta$  и IL-6.



6. В крови больных инфарктом мозга в остром периоде многократно увеличивается число лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов. В динамике инсульта у больных с повторным церебральным инфарктом сохраняются высокие значения адгезии. У пациентов с тяжелым по сравнению с легким течением острого нарушения мозгового кровообращения на 10–21 сутки число агрегатов уменьшено. Чем выше количество активированных моноцитов, экспрессирующих TLR2, тем больше формируется лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов. Чем выше число активированных моноцитов, экспрессирующих TLR4, тем активнее тромбоциты адгезируют к одному лимфоциту. Чем выше общий генетический индекс, тем больше лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов образуется в кровотоке в острейший период острого нарушения мозгового кровообращения, и меньшее количество агрегатов выявляется к 21 дню заболевания.

7. При остром нарушении мозгового кровообращения увеличение степени экспрессии TLR2, TLR4, общего количества моноцитов, в том числе экспрессирующих TLR2, ассоциировано со снижением степени и скорости агрегации тромбоцитов, индуцированной адреналином. Повышение количества активированных моноцитов, экспрессирующих TLR2, TLR4, сопровождается увеличением степени агрегации кровяных пластинок, вызванной введением АДФ 1,25 мкг/мл. Высокая концентрация IL-6 ассоциируется с индуцированной коллагеном, АДФ и адреналином вторичной гипоагрегацией тромбоцитов. У больных – обладателей двумя и более предиктивными аллелями полиморфизма Toll-like рецепторов в геноме, в динамике инсульта отмечаются сравнительно низкие показатели степени и скорости индуцированной агрегации кровяных пластинок с увеличением радиуса агрегатов.

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

**Публикации в ведущих научных рецензируемых журналах, определенных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации:**

1. Крохалева, Ю.А. Генетический полиморфизм толл-рецепторов у больных ишемическим инсультом в Забайкальском крае [Электронный ресурс] / Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская, А.Е. Алферова // Забайкальский медицинский вестник. – 2014. – №4. – Режим доступа:<http://medacadem.chita.ru/zmv>.
2. Крохалева, Ю.А. Носительство генетического полиморфизма toll - рецепторов и степень экспрессии некоторых из них у больных ишемическим инсультом / Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская, А.Е. Алферова// Врач-аспирант. – 2015. – №1(68). – С. 26–32.
3. Крохалева, Ю.А. Носительство генетического полиморфизма толл-рецепторов и концентрация IL-1 $\beta$ , IL-6 в плазме крови у больных мозговым инсультом/ Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская//Успехи современного естествознания. – 2015.– № 7.– С. 7–11.

4. Крохалева, Ю.А. Содержание провоспалительных цитокинов и васкулярной молекулы адгезии 1 типа в остром периоде ишемического инсульта / Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская, П.П. Терешков, А.Е. Алферова // Вестник ивановской медицинской академии. – 2015. – Т.20, №4. – С.49–52.
5. Крохалева, Ю.А. Носительство генетического полиморфизма (*TLR2* (Arg753Gln), *TLR3* (Phe412Leu) и концентрация  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  в плазме крови у больных мозговым инсультом/ Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская// Дальневосточный медицинский журнал. – 2016. – №1. – С.59–62.

**Публикации в прочих изданиях:**

6. Крохалева, Ю.А. Частота генетического полиморфизма toll-рецепторов (*TLR2*(Arg753Gln), *TLR4*(Asp299Gly), *TLR6* (Ser249Pro)) у больных мозговым инсультом в Забайкальском крае / Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская //Актуальные проблемы управления здоровьем населения. – Выпуск 6.– 2013.– С.249 –252.
7. Крохалева, Ю.А. Роль толл-подобных рецепторов в патогенезе неинфекционных заболеваний / Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская, А.В. Марковский// Забайкальский медицинский журнал. – 2015.– №4.– С. 11–17.
8. Крохалева, Ю.А. Взаимосвязь уровня маркера активации *TLR2* (Arg753Gln), *TLR4* (Asp299Gly) с экспрессией *TLR2*, *TLR4* на моноцитах периферической крови у больных ишемическим инсультом в Забайкальском крае/ Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская, Ю.А. Ширшов, А.Е. Алферова// Журнал неврологии и психиатрии: материалы конгресса (Казань, 6–10 октября 2014 г.).– Казань, 2014. – С.34–35.
9. Крохалева, Ю.А. Частота генетического полиморфизма toll-рецепторов *TLR9*(Т–1237С), *TLR6* (Ser249Pro) у больных ишемическим инсультом в Забайкальском крае / Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская // Медицина завтрашнего дня: материалы одиннадцатой межвузовской научно-практической конференции молодых ученых (Чита, 25–28 апреля 2012 г.).– Чита, 2012.– С. 196 –197.
10. Крохалева, Ю.А. Агрегационная активность тромбоцитов у больных мозговым инсультом, носителей генетического полиморфизма *TLR6*(Ser249Pro) в Забайкальском крае / Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская // Медицина завтрашнего дня: материалы двенадцатой межвузовской научно-практической конференции молодых ученых (Чита, 23–26 апреля 2013 г.). – Чита, 2013.– С. 143 –144.
11. Крохалева, Ю.А. Взаимосвязь генетического полиморфизма *TLR3* (Phe 412Leu), *TLR6* (Ser249Pro) и агрегации тромбоцитов (спонтанной и индуцированной) у больных ишемическим инсультом/ Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская, М.В. Константинова // Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии: материалы шестой

- Всероссийской конференции с международным участием (Москва, 31 января – 2 февраля 2013 г.). – Москва, 2013. – С.439–441.
12. Крохалева, Ю.А. Частота генетического полиморфизма toll-рецепторов (*TLR2* (Arg753Gln), *TLR3* (Phe412Leu), *TLR4* (Asp 99Gly), *TLR6* (Ser249Pro), *TLR9* (T – 1237C)) у больных мозговым инсультом в Забайкальском крае/ Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская, А.Е. Алферова // Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии: материалы шестой Всероссийской конференции с международным участием (Москва, 31 января – 2 февраля 2013 г.). – Москва, 2013. – С.442–443.
  13. Крохалева, Ю.А. Содержание ИЛ–10, ФНО–а, ИЛ–1 и NR2 antibody у больных мозговым инсультом в острейший период заболевания Ю.А. Крохалева Н.Н. Страмбовская, А.Е. Алферова // Актуальные вопросы современной медицины: материалы 70-й итоговой научной конференции молодых ученых и студентов Дальневосточного государственного медицинского университета с международным участием (Хабаровск, 16–19 апреля 2013 г.). – Хабаровск, 2013. – С.234–235.
  14. Крохалева Ю.А. Экспрессия толл-подобных рецепторов *TLR2* (Arg753Gln), *TLR4* (Asp299Gly) и уровень маркера активации *TLR2* (Arg753Gln), *TLR4* (Asp299Gly) на моноцитах периферической крови у больных мозговым инсультом / Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская, П.П. Терешков // Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 60-летию Читинской государственной медицинской академии (Чита, 17–18 октября 2013 г.). – Чита, 2013. – С.71–72.
  15. Крохалева, Ю.А. Сравнительная частота генетического полиморфизма toll-рецепторов *TLR2* (Arg753Gln), *TLR4* (Asp299Gly), *TLR6* (Ser249Pro) у больных мозговым инсультом в Забайкальском крае / Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская, А.Е. Алферова // Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 60-летию Читинской государственной медицинской академии (Чита, 17–18 октября 2013 г.). – Чита, 2013. – С.72–73.
  16. Крохалева, Ю.А. Концентрация ИЛ–6 и VCAM–1 у больных мозговым инсультом в зависимости от степени тяжести заболевания / Ю.А. Крохалева // Медицина завтрашнего дня: материалы четырнадцатой межвузовской научно-практической конференции молодых ученых (Чита, 22–24 апреля 2015 г.). Чита, 2015. – С. 12–13.
  17. Крохалева, Ю.А. Носительство генетического полиморфизма *TLR2* (Arg753Gln), *TLR4* (Asp299Gly) и степень экспрессии этих рецепторов у больных ишемическим инсультом / Ю.А. Крохалева, А.Е. Алферова // Медицина завтрашнего дня: материалы четырнадцатой межвузовской

научно-практической конференции молодых ученых (Чита, 22–24 апреля 2015 г.). Чита, 2015.– С. 13–14.

18. Крохалева, Ю.А. Носительство генетического полиморфизма *TLR6* (Ser249Pro) и степень экспрессии *TLR2*, *TLR4* у больных мозговым инсультом/ Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская, П.П. Терешков// Бюллетень медицинских Интернет-конференций.– 2015.– Т. 5, № 5. – С. 709
19. Крохалева, Ю.А. Содержание ИЛ –1 $\beta$  и васкулярной молекулы адгезии 1 типа (VCAM –1) в динамике острого периода мозгового инсульта / Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская, П.П. Терешков// Актуальные вопросы современной медицины: материалы 82-ой Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием посвященной 95-летию ИГМУ (Иркутск, 20–22 апреля 2015 г.). – Иркутск, 2015.– С. 310
20. Крохалева Ю.А. Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия у больных ишемическим инсультом – носителей генетического полиморфизма некоторых толл-подобных рецепторов / Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская, Б.И. Кузник// Материалы международного конгресса, посвященного Всемирному Дню инсульта (Москва, 25-28 октября 2017 г.).– Москва, 2017.– С. 456

### Список сокращений

ИБС	ишемическая болезнь сердца
ИИ	ишемический инсульт
ИФН– $\beta$	интерферон – $\beta$
ЛТА	лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия
ЛТИ	лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс
МРТ	магнитно-резонансная томография
ОНМК	острое нарушение мозгового кровообращения
ОЦИ	острый церебральный инсульт
РНК	рибонуклеиновая кислота
УЗИ	ультразвуковое исследование
ЦНС	центральная нервная система
IL	интерлейкин
LRR	домен толл-рецептора, обогащенный лейцином
PAMP	патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
SNP	однонуклеотидные замены
TLRs	толл-подобные рецепторы
TNF $\alpha$	фактор некроза опухолей – $\alpha$
MFI	средняя интенсивность флюоресценции