

Оглавление

Посвящение	13
Предисловие	14
Авторы	15
Список сокращений и условных обозначений	19
ЧАСТЬ I. ВВЕДЕНИЕ	21
Глава 1. Интегративные биомаркеры при инсульте (С.А. Дамбинова, Бриджит Мартинес, Филип В. Пеплоу)	22
Аннотация	22
1.1. Введение	22
ЧАСТЬ II. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	25
Глава 2. Сосудистые биомаркеры ишемического инсульта (Дэниел Артеага, Брэдфорд Б. Уорролл)	26
Аннотация	26
2.1. Введение	26
2.2. Функция гематоэнцефалического барьера	28
2.3. Воспалительные клетки	29
2.4. Ключевые белки коагуляции	31
2.5. Геморрагическая трансформация, связанная с тромболизисом	32
2.6. Статус реканализации	33
2.7. Профилактика ишемического инсульта	35
2.8. Заключение	37
Литература	37
Глава 3. Создание и применимость шкалы оценки генетического риска при инсульте (Наталья Каллелл, Джонатан Гонсалес-Санчес, Израиль Фернандес-Каденас, Ежи Крупински)	43
Аннотация	43
3.1. Введение	44
3.2. Методы	44
3.3. Примечания	55
Литература	55

Глава 4. Биомаркеры нейропластичности в экспериментальном восстановлении после инсульта (Филип В. Пеплоу, Бриджит Мартинес, Д. Маскарена, С.А. Дамбинова)	58
Аннотация	58
4.1. Введение	58
4.2. Основы нейровосстановительных процессов при кортикальном ишемическом инсульте	59
4.3. Перспективные биомаркеры спонтанного восстановления после экспериментального кровоизлияния	61
4.4. Возможные биомаркеры ангиогенеза	63
4.5. Нейрональные биомаркеры в нейрогенезе после инсульта	64
4.6. Перспективные биомаркеры глиогенеза	65
4.7. Фармакологически индуцированное восстановление после экспериментального инсульта	67
4.8. Заключение	68
4.9. Методы	69
Благодарности	82
Литература	82
Глава 5. Методы измерения митохондрий и окислительно-восстановительного потенциала при ишемическом инсульте (Ойва Арвола, Ананд Рао, Крид М. Стари)	89
Аннотация	89
5.1. Введение	90
5.2. Иммуногистохимические маркеры окислительного стресса и окислительно-восстановительных путей передачи сигналов	92
5.3. Подходы <i>in vivo</i> к измерению окислительно-восстановительного состояния тканей	98
5.4. Подходы <i>in vitro</i> к оценке функции митохондрий и окислительно-восстановительного состояния	99
5.5. Визуализация живых клеток	104
5.6. Выводы	106
Благодарность	107
Литература	107
Глава 6. Биомаркеры крови для дифференциации инсульта (Дипти Вибха, Шубхам Мишра)	112
Аннотация	112
6.1. Введение	112
6.2. Биомаркеры крови для дифференциации инсульта	114
6.3. Вывод из данных литературы	141
6.4. Вывод	143
Литература	144

8 Оглавление

Глава 7. Лазерная захватывающая микродиссекция для оценки ангиогенеза после инсульта (<i>Марк Слевин, Ксения Савкулич, Лаура Комб, Баоцянь Го, Вэнь-Хуэй Фан, Ясмин Зейнолабедин, Дунхуэй Лю, Гленн Феррис</i>)	150
Аннотация	150
7.1. Введение	150
7.2. Лазерная захватывающая микродиссекция	152
7.3. Подробная методика	154
7.4. Вывод	159
Литература	159
ЧАСТЬ III. ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ ИННОВАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ	161
Глава 8. Биомаркеры артериальной гипертензии, определяемые в крови, для прогнозирования геморрагического и ишемического инсультов (<i>Алина Гонсалес-Кеведо, Марисоль Пенья Санчес, Серхио Гонсалес Гарсиа, Мариа Каридад Менендес Сайнс, Марианела Артече Приор</i>)	162
Аннотация	162
8.1. Введение	163
8.2. Церебральная микроангиопатия	165
8.3. Механизмы, вовлеченные в патогенез инсульта, вызванного гипертонией	168
8.4. Биомаркеры крови как предикторы церебральной микроангиопатии у людей без симптомов	170
8.5. Прогнозирование риска инсульта у людей без симптомов	185
8.6. Перспективы	188
Литература	189
Глава 9. Оценка экспрессии генов РНК для определения этиологии острого ишемического инсульта: исследование биомаркеров этиологии острого инсульта (<i>Эдвард К. Джейуч, В. Фрэнк Пикок IV, Джуди Морган, Джефф Джун, Джеймс Айрленд</i>)	202
Аннотация	202
9.1. Введение	203
9.2. Методы	207
9.3. Пилотное исследование BASE	212
9.4. Выводы	214
Благодарность	215
Литература	215

Глава 10. Разработка анализа для определения биомаркера нейротоксичности (<i>Г.А. Изыкенова, Г.А. Хунтеев, И.И. Краснюк, В.Л. Белобородов, С.А. Дамбинова</i>)	217
Аннотация	217
10.1. Введение	217
10.2. Биомаркеры нейротоксичности при экспериментальном инсульте	218
10.3. Разработка теста на пептид NR2 для диагностики острого инсульта	221
10.4. Тесты на антитела к NR2 для оценки хронических ишемических событий	224
10.5. Аналитические данные анализа пептида NR2 и антител к нему	227
10.6. Лабораторные исследования	230
10.7. Заключение: совместное использование тестов на пептид NR2 и на антитела к этому пептиду	234
10.8. Методы	235
Литература	245
Глава 11. Пептиды глутаматных рецепторов как потенциальные нейроваскулярные биомаркеры острого инсульта (<i>С.А. Дамбинова, Дж.Д. Муллинс, Дж.Д. Вайсман, А.А. Потанов</i>)	247
Аннотация	247
11.1. Введение	247
11.2. Известные на сегодняшний день биомаркеры, связанные с окклюзиями больших и малых сосудов	249
11.3. Подтипы глутаматных рецепторов в регуляции сосудов головного мозга	250
11.4. Пептид NR2 как биомаркер окклюзии кортикальных микрососудов	252
11.5. Пептид рецептора AMPA как индикатор подкорковых поражений, вызванных окклюзией мелких сосудов	254
11.6. Панель пептидных биомаркеров рецепторов глутамата для оценки тяжести острого инсульта	256
11.7. Методы	258
Заключение	269
Приложение 11.1. Клинические исследования содержания пептида NR2 у пациентов с уже имеющимися заболеваниями	270
Приложение 11.2. Клинические исследования содержания пептидов рцепторов AMPA у пациентов с подкорковыми инсультами, включая лакунарные поражения	272
Приложение 11.3	273
Приложение 11.4. Расчет размера выборки	275
Литература	276

Глава 12. Антитела к рецепторам NMDA при инфарктах головного и спинного мозга (<i>Г.В. Пономарев, Е.В. Александрова, С.А. Дамбинова, Д.С. Асютин, Н.А. Коновалов, А.А. Скоромец</i>)	282
Аннотация	282
12.1. Введение	282
12.2. Используемые биомаркеры острых и хронических инфарктов головного и спинного мозга	284
12.3. Потенциальные биомаркеры хронических инфарктов головного и спинного мозга	288
12.4. Методы	294
12.5. Обсуждение	297
Литература	299
Глава 13. Нарушение вазореактивности сетчатки как ранний маркер риска инсульта при диабете (<i>Керстин Беттерманн, Кусум Синха</i>)	305
Аннотация	305
13.1. Введение	306
13.2. Материалы	309
13.3. Методы	310
13.4. Примечания	315
Литература	316
ЧАСТЬ IV. КЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ	319
Глава 14. Томографические биомаркеры: ключ к принятию решений при инсульте (<i>Дж.Д. Вайсман, Дж.К. Бойзер, К. Кребс, Г.В. Пономарев</i>)	320
Аннотация	320
14.1. Введение	320
14.2. Ишемия, транзиторная ишемическая атака и инсульт	322
14.3. Методы визуализации инсульта	322
14.4. Острый инсульт	325
14.5. Эмболический и тромботический инсульт	328
14.6. Принятие решения о лечении инсульта и роль визуализации	335
14.7. Томографическое и клиническое несоответствие ядра и полутени	340
14.8. Внутримозговое кровоизлияние и церебральное микрокровоизлияние	350
14.9. Заключение	357
Литература	357

Глава 15. Методы нейровизуализации для диагностики и лечения острого инсульта (Мэтью Эламир, Кристофер И. Прайс)	365
Аннотация	365
15.1. Роль нейровизуализации при остром ишемическом инсульте	365
15.2. Патофизиология острого ишемического инсульта	368
15.3. Методы нейровизуализации при остром инсульте	371
15.4. Заключение	403
Литература	403
Глава 16. Ультразвуковая оценка риска транзиторной ишемической атаки и инсульта в сосудистой хирургии (Мелвиндер Басра, Роберт Э. Брайтвелл)	408
Аннотация	408
16.1. Предпосылки поражения сонной артерии	408
16.2. Исследование поражений сонной артерии	409
16.3. Ультразвуковое исследование для оценки поражений сонной артерии	409
16.4. Развитие методов визуализации на основе ультразвука	412
16.5. Режим яркости изображения	412
16.6. Анализ распределения пикселей	414
16.7. Трехмерное ультразвуковое исследование	416
16.8. Ультразвуковое исследование с контрастным усилением	418
16.9. Измерение деформации бляшки	419
16.10. Заключение	420
Литература	420
Глава 17. Предоперационные и интраоперационные маркеры церебральной ишемии (В.А. Лукин, Д.Ю. Усачев, А.В. Шмигельский, А.А. Шульгина, А.А. Огурцова)	423
Аннотация	423
17.1. Введение	423
17.2. Инструментальные маркеры церебральной ишемии	426
17.3. Материалы и методы	435
17.4. Заключение	442
Литература	442
Глава 18. Время — это мозг: догоспитальная фаза и мобильное инсультное отделение (Шрей Матур, Клаус Фассбендер)	447
Аннотация	447
18.1. Введение	447
18.2. Догоспитальный этап	450
18.3. Мобильное инсультное отделение	452

12 Оглавление

18.4. Мобильные инсультные отделения для экономии времени	460
18.5. Мобильные инсультные отделения как инструмент для сортировки	463
18.6. Направления дальнейших исследований	465
18.7. Действующие программы мобильных инсультных отделений	468
18.8. Заключение	470
Литература	471
Глава 19. Неотложное клиническое вмешательство и хроническое лечение острого нарушения мозгового кровообращения (Д.М.Р. Харкер)	480
Аннотация	480
19.1. Введение	480
19.2. Патология	482
19.3. Догоспитальный этап	486
19.4. Предварительная госпитализация	489
19.5. Визуализация	491
19.6. Биомаркеры инсульта в биологических жидкостях	492
19.7. Общее лечение острого ишемического инсульта	493
19.8. Лечение	494
19.9. Расположение	495
19.10. Гепарин и варфарин / прерывистая пневматическая компрессия / эластичные чулки эффективны при профилактике тромбоза глубоких вен	496
19.11. Выводы	498
Литература	499
ЧАСТЬ V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	503
Глава 20. Тенденции в развитии биомаркеров инсульта (Филип В. Пеплоу, Бриджит Мартинес, С.А. Дамбинова)	504
Аннотация	504
20.1. Введение	504
Литература	507

ИНТЕГРАТИВНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ПРИ ИНСУЛЬТЕ

С.А. Дамбинова, Бриджит Мартинес, Филип В. Пеплоу

Аннотация

Оценка инсульта — сложная комплексная задача; она должна включать интегративные методы, сочетающие клинические/функциональные, нейроструктурные и биохимические маркеры. Точная оценка инсульта и его надлежащее своевременное лечение необходимы для обеспечения благоприятного исхода и минимизации риска повторных осложнений. Однако адекватные ключевые индикаторы, связанные со сложностью структурных/субструктурных поражений, отражающих недостаточность нейроваскулярных областей, и реагирующие на изменения иммунитета из-за дисфункции мозга, все еще не найдены. В книге представлены современные и перспективные методы исследования биомаркеров инсульта, инновационные подходы к диагностике этого заболевания и достижения в области медицинских технологий.

Ключевые слова: мозг, инсульт, нейроваскулярные области; интегративные, функциональные, нейроструктурные, биохимические биомаркеры.

1.1. Введение

Инсульт, или «мозговую атаку», можно рассматривать как острое мультисистемное заболевание, включающее цереброваскулярную недостаточность тромботического или эмболического происхождения, вызывающую повреждение нейронов и активацию иммунной системы. Инсульт — одна из основных причин тяжелой инвалидности во всем мире; это заболевание занимает второе место по уровню смертности. Для повышения достоверности диагностики вероятного начала инсульта было бы целесообразно дополнить стандартный протокол клинической визуализации доступными анализами крови, позволяющими выявить биомаркеры мозга. При этом поиск ключевых показателей, которые одновременно связаны со сложностью

структурных/субструктурных поражений мозга, отражают недостаточность различных нейроваскулярных областей и реагируют на активацию клеточного иммунитета из-за поражений головного мозга, до сих пор актуален. Более того, инсульт подразделяют на три основных подтипа: транзиторная ишемическая атака (ТИА), церебральная ишемия и кровоизлияние, которые условно представлены как отдельные расстройства. В идеале необходимо создать панель из нескольких биомаркеров, эффективность которой для диагностики инсульта будет аналогична эффективности тропонина, который считают идеальным биомаркером сердечной недостаточности.

Ишемический инсульт — наиболее распространенный (75–80%) тип инсульта. Среди ишемических инсультов выделяют тромботические, когда сгусток образуется непосредственно в артерии, снабжающей кровью мозг, и эмболические, развивающиеся в результате закупорки мозговых артерий эмболами, образующимися в полости сердца, а затем переносимыми через кровоток в мозг. Тромботические инсульты составляют примерно 50% инсультов. Кортикальные и подкорковые поражения встречаются примерно в 80% случаев, нарушения в вертебрально-базилярной системе — примерно в 8% случаев, а в области ствола мозга — в 12% случаев.

Геморрагические инсульты составляют 20% инсультов со смертностью до 50%; их классифицируют в зависимости от места и причины кровотечения. При **внутри мозговом кровоизлиянии** (ВМК) кровь вытекает из разорвавшегося кровеносного сосуда в головном мозге. **Субарахноидальное кровоизлияние** — кровотечение из поврежденного кровеносного сосуда на поверхности мозга в субарахноидальном пространстве.

ТИА — краткие эпизоды неврологической дисфункции, вызванные недостаточным кровотоком и ишемией, когда клинические симптомы обычно длятся менее 1 ч без признаков острого инфаркта. Их часто недооценивают, о них нет сведений в анамнезе, и пациенты не получают должного лечения. После первой ТИА у 10–20% пациентов инсульт может случиться в течение следующих 90 сут, и у 50% этих пациентов инсульт возникает в течение первых 2 сут после ТИА.

Кроме того, у 20% пациентов, поступающих в отделения неотложной помощи, нет ишемии мозга, но есть так называемая имитация инсульта, включающая периферические параличи, осложненную мигрень, постиктальный парез, психологические расстройства и другие этиологии. Эти состояния следует отличать от инсульта. Другой ключевой вопрос: перенес ли пациент ТИА, острый ишемический или геморрагический инсульт? И еще одна важная проблема — своевременное определение области поражения (или поражений) сосудов, которая связана с тяжестью изменений состояния мозга и исходом заболевания.

Оценка инсульта — сложная и критически важная задача; она должна включать интегративные методы, сочетающие клинические/функцио-

нальные (шкалы инсульта), структурные (нейровизуализационные) и биохимические (отдельные индикаторы или панель индикаторов состояния головного мозга) маркеры. В клинической практике доступны некоторые современные подходы к диагностике инсульта с использованием биомаркеров нейровизуализации. Однако сами по себе они часто не обеспечивают достаточной точности, особенно при диагностике инсультов в результате закупорки мелких сосудов. Необходимой точности можно достичь, если дополнить нейровизуализацию экспресс-анализом крови, выполняемым на месте оказания медицинской помощи вместе с клиническим наблюдением.

Точная оценка и надлежащее своевременное лечение инсульта необходимы для благоприятного исхода этого заболевания и уменьшения риска рецидива. Экстренную терапию при подозрении на инсульт обычно инициирует персонал скорой помощи, но раннее распознавание этого заболевания часто затруднено из-за неоднородных клинических проявлений и отсутствия портативных диагностических технологий. Использование интегративных биомаркеров может позволить быстро выявлять пациентов, которым необходима персонализированная терапия, и избегать ситуации, когда лечение не приносит пользу, но вызывает побочные эффекты.

Разработка надежных биомаркеров заболеваний головного мозга значительно ускорит исследования этиологии, патофизиологии и прогрессирования ряда распространенных и разрушительных заболеваний нервной системы.

Данная книга посвящена новым методам исследования биомаркеров инсульта, инновационным подходам к диагностике и современным методам, применяемым в клинической практике. Международные эксперты в области исследования инсульта, как экспериментального, так и клинического, представили здесь последние достижения в передовых и хорошо зарекомендовавших себя медицинских технологиях лечения инсульта.

СОСУДИСТЫЕ БИОМАРКЕРЫ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Дэниел Артеага, Брэдфорд Б. Уорролл

Аннотация

Инсульт остается основной причиной смерти и инвалидности во всем мире, при этом подавляющее большинство всех случаев инсульта приходится на ишемический инсульт. Несмотря на успехи в лечении острого инсульта тканевым активатором плазминогена (tPA), а в последнее время и механической тромбэктомией, ограничения в использовании и доступность этих передовых методов лечения исключили возможность их применения для большинства пациентов. Более того, быстрая диагностика острого инсульта остается сложной задачей из-за возможной «имитации инсульта» (других состояний с аналогичными проявлениями) и отсутствия быстрых и легкодоступных средств для диагностики церебральной ишемии с помощью методов визуализации, таких как магнитно-резонансная томография (МРТ) или перфузионная компьютерная томография (КТ), в первые минуты или часы. Хотя в других областях медицины биомаркеры хорошо известны и широко используются в клинической практике (например, тропонин при повреждении миокарда), выявление и внедрение биомаркеров, связанных с инсультом, оказалось сложной задачей. В этой главе приведен краткий обзор нескольких ключевых диагностических сосудистых биомаркеров при ишемическом инсульте с указанием их текущего этапа разработки, ограничений в использовании, а также их потенциального применения и значения для лечения инсульта.

Ключевые слова: ишемический инсульт, сосуды, биомаркеры, молекулы, воспаление.

2.1. Введение

Как вторая ведущая причина смерти и основная причина инвалидности взрослых во всем мире, инсульт оказывает существенное влияние на обще-

ственное здоровье и экономику во всем мире [1]. Клиническая классификация с выделением ишемического и геморрагического подтипов отражает основной механизм развития; при этом на ишемический инсульт приходится более 85% инсультов. Наиболее частая этиология ишемического инсульта включает артериальный атеросклероз, окклюзию тромбом или эмболом *in situ*, окклюзию мелких сосудов из-за дегенеративных изменений сосудистой стенки и гипоперфузию сосудов головного мозга, хотя до 40% ишемических инсультов криптогенные [2]. В этой главе основное внимание уделено ишемическому инсульту.

За последние два десятилетия произошло быстрое развитие методов лечения ишемического инсульта. Причиной такого развития стало введение в медицинскую практику tPA и механической тромбэктомии, которые оказались чрезвычайно эффективны для извлечения внутрочерепного сгустка в неотложных ситуациях. Эти методы лечения коренным образом изменили порядок оказания помощи при остром ишемическом инсульте, преобразовав всю больничную систему таким образом, чтобы обеспечить своевременное оказание помощи.

Однако, хотя благодаря недавним разработкам окно для тромбэктомии расширилось до 24 ч [3, 4], требование наличия проксимальной окклюзии крупного сосуда делает невозможным применение этого метода у большей части пациентов, перенесших инсульт. Более того, tPA также имеет строгие критерии включения и исключения, которые разрешают его использование только в пределах 4,5-часового окна от последней известной нормы, что также значительно ограничивает долю пациентов, подходящих для этого вида терапии. Также продолжают изучать и другие методы лечения, включая тромболитики нового поколения [5], другие стратегии реваскуляризации [6] и терапию, начатую на догоспитальном этапе [7].

Что касается диагностики острого ишемического инсульта, появление МРТ и, в частности, диффузионно-взвешенной томографии произвело революцию в способности врачей надежно выявлять цереброваскулярные инфаркты. Несколько недавних крупных клинических испытаний подтвердили эффективность КТ для визуализации перфузии, причем как для обнаружения сердцевин инсульта (то есть необратимо поврежденной ткани), так и для выявления полутени (ткани, подверженной риску необратимого повреждения). Подтверждение в недавних клинических испытаниях и введение в практику эффективных терапевтических подходов [3, 4, 8] создали потенциал для более широкого внедрения таких передовых методов визуализации. К сожалению, стоимость и содержание аппаратов для МРТ и перфузионной КТ часто не позволяют использовать их во всех медицинских центрах по всему миру; даже в развитых странах необходимый для проведения этих исследований медицинский персонал часто не дежурит 24 ч в сутки. Таким образом, остается потребность в разработке быстрого и эко-

номичного метода для своевременной диагностики острого ишемического инсульта на основе анализа сыворотки крови.

На сегодняшний день выявлено множество сосудистых биомаркеров ишемического инсульта в крови, которые могли бы обеспечить быструю и экономичную диагностику этого заболевания. Однако хотя внедрение биомаркеров в других областях медицины, например в кардиологии, значительно изменило клиническую диагностику и сортировку пациентов, лишь немногие хорошо проверенные сосудистые биомаркеры ишемического инсульта получили широкое применение в клинических условиях; причины этого изложены далее. Введение в практику метода диагностики инсульта на основе анализа сыворотки крови, безусловно, увеличит количество правильных и своевременно поставленных диагнозов этого заболевания, что, в свою очередь, приведет к улучшению результатов лечения пациентов независимо от успешности использования терапевтических вмешательств, таких как tPA или тромбэктомия. Использование биомаркеров для диагностики также позволит улучшить обучение пациентов и профилактику инсульта. Более того, сосудистые биомаркеры могут стать одним из критериев отбора пациентов для процедуры тромболиза, помогая определить, каким пациентам с наибольшей вероятностью будет полезен tPA, а у каких пациентов риск кровотечения может перевесить пользу. В следующих разделах будут рассмотрены некоторые из таких биомаркеров.

2.2. Функция гематоэнцефалического барьера

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) выполняет важную функцию по поддержанию точного состава внеклеточной среды, образуя плотный барьер, позволяющий проникать молекулам, критически важным для нормальной функции нейронов, и ограничивать приток нейротоксических веществ. В нормальных физиологических условиях плотные контакты эндотелиальных клеток ГЭБ предотвращают попадание многих периферически циркулирующих молекул в центральную нервную систему (ЦНС). Однако цереброваскулярная ишемия вызывает двунаправленное разрушение ГЭБ и выброс сигнальных молекул из ЦНС в периферическое кровообращение, что приводит к привлечению иммунных клеток в мозг и развитию клеточного повреждения. Матриксные металлопротеиназы (ММП) — молекулы, способные разрушать ключевые структурные элементы, которые обычно служат для поддержания структуры и целостности ГЭБ. Повреждение ткани приводит к активации ММП, в результате чего цереброваскулярный эндотелий становится более проницаемым и менее избирательным. Из всех подтипов ММП особенно важную роль в развитии ишемии головного мозга играют ММП-2 и ММП-9 [9]. Примечательно, что уровень циркулирующей

ММП-9 может быть биомаркером как ишемии мозга [10], так и тяжести инсульта [11]. Было показано, что у мышей с нокаутом ММП-9 значительно снижается уровень разрушения ГЭБ после ишемического инсульта с меньшим конечным объемом инфаркта [12]. У людей с ишемическим инсультом концентрации циркулирующих ММП-9 и ММП-2 более высокие по сравнению с контрольной группой [13]. Интересно, что ММП также могут играть роль в восстановлении после ишемического инсульта, стимулируя образование и рост новых нейронов, а также помогая в процессе ремоделирования сосудов [14]. Повышенные уровни ММП-9 и ММП-2 приводят к фрагментации белков плотных контактов окклюдина и клаудинов [15]; при этом сывороточные уровни этих двух классов эндотелиальных белков тесно связаны с разрушением ГЭБ после ишемического инсульта. В частности, уровень окклюдина заметно увеличивается через 4,5 ч после окклюзии средней мозговой артерии (СМА), поэтому предполагают, что высвобождение окклюдина в ишемизированных микрососудах головного мозга может происходить после достижения порога повреждения ГЭБ [16]. Более того, ММП-2 опосредует деградацию окклюдина на ранних стадиях ишемического инсульта, что в дальнейшем приводит к нарушению ГЭБ [17]. Из всех подтипов клаудина в наибольшем количестве ГЭБ содержит клаудин-5, который играет особенно важную роль в индукции и поддержании герметичности плотных контактов [18]. У мышей с нокаутом гена клаудина-5, так же, как и у мышей с нокаутом гена ММП-9, плотные контакты в целом не разрушаются, но становятся избирательно проницаемы для небольших молекул (<800 Да) [19]. Оба эти белка плотных контактов — и окклюдин, и клаудин-5 — также, по-видимому, тесно связаны с риском геморрагической трансформации (см. далее в этой главе).

2.3. Воспалительные клетки

При остром ишемическом инсульте воспаление играет важную и преимущественно негативную роль. Большая часть повреждений, вызванных воспалительным каскадом в ответ на ишемию, развивается постепенно, в течение нескольких часов или дней [20–22]. Центральную роль в этом процессе играют лейкоциты. После активации тромбоцитами в месте окклюзии они высвобождают воспалительные цитокины и экспрессируют антигены, которые способствуют прикреплению к эндотелию. Это, в свою очередь, приводит к дальнейшему ишемическому повреждению из-за высвобождения активных форм кислорода, протеаз и других медиаторов воспаления в непосредственной близости от области ишемии.

На разных стадиях ишемического инсульта как часть воспалительного каскада экспрессируются многочисленные антигены адгезии лейкоцитов,

тромбоцитов и эндотелия. Среди этих антигенов: Mac-1 (макрофагальный антиген-1 — белок подсемейства β_2 -интегринов) и LFA-1 (антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов); селектины (семейство молекул адгезии), включая эндотелиальный селектин (Е-селектин) и лейкоцитарный селектин (L-селектин); члены семейства иммуноглобулинов, включая ICAM-1 (молекулу межклеточной адгезии 1) и VCAM-1 (молекулу адгезии клеток сосудов 1).

Рекрутирование лимфоцитов включает, по крайней мере, две различные стадии: (1) начальное связывание с низким сродством через взаимодействие лейкоцитов с эндотелием; (2) более поздние взаимодействия с высоким сродством, ведущие к более сильной адгезии. «Скатывание» лейкоцитов на ранних стадиях ишемического инсульта происходит после высвобождения цитокинов из поврежденных нейронов. Это, в свою очередь, приводит к активации L-селектина на лейкоцитах и Е-селектина на эндотелиальных клетках. В течение нескольких часов лейкоциты образуют даже более прочные адгезионные связи с эндотелием сосудов за счет экспрессии молекул адгезии, особенно Mac-1, LFA-1, ICAM-1 и VCAM-1 [23, 24].

Понимание патофизиологии этих молекул адгезии открыло многочисленные терапевтические возможности, направленные на эти молекулы и пути воспаления, в которых они участвуют. По сравнению с мышами дикого типа у мышей с нокаутом гена ICAM-1 меньше адгезия лейкоцитов, меньше размеры инфарктов и более низкая смертность после ишемии головного мозга [25]. У людей совместное введение tPA и антител против ICAM-1 может улучшить неврологический исход заболевания и повысить эффективность тромболитической терапии [26].

Точно так же у мутантных мышей, лишенных молекул LFA-1 или Mac-1, размеры инфарктов были меньше, а неврологические исходы лучше [27]. К сожалению, клинические испытания, в которых использовали стратегию борьбы с адгезией, основанную на этих экспериментальных результатах, не оправдали первоначальных ожиданий. Клинические испытания фазы III, в которых изучали антитела против ICAM в течение 6 ч после появления симптомов, фактически привели к увеличению смертности, увеличению объема инфаркта и побочным эффектам по сравнению с контролем [28]. Этот неожиданный отрицательный результат можно объяснить иммунным ответом на введение мышинных антител. Испытания антител против Mac-1 также привели к отрицательным результатам [29, 30].

Эти явно противоречивые результаты можно объяснить смешанными факторами, такими как возраст, пол и наличие сопутствующих состояний с соответствующими лежащими в основе воспалительными состояниями. Такие факторы могут приводить к аномальному уровню воспалительных маркеров во время ишемического инсульта по сравнению с людьми без этих сопутствующих состояний. Кроме того, более тщательного изучения может

потребовать неоднородность ишемического инсульта, включая продолжительность и величину ишемии, а также ее основной механизм.

Тем не менее некоторые многообещающие аспекты терапии, направленной на адгезию лейкоцитов, еще не до конца изучены, например комбинирование молекул, направленных против адгезии лейкоцитов, с тромболитиками. Учитывая стремление расширить окно лечения пациентов с ишемическим инсультом, продолжающиеся усилия по выявлению роли этих молекул адгезии во время ишемии мозга остаются оправданными.

2.4. Ключевые белки коагуляции

В этом разделе основное внимание будет уделено двум ключевым белкам свертывания крови (в последующих главах основное внимание будет уделено другим важным белкам свертывания крови). Фибриноген играет важную роль в гемодинамическом гомеостазе, участвуя как в агрегации тромбоцитов, так и во взаимодействиях лейкоцитов и эндотелиальных клеток. Повреждение эндотелия инициирует рекрутирование фибриногена, что, в свою очередь, приводит к воспалительной реакции и увеличению высвобождения фибриногена в печени.

Затем тромбин расщепляет фибриноген с образованием нерастворимого фибрина, который образует ячеистую сеть и стабилизирует тромб, обеспечивая образование окончательной гомеостатической пробки. Исследования, посвященные изучению фибриногена при остром ишемическом инсульте, показали большую тяжесть и ухудшение прогноза инсульта при более высоком уровне фибриногена [31–33]. Фибриноген может иметь более сильный прогностический эффект при ишемическом инсульте, чем при инфаркте миокарда [34]. Повышенный уровень фибриногена также увеличивает риск повторного инсульта [35]. Интересно, что исследования на животных показывают, что фибриноген обладает внутренней токсичностью для ЦНС и может способствовать апоптозу и нейродегенерации [36, 37]. В конечном итоге, хотя изменение концентрации фибриногена может быть сопутствующим явлением, возникающим в ответ на ишемию, его присутствие тем не менее может служить важным маркером исхода инсульта.

Фактор фон Виллебранда (vWF) также играет важную роль в адгезии и агрегации тромбоцитов в местах повреждения сосудов. Хотя он обычно имеет большое значение в поддержании гомеостаза, его высвобождение из эндотелиальных клеток в условиях атеросклеротического повреждения может привести к внезапному образованию тромба. В частности, фибриллярный коллаген типов I и III, экспонированный в месте повреждения, иммобилизует vWF, который впоследствии способствует связыванию с рецептором GPIIb на тромбоцитах. Кроме того, vWF способствует разви-

тию различных воспалительных процессов, включая усиление связывания лейкоцитов и их «перекатывания» при высоком напряжении сдвига [38]. Клинически повышение уровня vWF увеличивает риск первого и повторно-го инсульта и служит независимым фактором риска смерти после инсульта [39–41]. Эти данные подтверждены экспериментально: мыши с дефицитом vWF оказались не подвержены ишемии мозга и реперфузионному повреждению [42]. Моноклональные антитела, которые могут блокировать связывание как vWF с коллагеном, так и vWF с GPIIb/IIIa, в настоящее время проходят доклиническую и клиническую фазы тестирования [43]. При использовании в комбинации с tPA эти антагонисты vWF обладают дополнительным потенциалом — они могут предотвращать продолжающееся тромбообразование и способствовать спонтанному тромболизису.

2.5. Геморрагическая трансформация, связанная с тромболизисом

Тромболизис с помощью внутривенно введенного tPA эффективен и безопасен при соблюдении показаний/противопоказаний; однако у некоторых пациентов с острым ишемическим инсультом при этом все же существует 6% риск геморрагической трансформации [44]. Именно поэтому в последние несколько десятилетий внимание исследователей было сосредоточено на поиске специфических биомаркеров, которые могут предсказать возникновение вторичного внутримозгового кровоизлияния при тромболитической терапии. Такие биомаркеры могут позволить выявлять пациентов, относящихся к группе повышенного риска, чтобы избежать развития этого опасного осложнения при введении tPA. Однако в настоящее время нет достаточных доказательств того, что нахождение таких биомаркеров должно служить показанием для отмены внутривенного введения tPA, и эти биомаркеры не используют в обычной клинической практике. Несколько таких биомаркеров, обсуждаемых ниже, считают многообещающими, но сначала необходимо их надлежащее тестирование.

И гепатоциты, и цереброваскулярный эндотелий продуцируют фибронектин, вездесущий гликопротеин, который играет важную роль в заживлении ран, гемостазе и агрегации тромбоцитов. Фибронектин содержит функциональные домены, которые взаимодействуют со множеством других молекул, участвующих в каскаде коагуляции и воспалительной реакции, включая фибрин и фибриноген, а также циркулирующие лейкоциты. Уровень фибронектина в плазме хорошо коррелирует с повреждением сосудов [45, 46]. Castellanos и соавт. продемонстрировали, что уровень фибронектина >3,6 мг/мл предсказывает риск паренхиматозного кровоизлияния, связанного с введением tPA, со 100% чувствительностью и 60% специфич-

ностью, что вызвало энтузиазм по поводу его потенциала в качестве начального инструмента скрининга. Хотя для определения надежности этого биомаркера для прогнозирования кровотечения после тромболитической терапии и определения целевых пороговых значений потребуются дальнейшая работа, эти предварительные результаты весьма обнадеживают.

Более низкий уровень ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) и более высокий уровень TAFI (активируемый тромбином ингибитор фибринолиза) также были связаны с геморрагической трансформацией после tPA [47]. Комбинация этих двух биомаркеров дает лучшие тестовые характеристики: уровень PAI-1 $>180\%$ и уровень TAFI $<21,4$ нг/мл позволяют прогнозировать геморрагическую трансформацию после tPA с чувствительностью 75% и специфичностью 97%. Как упомянуто в следующем разделе, обе эти молекулы играют важную роль в фибринолизе, причем PAI-1 служит основным ингибитором tPA, а TAFI — ингибитором лизиса сгустка.

По уровню ММП-9 также можно прогнозировать кровотечение после тромболиза. Как упоминалось ранее, ММП играют важную роль в поддержании и целостности гематоэнцефалического барьера. Сам tPA активирует ММП-9, поэтому неудивительно, что повышенный уровень ММП хорошо предсказывает связанное с tPA кровотечение. Фактически исходный уровень ММП-9 до введения tPA точно предсказывает геморрагическую трансформацию [48]. Более того, уровень ММП-9 выше 140 нг/мл у пациентов с ишемическим инсультом, не получавших tPA, прогнозирует внутримозговое кровотечение с чувствительностью 92% и специфичностью 74% [45].

2.6. Статус реканализации

В настоящее время визуализация сосудов — единственный клинически доступный метод определения статуса реканализации после ишемического инсульта. Важно отметить, что ни один диагностический тест, используемый в клинической практике, не может предсказать вероятность успешной реперфузии после тромболитической терапии. Тем не менее несколько недавно идентифицированных важных белковых маркеров могут позволить определять степень ревазуляризации на основе анализа сыворотки крови. С помощью этих биомаркеров можно будет не только определять успешность ревазуляризации после тромболиза, но и прогнозировать вероятность того, что реперфузия будет эффективной. Тот факт, что эндогенные факторы, участвующие в фибринолизе и коагуляции, вероятно, регулируют физиологические реакции, возникающие в ответ на тромболитис, делает более понятным принцип, лежащий в основе этого теста. Такое тестирование позволит более адекватно отбирать кандидатов для тромболитической терапии, в том числе определять пациентов, которым тромболитис не показан

и которых в первую очередь следует направлять в центры комплексного лечения инсульта с возможностью эндоваскулярного лечения.

Перспективными биомаркерами для оценки реперфузии считают металлопротеиназу ADAMTS13, принадлежащую семейству белков ADAM (от англ. A Disintegrin And Metalloproteinase — дезинтегрин А и металлопротеиназа), растворимый эндотелиальный рецептор протеина С (sEPCR); растворимый тромбомодулин (sTM) и α_2 -антиплазмин. В частности, повышенный уровень ADAMTS13 и пониженный уровень sEPCR, sTM и α_2 -антиплазмина связаны с повышенной вероятностью достижения реканализации после tPA [49–51]. Металлопротеиназа ADAMTS13 (также известная как протеаза, расщепляющая vWF, в англоязычной литературе — VWFCP) расщепляет vWF, высвобождаемый эндотелием в условиях напряжения сдвига, и подавляет его активность, тем самым снижая тромбогенную активность. Низкий уровень ADAMTS13 указывает на протромботическое состояние, связанное с острым инфарктом миокарда и ишемическим инсультом [52, 53]. Хотя значение низкого уровня ADAMTS13 после неудачной реканализации с помощью tPA до конца не изучено, Bustamante и соавт. [49] предположили, что снижение уровня ADAMTS13 может служить спусковым крючком для ишемии и/или способствовать увеличению тромба.

В отличие от ADAMTS13, низкий уровень α_2 -антиплазмина указывает на антитромботическое состояние. α_2 -антиплазмин — самый мощный ингибитор плазмينا, который, в свою очередь, ответственен за разрушение фибриновых сгустков. Уровень α_2 -антиплазмина в плазме $>85\%$ его нормального уровня прогнозирует реканализацию с чувствительностью 25% и специфичностью 85% [50].

sEPCR и sTM задействованы в каскаде реакций с участием протеина С, который замедляет образование сгустка. Эндотелиальные клетки, которые не повреждены, как правило, имеют более высокие уровни экспрессии sEPCR и sTM (и, следовательно, более низкие уровни в сыворотке), защищая эндотелий от тромботических событий. Напротив, уход sEPCR и sTM с поверхности эндотелия (приводящий к более высоким уровням в сыворотке) может указывать на дисфункцию эндотелия и предрасположенность к тромбозу.

Также потенциальными биомаркерами состояния реваскуляризации считают фоллистатин-подобный белок 1 (FSTL1), малые тромбоцитарные микрочастицы и тромбин–антитромбиновый комплекс (ТАТ). FSTL1 — цитокин, высвобождаемый мышцами; показано, что он стимулирует реваскуляризацию у крыс после ишемического повреждения, активируя в эндотелиальных клетках сигнальный каскад с участием NO-синтазы [54]. Совсем недавно малые тромбоцитарные микрочастицы, высвобождаемые из активированных тромбоцитов, были идентифицированы как потенциальный биомаркер реканализации цереброваскулярной системы [55]. В этом иссле-

довании, опубликованном Bivard и соавт., у пациентов с ишемическим инсультом, получавших внутривенный tPA, значительно увеличивался уровень CD41+ микрочастиц. Считают, что эти микрочастицы выделяются тромбоцитами после восстановления кровотока. Неудивительно, что у пациентов с повышенным уровнем CD41+ микрочастиц также наблюдали тенденцию к улучшению долгосрочных результатов лечения. Тромбин — сериновая протеаза и главный компонент каскада свертывания крови — расщепляет фибриноген до фибрина, активирует тромбоциты, активирует фактор XIII (который, в свою очередь, стабилизирует фибрин/сгустки) и активирует протеин C. Таким образом, низкий уровень тромбина, в частности ТАТ, может улучшить исход ишемического инсульта. Fernandez и соавт. подтвердили это, определив, что уровень ТАТ до лечения коррелировал со статусом реканализации после лечения tPA [56]. При этом, хотя в данном исследовании уровень ТАТ перед лечением не коррелировал с показателями смертности, в другой работе, посвященной изучению уровня ТАТ через 24 ч после введения tPA (которые также имели повышенную статистическую мощность), было показано, что при более низких уровнях ТАТ смертность более низкая [57].

Наконец, стоит упомянуть, что полиморфизмы, влияющие на уровень активности двух ингибиторов фибринолиза, PAI-1 и TAFI, также влияют на скорость успешной реканализации с помощью tPA [58]. PAI-1 — основной ингибитор tPA — предотвращает активацию плазминогена путем связывания и образования комплекса с tPA. Было показано, что уровень PAI-1 <34 нг/мл предсказывает плохой ответ на тромболизис [59]. TAFI — профермент, который удаляет остатки лизина из фибрина, фактически подавляя дальнейший фибринолиз. При максимальной активации TAFI для сохранения времени лизиса сгустка концентрация tPA должна быть выше примерно в 8 раз [60]. Совместное введение tPA с ингибитором TAFI сокращает время реперфузии в 3 раза [61]. Исходя из приведенных данных, можно предположить, что введение этих ингибиторов фибринолиза вместе с tPA может повысить эффективность тромболизиса и таким образом улучшить функциональные результаты лечения.

2.7. Профилактика ишемического инсульта

Сосудистые биомаркеры используют для диагностики и прогноза, однако также их изучение может помочь лучше понять механизмы действия методов лечения ишемического инсульта. Было показано, что терапия ацетилсалициловой кислотой + дипиридамолом с пролонгированным высвобождением (Агренокс[®]) или только ацетилсалициловой кислотой приводит к быстрому восстановлению трех уровней эндотелиальной NO-синтазы в плазме [62].