

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЦАРЕНКО ТЕТЯНА МИХАЙЛІВНА

УДК 577.112.7:612.115

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЗВИТОК ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ У ПАЦІЄНТІВ З ДІАБЕТОМ 2
ТИПУ**

03.00.04-біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Царенко Т.

Науковий керівник **Савчук Олексій Миколайович**, доктор біологічних наук, професор

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

Царенко Т.М. Розвиток ішемічного інсульту у пацієнтів з діабетом 2 типу. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04-біохімія. – ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2018.

Виявлення передумов, що лежать в основі виникнення ішемічного інсульту, пошук маркерів на основі яких можна оцінити стан пацієнта та верифікувати стадію захворювання, а також деталізація молекулярно-біохімічних механізмів, що обумовлюють розвиток та прогресування ускладнень після перенесеного інсульту є, безперечно, нагальною та актуальною проблемою сьогодення, яка набуває особливої гостроти з огляду на невтішну статистику щодо зростання темпів поширення даної патології.

Згідно сучасних уявлень щодо патогенезу ішемічного інсульту, серед основних причин розвитку та прогресування гострих порушень мозкового кровопостачання ішемічного генезу виділяють порушення у системі гемостазу, які часто не лише передують прояву інсульту, а й можуть зберігатися впродовж тривалого часу після перенесеного захворювання, створюючи постійну загрозу виникнення рецидивів.

Подібна ситуація набуває особливої значимості для хворих, що мають в анамнезі довготривалі хронічні захворювання, метаболічні розлади, які безпосередньо або опосередковано впливають на гемостаз. Цукровий діабет та низка асоційованих з ним метаболічних порушень є визнаними факторами ризику виникнення ішемічного інсульту, тому своєчасна діагностика та моніторинг стану хворих є однією з превентивних стратегій, спрямованих на попередження виникнення інсульту та збереження здоров'я пацієнтів.

Під час виконання роботи було проаналізовано широкий спектр показників, які дозволяють охарактеризувати стан окремих ланок систему гемостазу та її функціональну активність у цілому у хворих з ішемічним інсультом окремо та на фоні цукрового діабету 2 типу.

Одержані у ході дослідження результати не лише істотно поглиблюють існуючі на сьогодні уявлення щодо стану системи гемостазу за ішемічного інсульту, а й дозволяють виокремити деякі критерії ризику виникнення та прогресування ускладнень у хворих на цукровий діабет.

Внаслідок проведеного дослідження виявлено суттєві зміни у функціонуванні системи зсідання крові, судинно-тромбоцитарній та фібринолітичній ланках, які свідчать про підвищений коагуляційний потенціал крові, а відтак, схильність до розвитку тромбозів у пацієнтів обох дослідних груп. Всі виявлені нами зміни досліджуваних показників були більш виражені у хворих з цукровим діабетом 2 типу, що може бути обумовлено комплексом метаболічних порушень, характерних для патогенезу даного захворювання.

Скорочення часу зсідання плазми у тесті «анцистроновий час», зростання активності фактору X вказують на посилення реакцій, що лежать в основі активації коагуляційного каскаду у хворих з ішемічним інсультом окремо та на фоні цукрового діабету 2 типу. Підтвердженням протромбогенного характеру змін у системі гемостазу слугує накопичення у плазмі крові відомого маркера гіперкоагуляційного стану – розчинних фібрин мономерних комплексів та зростання рівня протромбінового пулу, що свідчить про активізацію процесу перетворення протромбіну та високу активність утвореного тромбіну. За таких умов підвищена концентрація фібриногену слугує додатковим фактором, що значно підвищує ризик тромбоутворення у хворих, що перенесли інсульт.

Подальшому прогресуванню порушень та нарощуванню прокоагуляційного потенціалу сприяє зниження активності фібринолітичної системи, оцінене нами за значним подовженням часу лізису еуглобулінів та Хагеман-залежного фібринолізу.

Відповідно до наших досліджень, недостатність фібринолітичної системи пов'язана, перш за все, з пригніченням відносної активності плазміногену, що знижує ймовірність генерування кількостей плазміну, необхідних для забезпечення належного балансу між процесами коагуляції та фібринолізу.

Дисбаланс вмісту основних регуляторів плазміногену (значне зниження вмісту ТАП і зростання вмісту ПАІ-1), які синтезуються ендотеліальними клітинами судинної стінки, свідчить про структурно-функціональні зміни на рівні ендотелію судин та вказує на участь ендотеліальної дисфункції як ключового чинника порушень у системі гемостазу у пацієнтів з інсультом окремо та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу. Встановлено перевищення значень фізіологічної норми рівня фактору фон Віллебранда, який є ще одним визнаним маркером ендотеліальної дисфункції.

Нашими експериментальними дослідженнями показано зміни властивостей тромбоцитів, які виявлялися у зростанні швидкості та максимальної амплітуди агрегації тромбоцитів у відповідь на дію індукторів. Тромбоцитарна дисфункція узгоджується із зростанням рівня сироваткового серотоніну, який з огляду на багатофункціональність, у тому числі і виражений вплив на функціонування судинно-тромбоцитарної ланки гемостазу, може розглядатися як негативний прогностичний маркер подальшого перебігу захворювання.

Виявлено зростання відносного вмісту прозапальних цитокінів інтерлейкіну-6 та фактору некрозу пухлин альфа у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом окремо та на фоні цукрового діабету 2 типу. Активне залучення медіаторів запалення у процеси контролю та перебігу багатьох фізіологічних і патологічних реакцій як за рахунок їх впливу на регуляцію експресії низки генів, так і безпосередньо через їх цитотоксичну активність та здатність індукувати загибель клітин, визначає запальний процес як один з вагомих тригерних механізмів реалізації порушень, спричинених патогенезом ішемічного інсульту.

Встановлене нами зниження концентрації загального білка, накопичення у сироватці крові пацієнтів олігопептидів та поява у кровотоці активованих ММП-2 і

ММП-9, свідчить про порушення протеолітичного балансу та внесок протеолітичних реакцій у реалізацію патофізіологічних проявів ішемічного інсульту.

Дисфункціонування системи гемостазу, зокрема, втрата контролю над механізмами регуляції вмісту та активності плазміногену за умови активізації протеолітичних реакцій, може призводити до утворення та накопичення у кровотоці частково деградованих форм плазміногену, які не є нормою для фізіологічного стану організму. Подальша циркуляція у кров'яному руслі таких неспецифічних молекул, потенційно здатних виявляти ферментативну активність, може становити небезпеку ініціації неспецифічних механізмів регуляції перебігу окремих реакцій в організмі та сприяти генералізації патологічного процесу.

Виявлене у ході проведених досліджень накопичення у сироватці крові пацієнтів обох дослідних груп маркерів ендогенної інтоксикації – молекул середньої маси, корелює із посиленням протеолізу та активізацією запальних реакцій і свідчить про суттєві метаболічні зрушення за розвитку ішемічного інсульту.

Отримані у ході експериментального дослідження результати вказують на комплексний характер змін у системі гемостазу, які виражаються у домінуванні реакцій, спрямованих на підтримання високого протромбогенного потенціалу крові у пацієнтів з ішемічним інсультом окремо та інсультом на фоні цукрового діабету. Зазначені порушення у системі гемостазу відбуваються на фоні запального процесу, змін ліпідного профілю, синдрому ендогенної інтоксикації, порушень протеолітичного гомеостазу, які, у свою чергу, не лише є проявом метаболічних перебудов, що супроводжують розвиток багатьох патологічних станів, а й на різних рівнях активно залучаються у регуляцію вмісту та активності ключових компонентів системи гемостазу, сприяючи у такий спосіб формуванню позитивного зворотного зв'язку.

Отримані результати щодо того, що гостра фаза ішемічного інсульту супроводжується розвитком ряду станів, які є універсальними для багатьох захворювань та обумовлюють неспецифічні прояви даних патологій, обґрунтовують

доцільність включення у панель необхідних клінічних аналізів біомаркерів, що характеризують ці стани.

Ключові слова: ішемічний інсульт; цукровий діабет 2 типу; система гемостазу; запалення; ендогенна інтоксикація; протеоліз.

SUMMARY

Tsarenko T.M. Development of ischemic stroke in patients with type II diabetes. – Manuscript.

The thesis for candidate of biological sciences degree in specialty 03.00.04 – biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

The identification of prerequisites underlying the onset of ischemic stroke, the search for markers on the basis of which it is possible to assess the patient's condition and to verify the stage of the disease, as well as the details of the molecular and biochemical mechanisms that determine the development and progression of complications after a stroke, is an undeniable, urgent and actual problem. The present, which is particularly acute due to the disappointing statistics regarding the growth of the rate of spread of this pathology.

According to contemporary ideas about the pathogenesis of ischemic stroke, among the leading causes of the development and progression of acute cerebrovascular impairment of ischemic genesis, there are disturbances in the hemostasis system, which often not only precede the manifestation of stroke, but can also persist for a long time after the disease, creating a permanent threat of recurrence. A similar situation becomes especially important for patients with a history of long-term chronic diseases, metabolic disorders with which they are directly related or capable of indirectly affecting hemostasis. Diabetes mellitus and a number of metabolic disorders associated with it are recognized risk factors for ischemic stroke, so timely diagnosis and monitoring of patients' status is one of the preventive strategies for preventing stroke and preserving patient health.

During the course of the work, a wide range of indicators was analyzed that allows characterizing the state of individual units of the hemostasis system and its functional activity in general in patients with ischemic stroke separately and against the background of type II diabetes mellitus. The results obtained during the study not only significantly exacerbate the present idea of the state of the hemostasis system for ischemic stroke, but also allow to distinguish some of the criteria for the risk of the onset and progression of complications in patients with diabetes mellitus. Significant changes were found in the functioning of the blood-sucking, vascular, platelet and fibrinolytic linkages, indicating an increased blood coagulation potential, and thus a tendency to develop thrombosis in patients of both experimental groups. All of our findings of the studied indicators were more pronounced in patients with diabetes mellitus, which may be due to a complex of metabolic disorders characteristic of the pathogenesis of the disease. Reducing the time of plasma alignment in the test "antsistron time," an increase in the activity of the factor X indicates an increase in the reactions that underlie the activation of the coagulation cascade in patients with ischemic stroke separately and against the background of type II diabetes mellitus. Confirmation of the prothrombogenic nature of changes in the hemostasis system is the accumulation in the blood plasma of a well-known marker of the hypercoagulative state - soluble fibrins of monomeric complexes and the growth of the level of the prothrombin pool, which indicates the activation of the process of transformation of prothrombin and the high activity of the formed thrombin. Under such conditions, increased fibrinogen concentration is an additional factor that greatly increases the risk of thrombosis in stroke patients. Further progression of disturbances and build-up of the prokoagulation potential is facilitated by the decrease in the activity of the fibrinolytic system, which we estimate for a significant lengthening of the lysis time of euglobulins and Hageman-dependent fibrinolysis. According to our studies, the failure of the fibrinolytic system is primarily due to inhibition of the relative activity of plasminogen, which reduces the probability of generating plasma amounts necessary to ensure a proper balance between coagulation and fibrinolysis.

The imbalance in the content of the main regulators of plasminogen (a significant decrease in the content of TAP and increase in the content of PAI-1), which are synthesized by endothelial cells of the vascular wall, indicate structural and functional changes at the level of endothelium of blood vessels and postulates the involvement of endothelial dysfunction as a key factor in disorders of hemostasis in patients with stroke separately and a stroke on the background of diabetes mellitus. Exceeding the values of the physiological norm of the von Willebrand factorial level, which is another recognized marker of endothelial dysfunction. Our experimental studies have shown changes in the properties of platelets, which are manifested in the increase of speed and maximum amplitude of platelet aggregation in response to the action of inductors. The dysfunction is consistent with the increase in serum serotonin levels, which, given the multifunctionality, including the pronounced effect on vascular thrombocytopenic hemostasis, may be considered as a negative prognostic marker for subsequent course of the disease.

The relative content of proinflammatory cytokines of interleukin-6 and factor of necrosis of alpha tumors in serum of patients with ischemic stroke separately and against the background of type II diabetes mellitus was revealed. The active involvement of inflammatory mediators in the process of control and flow of many physiological and pathological reactions both due to their influence on the regulation of expression of a number of genes, and directly through their cytotoxic activity and the ability to induce cell death, determines inflammation as one of the important trigger mechanisms for the implementation of disorders, caused by the pathogenesis of ischemic stroke.

The decrease in the concentration of the total protein, the accumulation of oligopeptides in the blood serum of patients on the background of identification in the blood flow of activated MMP-2 and MMP-9 indicates the violation of the proteolytic balance and the contribution of proteolytic reactions to the implementation of pathophysiological manifestations of ischemic stroke. Dysfunctioning of the hemostasis system, in particular, the loss of control over the mechanisms of regulation of the content and activity of plasminogen, provided that activation of proteolytic reactions can be intensified, may lead to the formation and accumulation of partially degraded forms of

plasminogen in the blood that are not normal for the physiological state of the organism. Subsequent circulation in the bloodstream of such nonspecific molecules potentially capable of detecting enzymatic activity may pose a risk of initiation of nonspecific mechanisms for regulating the course of individual reactions in the body and promote the generalization of the pathological process.

In the course of the research, the accumulation of serum blood in patients of both experimental groups of endogenous intoxication markers, the medium mass molecules, completely correlates with the enhancement of proteolysis and activation of inflammatory reactions and can serve as confirmation of significant metabolic changes in the development of ischemic stroke. The results obtained during the experimental study indicate the complex nature of changes in the hemostasis system, which are expressed in the dominance of reactions aimed at maintaining a high prothrombogenic potential of blood in patients with ischemic stroke alone and a stroke on the background of diabetes mellitus. These disorders in the hemostasis system take place against the backdrop of the inflammatory process, changes in the lipid profile, endogenous intoxication syndrome, violations of proteolytic homeostasis, which, in turn, serve not only as a non-specific manifestation of metabolic alterations, which accompany the development of many pathological conditions, but also at different levels of activity are involved in the regulation of the content and activity of the key components of the hemostasis system, thus contributing, thus, to closing the peculiar "vicious circle".

The obtained results confirm that the acute phase of ischemic stroke is accompanied by the development of a number of conditions that are universal for many diseases and cause non-specific manifestations of these pathologies, justifies the expediency of including in the panel the necessary clinical analyzes of biomarkers characterizing these conditions.

Keywords: ischemic stroke; diabetes mellitus type II; hemostasis system; inflammation; endogenous intoxication; proteolysis.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. Tsarenko T, Kostiuk O, Kravchenko O, Savchuk O, Ostapchenko L. The markers of platelet functions and von Willebrand factor serum content from patients with type 2 diabetes mellitus and ischemic stroke. *Biomedical Research and Therapy*. 2016; 3: 542-547.
2. Царенко Т, Пажукова Є, Тимошенко М, Кравченко О. Клініко-біохімічні показники обміну білків та вміст електролітів у крові пацієнтів за умов ішемічного інсульту, ускладненого цукровим діабетом другого типу. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка/ Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. 2016; 1(20): 49-53.
3. Царенко Т, Кравченко О, Савчук О. Ліпопротеїновий профіль та активність маркерних ензимів печінки у крові пацієнтів з цукровим діабетом другого типу за умов розвитку ішемічного інсульту. *Вісник Львівського університету Серія біологічна*. 2016; 73: 329-335.
4. Царенко Т, Гайда Л, Кравченко О. Показники ендотоксемії пацієнтів із ішемічним інсультом та цукровим діабетом другого типу. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. 2016; 2(21): 57-61.
5. Царенко Т.М., Тимошенко М.О., Кравченко О.О. Вміст фібриногену та протромбіну за умов ішемічного інсульту ускладненого цукровим діабетом другого типу. *Scientific journal «Science rise: biological science»*. 2017; 6(9): 23-26 (здобувачем особисто проведено визначення вмісту фібриногену та протромбіну у плазмі крові, підготовлено статтю до друку).
6. Царенко Т, Ракша Н, Кравченко О. Матриксні металопротеїнази у патогенезі ішемічного інсульту, ускладненого цукровим діабетом II типу. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. 2018; 2(21): 57-61.

7. Kravchenko O, Melnyk V, Tsarenko T, Kostiuk O, Halenova T, Raksha N, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. The blood coagulation tests from ischemic stroke patients with or without type 2 diabetes mellitus. *Biomedical Research*. 2018; 29(14): 2938-43.
8. Tsarenko T, Kravchenko O, Savchuk O, Ostapchenko L. Serotonin and von Willebrand Factor Serum Content under Ischemic Stroke with or without Type 2 Diabetes Mellitus. 61st Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Hemostasis Research P.343.
9. Tsarenko T, Kravchenko O, Savchuk O, Ostapchenko L. Protein C and factor X activities from patients with ischemic stroke and type II diabetes mellitus. The 61st Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Hemostasis Research, 15-18 February 2017: abstract book. – Basel, Switzerland, 2017.
10. Царенко Т, Пажукова Є, Кравченко О. Активність трансаміназ та вміст сечовини у сироватці крові хворих на цукровий діабет 2 типу з ішемічним інсультом. XII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів Молодь і поступ біології, 19-21 квітня 2016 р.: матер. конфер. – Львів, 2016.
11. Царенко Т, Сімеонова М, Кравченко О. Вміст електролітів та загального білка в сироватці крові хворих на цукровий діабет 2 типу з ішемічним інсультом. XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених Шевченківська весна, 6-8 квітня 2016 р.: матер. конфер. - Київ, 2016. – С.181.
12. Tsarenko T, Kravchenko O, Savchuk O, Ostapchenko L. The Coagulation Tests from Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Ischemic. *Stroke Cerebrovasc Dis*, 15-17 July 2016: abstract book. - Brisbane, Australia, 2016. – P. 90.
13. Царенко Т, Юрченко А, Савчук О. Дисфункціонування тромбоцитів у хворих на цукровий діабет 2 типу з ішемічним інсультом. XIII міжнародна наукова конференція молодих вчених «Шевченківська весна: Біологія-2015», 2015 р.: матер. конфер. - Київ, 2015. - С. 100.
14. Tsarenko T, Yurchenko A, Savchuk O, Ostapchenko L. Functioning change of serotonin metabolism in blood of patients with type 2 diabetes mellitus and ischemic

stroke. Abstract of 40th FEBS Congress, 4-9 July 2015: abstract book. - Berlin, Germany, 2015. – P140.

15. Царенко Т, Юрченко А, Савчук О, Остапченко Л. Зміни функціонування системи метаболізму серотоніну в крові хворих на цукровий діабет 2 типу з ішемічним інсультом. XI Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології», 20 - 25 квітня 2015 р.: матер. конфер. - Львів, 2015.

16. Tsarenko T, Savchuk O, Kravchenko O. Fibrinogen and soluble fibrin monomer complex blood content in patients with ischemic stroke and diabetes mellitus. Acta Biochimica Polonica.Supl. 1. 2016. Abstracts of X Parnas Conference Young Scientist Forum "Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine", 10-12 July 2016: матер. конфер. - Wrocław, Poland, 2016. - P.18.

17. Царенко Т, Юрченко А, Савчук О. Дисфункціонування тромбоцитів у хворих на цукровий діабет 2 типу з ішемічним інсультом. XIII міжнародна наукова конференція молодих вчених «Шевченківська весна: Біологія-2015», 2015: матер. конфер. - Київ, 2015. - С. 100.

18. Царенко Т, Юрченко А, Савчук О, Остапченко Л. Зміни функціонування системи метаболізму серотоніну в крові хворих на цукровий діабет 2 типу з ішемічним інсультом. XI Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології», - 20 - 25 квітня 2015 р.: матер. конфер. - Львів, 2015.

19. Пажукова Є, Кравченко О. Активність трансаміназ та вміст сечовини у сироватці крові хворих на цукровий діабет 2 типу з ішемічним інсультом. XII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів Молодь і поступ біології, 19-21 квітня 2016р.: матер. конфер. – Львів, 2016.

20. Царенко ТМ, Сімеонова МС, Кравченко ОО. Вміст електролітів та загального білка в сироватці крові хворих на цукровий діабет 2 типу з ішемічним інсультом. XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених Шевченківська весна: Біологія, 6-8 квітня 2016 р.: матер. конфер. – Київ, 2016. - С.181.

ЗМІСТ

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	16
ВСТУП.....	17
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	23
1.1. Загальна характеристика системи гемостазу.....	23
1.2. Особливості функціонування системи гемостазу за ішемічного інсульту.....	32
1.3. Цукровий діабет 2 типу як ризик фактор протромбогенного стану.....	41
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи.....	49
2.1. Характеристика груп, які досліджувалися	49
2.2. Реагенти і матеріали	49
2.3. Обладнання	50
2.4. Отримання плазми крові.....	50
2.5. Отримання плазми крові, збагаченої тромбоцитами.....	51
2.6. Визначення концентрації ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ), ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), тригліцеридів та загального холестеролу у сироватці крові.....	51
2.7. Визначення аланінамінотрансферазної активності у сироватці крові.....	52
2.8. Визначення активності аспартатамінотрансферази у сироватці крові.....	52
2.9. Визначення активності гамма-глутамілтранспептидази у сироватці крові.....	53

2.10.	Визначення активності лужної фосфатази у сироватці крові.....	53
2.11.	Визначення концентрації креатиніну у сироватці крові.....	53
2.12.	Визначення концентрації сечовини у сироватці крові.....	54
2.13.	Визначення тромбінового часу зсідання плазми крові.....	54
2.14.	Визначення протромбінового часу зсідання плазми крові.....	55
2.15.	Визначення активованого часткового тромбoplastинового часу зсідання плазми крові	55
2.16.	Визначення анцистронового часу зсідання плазми крові.....	55
2.17.	Визначення рівня протромбінового пулу у плазмі крові.....	55
2.18.	Визначення концентрації фібриногену у плазмі крові.....	56
2.19.	Визначення концентрації розчинних фібрин-мономерних комплексів у плазмі крові.....	57
2.20.	Дослідження параметрів АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів.....	57
2.21.	Визначення загального часу лізису еуглобулінів плазми крові.....	58
2.22.	Визначення часу Хагеман-залежного фібринолізу плазми крові.....	58
2.23.	Визначення відносного рівня тканинного активатора плазміногену та інгібітору активатора плазміногену типу 1.....	59
2.24.	Визначення активності плазміногену у плазмі крові.....	59
2.25.	Визначення активності α_2 -антиплазміну у плазмі крові.....	60
2.26.	Визначення концентрації олігопептидів та молекул середньої маси у сироватці крові.....	60
2.27.	Визначення концентрації білка.....	60
2.28.	Визначення відносного вмісту інтерлейкіну-6 та TNF α у сироватці крові.....	61
2.29.	Визначення відносного вмісту ММП-2 та ММП-9 у сироватці крові.....	61
2.30.	Ензим-електрофорез (зимографія) у поліакриламідому гелі за	62

присутності додецилсульфату натрію.....	
2.31. Визначення концентрації серотоніну та триптофану у сироватці крові.....	63
2.32. Статистична обробка отриманих результатів.....	63
РОЗДІЛ 3. Загальна клініко-біохімічна характеристика пацієнтів з ішемічним інсультом та пацієнтів, що хворіли на цукровий діабет 2 типу.....	65
РОЗДІЛ 4. Загальна характеристика окремих ланок системи гемостазу у пацієнтів з ішемічним інсультом та пацієнтів, що хворіли на цукровий діабет 2 типу	83
РОЗДІЛ 5. Біохімічні особливості патогенезу ішемічного інсульту у пацієнтів з ішемічним інсультом та пацієнтів, що хворіли на цукровий діабет 2 тип.....	120
ЗАКЛЮЧЕННЯ	159
ВИСНОВКИ	173
Список використаної літератури	176

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ

A₂-АП – α₂-антиплазмін

ДВЗ-синдром – синдром дисемінованого внутрішньосудинного згортання

ІХС – ішемічна хвороба серця

ЛП – ліпопротеїди

ЛПВЩ – ліпопротеїди високої щільності

ЛПНЩ – ліпопротеїди низької щільності

ЛА – ліпопротеїди атерогенні

ММП – матриксні металопротеїнази

МСМ – молекули середньої маси

ПААГ – поліакриламідний гель

ПАІ-1 – інгібітор активатора плазміногену типу -1

ПП – пептидний пул

Пг – плазміноген

РФМК – розчинні фібрин-мономерні комплекси

Ск – стрептокіназа

ТАП – тканинний активатор плазміногену

ТІА – транзиторна ішемічна атака

ТЛТ – тромболітична терапія

ELISA – enzyme linked immunosorbent assay

APC – activated protein C

ТАП – тканинний активатор плазміногену

TAFI – thrombin activated fibrinolysis inhibitor

vWF – von Willebrand factor

ВСТУП

Актуальність теми. Цереброваскулярні патології з огляду на невтішну динаміку розповсюдження, значну смертність та високий відсоток втрати працездатності пацієнтів, без перебільшення можна віднести до вагомих медико-соціальних та економічних проблем сьогодення [1, 2]. Попередження та подолання негативних наслідків таких захворювань потребує активного залучення новітніх знань та розробок в галузі медицини і біології з метою вдосконалення існуючих на сьогодні лабораторно-діагностичних критеріїв оцінки як гострого, так і хронічного порушення мозкового кровопостачання та впровадження у клінічну практику відповідних профілактичних заходів чи терапевтичних стратегій.

У загальній структурі цереброваскулярних захворювань переважають інсульти, зокрема за ішемічним типом, на долю яких припадає до 80% всіх зареєстрованих клінічних випадків. До загальновизнаних незалежних факторів ризику виникнення інсульту відносять цукровий діабет 2 типу та метаболічний синдром, за розвитку яких виникають вагомі передумови для розвитку ускладнень на рівні функціонування серцево-судинної, нервової, ендокринної, імунної систем [3, 4]. За даними низки досліджень, при наявності в анамнезі пацієнтів цукрового діабету ризик виникнення ішемічного інсульту зростає у 3-7 разів. Разом з тим, кожний 3-5 пацієнт з гострим порушенням мозкового постачання хворіє на цукровий діабет, часто діагностований лише після надходження до стаціонару. Дана проблема набуває особливої актуальності у світлі стрімкого та неспинного зростання поширеності цукрового діабету серед різних верств населення, зокрема серед дітей та осіб молодого віку.

Асоційовані з патогенезом цукрового діабету явища гіперглікемії, інсулінорезистентності, дисліпідемії та супутньої гіперінсулінемії призводять до цілої низки негативних наслідків, зокрема обумовлюють дисфункціонування на рівні всіх ланок системи гемостазу та визначають протромбогенний характер змін у даній системі, що є однією з ключових патогенетичних основ первинної

маніфестації ішемічного інсульту. За умов тривалої декомпенсації цукрового діабету спостерігається посилення вираженості клінічних проявів інсульту, значно підвищується ризик летальних випадків та зростає вірогідність повторних рецидивів у найближчі 10 років.

Не викликає сумніву, що порушення у функціонуванні судинно-тромбоцитарної, коагуляційної ланок гемостазу та активності фібринолітичної системи не лише відіграють провідну роль у патогенезі ішемічного інсульту [5], а й визначають ймовірність виникнення повторних загострень у майбутньому. Незважаючи на значні досягнення у науковому пізнанні молекулярно-біохімічних основ розвитку та прогресування інсульту, у сучасній науковій літературі зустрічаються суперечливі дані щодо вмісту і функціональної активності окремих компонентів системи гемостазу у пацієнтів, що страждають на цукровий діабет 2 типу як у гостру фазу хвороби, так і у більш віддалені терміни. Крім того, ряд аспектів даної проблеми залишаються до кінця не з'ясованими, зокрема відсутня вичерпна інформація щодо біохімічних проявів захворювання, обумовлених розвитком низки неспецифічних реакцій у відповідь на інтенсифікацію патологічного процесу.

Тому деталізація молекулярних механізмів та з'ясування метаболічних шляхів, що лежать в основі виникнення та прогресування інсульту на фоні цукрового діабету 2 типу, а також пошук ефективних біохімічних маркерів, що передують клінічним проявам захворювання чи асоційовані з його певними стадіями, дозволить удосконалити існуючі на сьогодні алгоритми діагностики та індивідуалізувати терапевтичні підходи під час вибору стратегії лікування пацієнтів, що є запорукою зменшення кількості рецидивів та подолання негативних наслідків даної патології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідних тем «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011-2015 рр.) та

«Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.)

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було дослідити особливості розвитку ішемічного інсульту у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Проаналізувати загальні клініко-біохімічні показники у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом та за наявності цукрового діабету 2 типу.
2. Дослідити ключові показники функціонування коагуляційної ланки системи гемостазу (вміст розчинних фібрин мономерних комплексів, концентрацію фібриногену, рівень протробінового пулу, відносну активність фактору X та протеїну C) у пацієнтів з ішемічним інсультом та за наявності цукрового діабету 2 типу.
3. З'ясувати стан судинно-тромбоцитарної ланки системи гемостазу (швидкість та максимальну амплітуду агрегації тромбоцитів, їх кількість, рівень фактору фон Вілебранда) у пацієнтів з ішемічним інсультом та за наявності цукрового діабету 2 типу.
4. Оцінити загальний стан системи фібринолізу (час лізису еуглобулінової фракції, час Хагеман-залежного фібринолізу, відносну активність плазміногену, α 2-антиплазміну, вміст тканинного активатора плазміногену та інгібітору активатора плазміногену типу 1) у пацієнтів з ішемічним інсультом та за наявності цукрового діабету 2 типу.
5. Проаналізувати потенційні фактори (ендогенна інтоксикація, запальний процес, периферійна серотонінергічна система, дисфункція протеолізу), що можуть обумовлювати більш виражену маніфестацію ішемічного інсульту у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу.

Об'єкт дослідження: біохімічні аспекти патогенезу ішемічного інсульту у пацієнтів з цукровим діабетом та за наявності цукрового діабету 2 типу.

Предмет дослідження: показники коагуляційної, судинно-тромбоцитарної ланок системи гемостазу, фібринолітичної системи, маркери ендогенної інтоксикації та запального процесу.

Методи дослідження: у роботі було використано спектрофотометричні (визначення загальних клініко-біохімічних показників), імуноферментні (визначення вмісту білків системи гемостазу), електрофоретичні (ідентифікація матриксних металопротеїназ та продуктів активації плазміногену), хроматографічні (визначення вмісту триптофану та серотоніну), оптичні (дослідження процесу агрегації тромбоцитів та проведення коагулометричних досліджень) методи та математична статистика.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено комплексне дослідження стану системи гемостазу у хворих з ішемічним інсультом за наявності в анамнезі цукрового діабету 2 типу, що дозволяє доповнити існуючі на сьогодні уявлення щодо біохімічних основ розвитку та прогресування даної патології. Підтверджено протромбогенний характер змін у системі гемостазу, обумовлений асинхронізацією у функціонуванні всіх компонентів даної системи. Виявлено зростання рівня ключових показників коагуляційної ланки системи гемостазу, що свідчить про розвиток гіперкоагуляційного стану у пацієнтів з ішемічним інсультом за наявності цукрового діабету, а саме, підвищення вмісту розчинних фібрин-мономерних комплексів, фібриногену, продуктів активації протромбіну та зниження активності фактору Ха і протеїну С. Показано, що ішемічний інсульт супроводжується змінами показників АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів, більш вираженими за умов інсульту на фоні цукрового діабету. Проведено порівняльний аналіз параметрів, що характеризують стан системи фібринолізу, за результатами якого виявлено зниження фібринолітичного потенціалу у хворих на ішемічний інсульт як окремо, так і за наявності в анамнезі цукрового діабету 2 типу. Вперше встановлено, що гострий період ішемічного інсульту характеризується розвитком стану ендогенної інтоксикації, підтвердженого накопиченням у сироватці крові молекул середньої маси, олігопептидів та зниженням концентрації загального білка і

альбуміну. Протягом проведених досліджень вперше отримано дані, що можуть свідчити про залученість протеолітично активних похідних плазміногену та матриксних металопротеїназ у реалізацію ранньої стадії ішемічного інсульту. Вперше досліджено та виявлено порушення у функціонуванні периферійної серотонінергічної системи, зокрема зростання концентрації серотоніну та триптофану у хворих з ішемічним інсультом за наявності цукрового діабету 2 типу, що виявляється у зростанні концентрації сироваткового серотоніну та триптофану.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані у роботі дані сприяють розширенню сучасних уявлень та положень щодо основних молекулярно-біохімічних механізмів патогенезу ішемічного інсульту як окремо, так і за наявності в анамнезі супутніх патологій, зокрема, цукрового діабету 2 типу. Результати роботи можуть слугувати теоретичним підґрунтям під час розробки новітніх фармакологічних засобів профілактично-лікувальної дії, спрямованих на попередження виникнення та прогресування ускладнень інсульту, асоційованих з такими метаболічними проявами захворювання як синдром ендогенної інтоксикації, запалення, активація протеолізу. Окрім фундаментального значення, робота має вагомий практичний аспект, оскільки одержанні під час дослідження експериментальні дані щодо вмісту та активності окремих компонентів системи гемостазу обґрунтовують доцільність розширення спектру показників, які використовуються у рутинній клінічній практиці для оцінки стану пацієнтів з ішемічним інсультом. Проведені комплексні дослідження загального стану хворих, функціональної активності коагуляційної, судинно-тромбоцитарної ланок та фібринолітичної системи дають підстави для розробки персоналізованих алгоритмів діагностики стадії захворювання та його тяжкості з урахуванням наявності в анамнезі цукрового діабету. Окремі матеріали роботи можуть бути використані в учбовому процесі під час розробки відповідних спецкурсів та проведення практичних занять для студентів біологічних та медичних спеціальностей.

Особистий внесок здобувача. Пошук та аналіз літературних джерел за темою дисертаційної роботи, проведення експериментальних досліджень, підготовка

матеріалів до друку виконана дисертантом особисто. За участі співавторів публікацій здійснено інтерпретацію отриманих результатів. Визначення напрямку досліджень, планування експериментальних робіт, аналіз та узагальнення отриманих результатів, формулювання висновків проведено за безпосередньої участі наукового керівника д.б.н. Савчука О.М.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації були представлені на вітчизняних та міжнародних конференціях: 40th FEBS Congress (Berlin, Germany, 2015); Asia Pacific Stroke Conference (Brisbane, Australia, 2016); X Parnas Conference (Wrocław, Poland, 2016); XIV Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна» (Київ, 2016); XII Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2016); 61st Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Hemostasis Research (Basel, Switzerland, 2017).

Публікації. За результатами дослідження опубліковано 20 наукових праць, у тому числі 7 статей у фахових виданнях, затверджених переліком МОН України та у міжнародних періодичних виданнях (1 публікація у виданні, включеному до міжнародної наукометричної бази Scopus, 1 публікація у виданні, включеному до міжнародної наукометричної бази Web of Science); 13 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, розділу з описом матеріалів і методів дослідження, розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків та списку використаних літературних джерел, який містить 313 найменування. Дисертація викладена на 197 сторінках, з яких основна частина складає 149 сторінок, містить 7 таблиць та 14 рисунків.

РОЗДІЛ 1

Огляд літератури

1.1. Загальна характеристика системи гемостазу

Гемостаз – комплекс реакцій та факторів, що забезпечують зупинку чи попередження кровотечі при пошкодженні судинної стінки, сприяють підтриманню крові у рідкому стані, а також запобігають порушенню цілісності судин [6,7]. Тому можна виділити наступні функції системи гемостазу: 1) реологічна – підтримання крові у рідкому стані; 2) антикоагуляційна або антитромботична – попередження тромбоутворення та блокада мікроциркуляції; 3) гемостатична – попередження кровоточивості; 4) захисна – обмеження ділянки запалення, блокада дисемінації мікрофлори; 5) репараційна – продукування фібринектину під час регенерації тканин. Варто відмітити, що останнім часом більшість дослідників схиляються до виділення ще одної функції, а саме репродуктивної – участь реакцій фібринолізу і пристінкового згортання у реакціях імплантації яйцеклітини та адгезії цитотрофобласта у процесах запліднення [8,9,10]. Функціонування системи гемостазу визначається взаємодією різних морфологічних структур та біохімічних процесів. У системі гемостазу досить умовно виділяють дві ланки: судинно-тромбоцитарну та плазменну.

У судинно-тромбоцитарному гемостазі провідна роль у зупинці кровотеч належить судинній стінці та тромбоцитам [11,12]. Також важливим є внесок лейкоцитів, еритроцитів, фібробластів. Тому дану ланку іноді ще називають клітинно-ендотеліальним гемостазом, підкреслюючи, таким чином, вагому роль клітинних елементів у своєчасній зупинці кровотеч.

Плазменний гемостаз - це каскад реакцій, в якому задіяні фактори зсідання крові і який завершується процесом фібриноутворення. Дана ланка гемостазу представлена прокоагулянтними факторами внутрішнього та зовнішнього шляхів зсідання крові та компонентами фібринолітичної системи [13].

Відкладення фібрину видаляються шляхом протеолітичної деградації за участі фібринолітичної або плазмінової системи. Саме фібринолітична система є основною ферментативною системою організму, що відповідає за лізис фібринових згустків в кровоносних судинах та руйнування депозитів фібрину поза кровотоком.

В організмі за фізіологічних умов рідкий стан крові, а в разі необхідності зупинка кровотечі, забезпечуються динамічною рівновагою між системами зсідання крові та фібринолітичною, порушення якої ведуть до тромбоутворення або геморагій різного ступеня важкості.

У залежності від місця виникнення пошкодження судинної стінки та участі окремих факторів розрізняють два основні механізми гемостазу – судинно-тромбоцитарний (мікроциркуляторний, первинний) та коагуляційний (макроциркуляторний, вторинний).

Повноцінна гемостатична функція можлива лише за умови тісної взаємодії обох механізмів. Тромбоцитарні фактори беруть активну участь у коагуляційному гемостазі, забезпечуючи кінцевий етап формування повноцінної гемостатичної пробки – рефракцію кров'яного згустку. Разом з тим, плезменні фактори безпосередньо впливають на агрегацію тромбоцитів. При пошкодженнях як дрібних, так і великих судин відбувається утворення тромбоцитарної пробки з подальшим згортанням крові, організацією фібринового згустка, а потім відновлення просвіту судин (реканалізації шляхом фібринолізу).

Судинно-тромбоцитарний гемостаз забезпечує зупинку кровотеч у венозних та артеріальних судинах діаметром до 100-200 мкм (судини мікроциркуляторного русла), де є низький тиск. Порушення даного механізму клінічно визначає до 80% кровотеч та до 95% тромбоутворення. Зупинка кровотечі при цьому може відбуватися у результаті трьох стадій: 1) тимчасовий (первинний та вторинний) спазм судин; 2) утворення, власне, тромбоцитарної пробки за рахунок адгезії (розпластання і прилипання тромбоцитів до пошкодженої стінки судини) з подальшим вивільненням вмісту гранул тромбоцитів і агрегацією клітин (взаємодія

тромбоцит-тромбоцит); 3) ретракція (скорочення і ущільнення) тромбоцитарної пробки [14,15].

Структурна організація ендотелію забезпечує підтримку цілісності судинної стінки і вибірккову проникність для різних субстанцій. Ендотеліальні клітини судин здатні синтезувати та експресувати на своїй поверхні різні біологічно активні речовини (оксид азоту, ендотеліні, простацикліни, тромбомодулін, фактор фон Вілебранда, фібронектин та ін.), що модулюють тромбоутворення та фібриноліз. Це дає можливість ендотелію брати участь у регуляції коагуляційного потенціалу крові. За умов фізіологічної норми ендотелій функціонує як потужний антикоагулянт, тому не відбувається ні активації білків системи зсідання крові, ні адгезії до його поверхні клітинних елементів. Проте при дисфункції чи ушкодженні судинної стінки ендотелій набуває прокоагулянтних властивостей [16].

Відразу після травми відбувається первинний спазм кровоносних судин, обумовлений викидом у кровоток, у відповідь на больове подразнення, адреналіну, норадреналіну та інших вазоконстрикторів. Первинний спазм триває близько 10-15 с і обумовлює часткову зупинку кровотечі. Проте при серйозніших ушкодженнях настає вторинний спазм, спричинений активацією тромбоцитів і вивільненням низки судинозвужуючих агентів – серотоніну, тромбоксану А₂, адреналіну. Пошкодження судин викликає швидку активацію тромбоцитів внаслідок надходження із зруйнованих еритроцитів і травмованих судин індуктора агрегації АДФ та оголення субендотелію, колагенових і фібрилярних структур. Наступним етапом є адгезія тромбоцитів до колагену та інших білків субендотелію. Процес адгезії здійснюється завдяки наявності у мембрані тромбоцитів специфічних рецепторів, які швидко зв'язуються з відповідними лігандами в екстрацелюлярному матриксі. Прилипання тромбоцитів до ушкодженої поверхні вважається початковою стадією формування гемостатичного тромбоцитарного тромбу. Після цього слідує наступна стадія тромбоутворення – агрегація тромбоцитів [17]. При цьому тромбоцити змінюють форму із дисковидної на сферичну, на поверхні мембрани з'являються псевдоподії.

Одночасно відбувається вивільнення з їх гранул агоністів агрегації (АДФ, серотоніну, тромбоцитарного фактору росту, адреналіну, тромбіну та ін.).

Також підвищується активність фосфоліпази А₂, яка, розщеплюючи мембранні фосфоліпіди, приводить до вивільнення арахідонової кислоти.

Агрегація тромбоцитів у місці локального ушкодження судини створює негативний заряд, що приводить до запуску механізму генерування тромбіну і утворення фібринової сітки [18,19]. Фібринові волокна і наступна ретракція кров'яного згустку ущільнюють гемостатичний тромбоцитарний тромб, що веде до кінцевої зупинки кровотечі.

При ушкодження крупних кровоносних судин також утворюється тромбоцитарна пробка, але вона не здатна зупинити кровотечу, оскільки легко вимивається током крові. Тому при зупинці кровотеч у великих артеріях та венах (більше 200 мкм у діаметрі) основна роль відводиться коагуляційному механізму гемостазу. Коагуляційний гемостаз, хоча і називається вторинним, здійснюється не строго послідовно за судинно-тромбоцитарним (первинним) гемостазом, а функціонує при взаємодії з первинною (тромбоцитарною) ланкою. З біохімічної точки зору механізм зсідання крові та утворення згустку є багатоетапним ферментативним процесом, що здійснюється групою специфічних білків – факторів системи зсідання. У цьому процесі також беруть участь неферментні білкові компоненти, іони кальцію, фосфоліпіди. В ланцюгу послідовних перетворень кожний активований фактор в свою чергу активує, шляхом обмеженого протеолізу, наступний по принципу профермент → фермент. Кожна наступна стадія проходить з більшою швидкістю і первинний сигнал значно посилюється за рахунок підвищення на кожному етапі зсідання крові вмісту факторів, що приймають участь у цьому процесі. Реалізація коагуляційного механізму згортання крові відбувається у декілька етапів [20,21,22].

Перший етап – утворення протромбіназного комплексу. Весь каскад системи зсідання крові, направлений на перетворення фактору Х в активований фактор Ха і

на формування протромбіназного комплексу, який перетворює протромбін в тромбін.

Другий етап – тромбіноутворення. Протромбіназний комплекс (фактори коагуляції Va, Ха та іони кальцію) на фосфоліпідній мембрані переводить неактивний фактор II (протромбін) в активний фактор IIa – тромбін. Активація протромбіну є важливою ланкою каскаду реакцій системи зсідання крові, що ведуть до утворення мультифункціонального ферменту – тромбіну, який відіграє важливу роль в системі гемостазу.

Третій етап – фібриноутворення. На цьому етапі тромбін, що утворився, відщеплює від молекули фібриногену фібринопептиди, переводить його у фібрин-мономер, що супроводжується експонуванням центрів полімеризації. Молекули останнього утворюють протофібрили, які латерально асоціюють у фібрили. Крім того, тромбін активує фактор XIII у фактор XIIIa. Останній у присутності іонів кальцію змінює фібрин-полімер з лабільної, легко розчинної плазміном форми, у ковалентно зв'язану форму, що складає основу кров'яного згустку [23].

У залежності від шляху ініціації процесу згортання крові розрізняють зовнішній та внутрішній, які різняться за механізмом утворення протромбінази [24]. Такий поділ є певною мірою умовним, оскільки *in vivo* ці механізми тісно переплітаються, але даний підхід значно полегшує інтерпретацію лабораторних тестів *in vitro* [25,26].

Більшість факторів системи зсідання циркулюють у кровотоці в неактивній формі. Поява стимулу коагуляції – тригера – призводить до запуску каскаду реакцій, наслідком чого є перетворення фібриногену у фібрин з подальшим утворенням фібринового згустку, який підвищує щільність первинного тромбу та сприяє його закріпленню на судинній стінці у місці пошкодження. Тригер може бути ендогенним (в середині судин) чи екзогенним (надходить із тканин). Внутрішній шлях активації згортання крові визначається як коагуляція, що ініціюється та реалізується виключно за участі факторів, що містяться у кровотоці. Даний механізм відбувається досить повільно (1-10 хв), його компонентами є фактори системи

зсідання крові - XII, XI, IX, VIII, X; кофактори – високомолекулярний кініноген та прекалікреїн, їх інгібітори та тромбоцити. Внутрішній шлях запускається при пошкодженні ендотелію, коли оголяється негативно заряджена поверхня, наприклад, колаген, при взаємодії з якою активується фактор XII [27,28]. Кінцевим результатом каскаду реакцій внутрішнього шляху є утворення активного фактор Ха, який у комплексі з кофакторами діє як протромбіназа, каналізуючи перетворення протромбін у тромбін.

Якщо процес згортання ініціюється у відповідь на дію факторів, що виділяються у кровотік при пошкодженні судин чи сполучної тканини, говорять про зовнішній шлях системи зсідання [29,30]. Даний механізм забезпечує дуже швидке зсідання крові. У зовнішньому шляху формування протромбінази ключову роль відіграє тканинний фактор, який експресується на клітинних поверхнях при ушкодженні тканини, утворює з фактором VIIa та іонами кальцію комплекс, що здатний перевести фактор X у активну форму [31,32]. Як бачимо, внутрішній та зовнішній шляхи поєднуються на етапі активації фактору X, саме з моменту його утворення починається загальний шлях коагуляції.

Незважаючи на те, що кровотоці присутні всі фактори, необхідні для утворення тромбу, за фізіологічних умов при відсутності пошкоджень судинної стінки кров знаходиться у рідкому стані. Це обумовлено дією низки речовин, які одержали назву природні антикоагулянти. Також вагома роль при цьому відводиться фібринолітичній ланці системи гемостазу. У цілому природні антикоагулянти поділяються на первинні та вторинні.

Первинні антикоагулянти завжди присутні у кров'яному руслі. Серед первинних антикоагулянтів можна виокремити три групи: 1) речовини, що виявляють антитромбопластичну та антипротромбіназну дію – група антитромбопластинів; 2) речовини, що зв'язують тромбін – група антитромбінів; 3) речовини, що попереджують трансформацію фібриногену у фібрин – група інгібіторів самозбирання фібрину.

До антитромбопластинів належить інгібітор зовнішнього шляху згортання TFPI, який інгібує початковий етап згортання крові – фазу ініціації. Встановлено, що він здатен блокувати комплекс факторів TF+VIIa+ Xa, завдяки чому попереджається утворення протромбінази по зовнішньому шляху. У кровотоці присутня як вільна активна форма інгібітору, так і його неактивна форма, зв'язана з ліпопротеїдами.

До інгібіторів, що блокують утворення протромбінази, належать вітамін К-залежні білки C, S та білок, що синтезується ендотелієм – тромбомодулін. Під дією тромбомодуліну та зв'язаного з ним тромбіну протеїн C переходить у активну форму. Саме протеїн C є одним з ключових ферментів фізіологічного механізму антикоагуляції. Активований протеїн C – серинова протеїназа, що має антитромботичні і протизапальні властивості. Він інактивує фактори VIIa і Va шляхом обмеженого протеолізу, інгібуючи у такий спосіб генерацію двох ключових ферментів зсідання крові – факторів Xa і тромбіну. Ці реакції підсилюються за присутності іонів кальцію, фосфоліпідів і протеїну S [33,34]. Активований протеїн C не тільки інгібує зсідання крові, але також впливає на фібриноліз, зв'язуючи інгібітор активатора плазміногену (ПАІ-1) і тим самим стимулює фібриноліз.

Одним з провідних антикоагулянтів є антитромбін III, який забезпечує до 75% антитромбінового потенціалу плазми. Він блокує тромбін та інші серинові протеїнази плазми крові, зокрема, фактори згортання IXa, Xa, XIa та плазмін, пригнічуючи не лише дію тромбіну, але й попереджуючи його утворення [35,36]. Реакція інгібування ферментів антитромбіном III значною мірою залежить від присутності аніонних глюкозаміногліканів, таких як гепарин і гепаринсульфат. Тому антитромбін III вважають кофактором гепарину. Додавання гепарину підвищує інгібуючу активність антитромбіну в 5000 разів та прискорює його взаємодію з тромбіном [37].

Ще одним відомим первинним антикоагулянтом є гепарин, який здатен інгібувати активність багатьох плазменних факторів, пригнічувати всі фази процесу згортання крові та активувати неферментативний фібриноліз. За фізіологічних умов

гепарин у кровотоці практично відсутній, але з'являється при патологічних станах, що супроводжуються де грануляцією базофілів та тучних клітин [38].

До вторинних антикоагулянтів відносять так звані «відпрацьовані» фактори згортання крові, що зазнали протеолітичного розщеплення. Також у дану групу входять продукти деградації фібриногену та фібрину, які виявляють антиагрегаційну, протизгортаючу дію, а також здатні стимулювати фібриноліз. Роль вторинних антикоагулянтів зводиться до обмеження внутрішньо судинного згортання крові та розповсюдження тромбу по судинах.

Кінцевим етапом після пошкодження кровоносної судини і утворення тромбу є активації фібринолітичної системи (фібриноліз), яка забезпечує розчинення фібринової пробки та відновлення судинної стінки. Тобто, фібриноліз – це основний ендогенний механізм підтримання крові у рідкому стані та попередження внутрішньосудинного тромбоутворення.

Фібриноліз здійснюється завдяки поєднанню фібринолітичної активності плазми крові та клітинного фібринолізу [39,40]. Окрім того, фібринолітична система відіграє важливу роль у багатьох фізіологічних процесах, таких як міграція клітин, ремоделювання тканин, видалення позаклітинних відкладень фібрину, що знаходяться поза кровообігом (у ниркових каналцях, матці, слізному каналі, жовчних протоках, каналцях грудних залоз і ін.). Протеїнази фібринолітичної системи задіяні в інвазії пухлин і метастазуванні, атеросклерозі, імунологічних та запальних процесах, алергійних реакціях.

Однак основна функція фібринолітичної системи полягає в підтримці крові в рідкому стані і розчиненні згустків фібрину, які утворюються в кровотоці. Фізіологічний фібриноліз є високоспецифічним процесом розщеплення фібринового згустку, який не супроводжується системною активацією фібринолітичної системи, що пов'язано з специфічною спорідненістю між плазміногеном, активатором плазміногену, плазміном, фібрином, та α_2 -антиплазміном.

Фібринолітична система складається з плазміногену (профермент), плазміну (фермент), активаторів плазміногену і відповідних інгібіторів. Плазміноген

циркулює в крові в мономерній формі або в комплексі з α_2 -антиплазміном, гістидин-багатим глікопротеїном, фібриногеном. Основний синтез плазміногену відбувається в печінці, в меншому ступені в нирках, еозинофілах, у клітинах мікроанглії мозку, у насінниках. Активація плазміногену може протікати шляхом зовнішньої та внутрішньої активації. Внутрішній шлях активації плазміногену реалізується за участю активованих білків контактної фази: факторів XII, XI, прекалікреїну, високомолекулярного кініногену і калікреїну. Проте основним шляхом активації плазміногену є зовнішній або тканинний. У його здійсненні бере участь тканинний активатор плазміногену (ТАП), який секретується ендотеліальними клітинами, моноцитами, мегакаріоцитами і мезотеліальними клітинами. Ще одним фізіологічним активатором плазміногену є активатор урокіназного типу, що бере участь в індукції асоційованого з клітинною поверхнею протеолізу шляхом активації плазміногену, у міжклітинному просторі та біологічних рідинах, що забезпечує проліферацію, ріст, міграцію та інші функції клітин [41,42].

До нефізіологічних активаторів плазміногену відносять стрептокіназу (продукується гемолітичним стрептококом), антистреплазу (комплекс людського плазміногену та бактеріальної стрептокінази) та стафілокіназу (продукується *Staphylococcus aureus*). Перші два активатора належать до фармакологічних тромболітичних засобів, що використовуються для лікування гострих тромбозів.

Наслідком активації плазміногену є утворення плазміну - потужного протеолітичного ферменту. На N-кінці проферменту знаходиться залишок глютамінової кислоти, на C-кінці – аспарагін, внаслідок чого нативна молекула має назву Глу-плазміноген. Плазмін з високою швидкістю розщеплює в Глу-плазміногені пептидні зв'язки між Ліз77-Ліз78, Арг68-Мет69 або Ліз78-Вал79, внаслідок чого від молекули відокремлюється N-кінцевий пептид з молекулярною масою близько 9 кДа і утворюється частково деградована форма проферменту, яка має назву Ліз-плазміноген. У молекулі плазміногену виділяють п'ять гомологічних кринглових структур і домен серинової протеїнази. Кринглові домени відіграють важливу функціональну роль. Вони регулюють його конформаційний стан та

забезпечують взаємодію з субстратом – фібрином, інгібітором – α_2 -антиплазміном, іншими білками плазми, а також з мембранними білками клітин ендотелію, тромбоцитів та ін. [43,44]. Активація плазміногену до плазміну є одним з ключових етапів фібринолітичного процесу. Основний спосіб активації плазміногену фізіологічними активаторами – тканинним активатором плазміногену, урокіназою та фактором XIIIa - полягає у ферментативному розщепленні єдиного пептидного зв'язку – Arg561-Val56. В результаті формується активний центр і утворюється фермент плазмін, що складається з двох ланцюгів: N-кінцевого важкого (A) з молекулярною масою 56 кДа і C-кінцевого легкого (B) з молекулярною масою 26 кДа, що з'єднані між собою двома дисульфідними зв'язками.

Складна багатокomпонентна система фібринолізу контролюється не лише активаторами, а й різними інгібіторами плазми крові чи тканин, що діють на молекулу активного плазміну (α_2 -антиплазмін, α_2 -макроглобулін, α_1 -антитрипсин, антитромбін III, інгібітор естерази C1) чи на активатори плазміногену (інгібітори активаторів плазміногену типу 1, 2, 3 та інгібітор, збагачений на гістидин). Плазмін у кровотоці зазнає швидкої інактивації природними інгібіторами, у той час як плазмін у фібриновому згустку захищений від дії інгібіторів.

Поряд з плазменним фібринолізом вирізняють клітинний фібриноліз, який забезпечується лейкоцитами, макрофагами, ендотеліальними клітинами, тромбоцитами. Він підтримує специфічну активність як місцевого, так і системного фібринолізу. Лейкоцити залучаються в зону утворення фібрину за допомогою хемоатрактантів, що виділяються тромбоцитами, а також за допомогою калікреїну, продуктів деградації фібрину. Лейкоцити і макрофаги здатні фагоцитувати фібрин і клітинні залишки, що утворилися в місці ушкодження.

1.2. Особливості функціонування системи гемостазу за ішемічного інсульту

Висока розповсюдженість, значна смертність та високий відсоток інвалідизації пацієнтів визначають цереброваскулярні захворювання як серйозну медичну та соціальну проблему. На сьогодні у світі близько 10 млн людей страждають на цереброваскулярні патології, основне місце у структурі яких займають інсульти [45,46,47]. Щороку у світі реєструється до 6 млн, а за іншими даними навіть до 9 млн інсультів. В Україні інсульти належать до провідних причин смертності та стійкої втрати працездатності. Так, повністю залежними від оточуючих стає близько 20-35% пацієнтів, біля 60% стають інвалідами, що здатні самі себе обслуговувати. До відносно нормальної трудової діяльності повертається лише близько 15-20% хворих. Серед всіх типів інсультів домінуючими є ішемічні ураження мозку на долю яких припадає до 85% [48].

Патогенез церебральної ішемії включає низку взаємозв'язаних структурно-функціональних порушень, які на сьогодні є досить добре дослідженими. Основні з них, це зниження енергопродукції, пригнічення аеробного та активізація анаеробного шляху розпаду глюкози та синтезу АТФ, що лише частково компенсує енергетичні потреби мозку, проте призводить до утворення та накопичення молочної кислоти і розвитку лактат-ацидозу[49]. Також варто виділити порушення іонного гомеостазу клітини та зниження мембранного потенціалу з подальшим викидом в позаклітинний простір низки нейромедіаторів - глутамату, аспартату. Зростання концентрації внутрішньоклітинного кальцію обумовлює запуск каскаду реакцій, що призводять до ініціації процесів загибелі клітин головного мозку за типом апотозу чи некрозу [50]. Зазначені зміни викликають розвиток набряку головного мозку, вираженість якого безпосередньо залежить від розміру ділянки ураження мозку [51].

Серед чисельних чинників, які безпосередньо викликають ішемічне порушення мозкового кровообігу, провідне місце належить тромбоемболічним і гемодинамічним факторам. Ішемічний інсульт може виникати як результат повної закупорки просвіту судини тромбом або емболом і, відповідно, перекриття кровотоку, або розвиватися за механізмом судинної мозкової недостатності, яка виникає у басейні стенозованої судини і посилюється при порушенні системної гемодинаміки. Реалізація патогенетичних передумов у ішемію з розвитком інфаркту мозку виникає внаслідок порушення регіонарних і системних механізмів компенсації мозкового кровообігу [52,53].

Відомо, що процес тромбоутворення залежить від гемодинамічних характеристик, стану судинно-тромбоцитарного і плазменного гемостазу, стадії розвитку атеросклеротичних бляшок [24,54]. У цілому можна виділити три фактори [55], що сприяють розвитку тромбозів: 1) порушення току крові; 2) пошкодження судинної стінки; 3) порушення реологічних властивостей крові. Компоненти тріади є лише відносно самостійними і їх значущість у патогенезі венозних і артеріальних тромбозів неоднакова: провідні причини розвитку венозних тромбозів - стаз і дефіцит компонентів системи протизгортання, артеріальних - порушення структури судинної стінки і активація тромбоцитів. Компоненти тріади є лише відносно самостійними і їх значущість у патогенезі венозних і артеріальних тромбозів неоднакова: до провідних причин розвитку венозних тромбозів належать стаз і дефіцит компонентів системи протизгортання, артеріальних - порушення структури судинної стінки та активація тромбоцитів. Артеріальні тромби складаються переважно з тромбоцитів з незначним вмістом фібрину і еритроцитів, тому їх називають «білими» тромбами на відміну від «червоних» венозних тромбів, що складаються переважно з еритроцитів і фібринових ниток. Відмінність між венозними і артеріальними тромбів не є абсолютною. Тромби, які виявляються у церебральних і коронарних артеріях за інфарктних станів за складом належать переважно до «білих».

Наслідком порушень гемостазу у системі кровообігу головного мозку є стенози, тромбози, емболії, аневризми мозкових артерій. Порушення взаємозв'язків між різними компонентами, що впливають на стан мікроциркуляторного гемостазу може лежати в основі патогенетичних ознак судинних захворювань головного мозку [56]. Емоційне напруження і стресові стани є ключовим факторами, що запускають каскад реакцій, які призводять до порушення стану мікроциркуляторного гемостазу у головному мозку і розвитку ішемії, інфаркту мозку та інсульту [57,58].

Особливості судинного пошкодження мозку визначаються характером порушення мозкового кровообігу, механізмами та темпами його розвитку, локалізацією осередку ураження, структурними змінами магістральних артерій голови, станом колатерального кровообігу, загальною та церебральною гемодинамікою. Патогенетичні механізми порушення мозкового кровообігу безпосередньо пов'язані з підвищенням коагуляційного потенціалу та порушенням реологічних властивостей крові [59]. Саме патологічні відхилення у роботі окремих ланок системи гемостазу належать до значимих факторів, що сприяють розвитку та прогресуванню церебральної ішемії. За дисбалансу у функціонування окремих ланок системи гемостазу значно зростає ризик розвитку венозних тромбоембілчних ускладнень та синдрому диссемінованого внутрішньо судинного згортання крові (ДВЗ-синдром), особливо при тяжких формах гострого порушення мозкового кровопостачання та порушеннях мікроциркуляції як на мікро-, так і на макроциркуляторному рівні [60].

Низкою клінічних та експериментальних досліджень доведено, що у хворих з інсультом провідну роль у розвитку венозного тромбозу відіграють гіперкоагуляція та сповільнення венозного кровотоку, що є закономірним наслідком цілого комплексу причин. Так, тривала іммобілізація у хворих з плегіями та парезами належить до провідних факторів ризику тромбозу глибоких вен нижніх кінцівок внаслідок недостатності кровообігу, підвищення венозного тиску, вазодилатації, сповільнення току і порушення реологічних властивостей крові.

Диспротеїнемія, значне зростання концентрації фібриногену призводять до ще більшого уповільнення кровотоку, що у свою чергу сприяє тромбоутворенню.

У першу добу гострої церебральної ішемії спостерігається гіперкоагуляції на тлі нормальної або пригніченої активності фібрінолітичної системи. У подальшому має виражене наростання гіперкоагуляції, або навпаки, зниження концентрації факторів згортання за типом споживання і активності протизгортаючої ланки системи регуляції агрегатного стану крові (РАСК). Активація системи РАСК може свідчити про розвиток синдрому ДВЗ у таких хворих. Є дані щодо пригнічення системи фізіологічних антикоагулянтів у гострій період мозкового інсульту [61].

Ішемічні інсульти часто супроводжуються підвищенням концентрації фібриногену [62]. Так, наростання концентрації фібриногену спостерігається вже через кілька годин після появи вогнищевих неврологічних симптомів і виявляється у більшості хворих з ішемічним інсультом [63]. Відповідно до літератури, фібриноген безпосередньо залучений в атерогенез, він активізує проліферацію та міграцію гладенько м'язових клітин, виявляється в атеросклеротичних бляшках. Окрім того, фібриноген є потужним незалежним фактором ризику серцево-судинних захворювань, його патогенічний ефект зростає за умов гіперхолестеринемії та підвищення систолічного артеріального тиску. Гіперфібриногенемія, підвищення в'язкості крові, зростання агрегаційної активності формених елементів крові, зниження антиагрегаційного потенціалу судинної стінки відіграють ключову роль у формуванні осередкового ураження мозку, особливо за ішемічного інсульту, що розвивається по типу гемореологічної мікрооклюзії.

Існує чіткий зв'язок між сповільненням системного кровотоку та активацією залежних від ендотелію факторів гемостазу, виявлено підвищення рівню молекул адгезії – VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), E-селектину.

При ішемічному інсульті можна виділити декілька шляхів активації системи гемостазу і включення будь якого з них може привести до прогресуючого нарощування коагуляційного потенціалу крові, стійкої гіперкоагуляції, за якою неминуче настає зрив протизгортаючих механізмів, обумовлений розбалансуванням

системи гемостазу у цілому [64]. Варто відмітити, що зрив адаптаційних можливостей системи гемостазу може характеризуватися нормокоагуляцією внаслідок поєднання, з одного боку, підвищеного коагуляційного потенціалу (коротка активація факторів VIII, V, наявність активного фактора X і тромбіну), а з іншого - розпочинається активне споживання плазмових факторів згортання (протромбіну, фібриногену) і тромбоцитів. Зазначені процеси дуже швидкоплинні і при звичайному перебігу швидко переходять у стадію вираженої гіпокоагуляції і коагулопатії споживання.

У більшості випадків відмічається активація як первинної ланки, так і коагуляційного гемостазу, зазначені зміни протікають на тлі зниження протизгортаючої активності і фібринолізу, аж до формування тромбозу, що викликає дезорганізацію медулярного кровообігу.

Локальна та генералізована гіперкоагуляція, пошкодження церебральних структур, що залучені у процеси регуляції гемостазу обумовлюють подальші ускладнення у системі зсідання крові, які з огляду на тісний структурно-функціональний зв'язок між всіма компонентами системи гемостазу обумовлюють зміни у системі ендогенних антикоагулянтів та фібринолізу [645].

Спричинені ішемією ділянки розпаду тканин головного мозку є джерелом надходження у кровоток низки факторів, що обумовлюють активацію системи гемостазу, що є однією з причин прогресуючого наростання прокоагулянтного потенціалу крові, формування стану стійкої гіперкоагуляції та декомпенсації фібринолітичної системи. Ініціюючою подією даного процесу вважається масове надходження у кровоток тромбопластину, вміст якого у тканинах головного мозку за фізіологічних умов є підвищеним. Кількість і швидкість утворення тканинного тромбопластину залежать від ділянки ураження, рівня кровопостачання, тривалості пошкоджуючого впливу. У цілому, розвиток синдрому гіперкоагуляції є універсальною відповіддю системи гемостазу на дію пошкоджуючих факторів. Відповідно до літературних даних, цей синдром спостерігається у більшості хворих

вже у перші години гострого порушення мозкового кровообігу, максимально проявляється на 3-4-й день і знижується на 2-му тижні [66].

У зоні ішемії відмічається зниження простагліцинів-синтезуючого резерву судинного ендотелію і підвищення утворення тромбоксану A₂, що на тлі зростаючого вмісту тканинного тромбопластину значно підвищує тромбогенний потенціал судин і гемостатичні властивості крові. При цьому ішемія/реперфузія спричиняє зміни гемостатичного потенціалу крові не лише локально в ішемізованому органі, але й системно впливає на мікроциркуляторне судинне русло у всьому організмі.

Зниження простагліцинів-синтезуючої активності ендотелію та біодоступності NO належать до чинників, що сприяють виникненню локального вазоспазму та наростанню стенозу за рахунок тромбування, погіршення мікрогемодинаміки у дистальній судинній мережі. Ішемія мозку викликає посилене утворення NO за рахунок активацію нейрональної і індукційної NOS, у той час як активність eNOS у судинах мозку знижується [67,68]. Як відомо, продукція NO ендотелієм судин є своєрідним протекторним механізмом, який з одного боку реалізується через пригнічення NMDA-рецепторів, з іншого - через опосередковане протеїназами фосфорилування білків плазматичних насосів. Як наслідок, у нейронах знижується внутрішньоклітинна концентрація іонів кальцію внаслідок їх закачування у клітинні депо.

У патогенезі ішемічного інсульту провідну роль відіграють також порушення на рівні судинно-тромбоцитарної ланки системи гемостазу. Активація даної ланки відмічається у 70% пацієнтів у найближчу добу і у 50% на 5-7-му добу після перенесеного інсульту [69]. Активація тромбоцитів, може розглядатися як своєрідна зв'язуюча ланка між дією факторів ризику розвитку цереброваскулярних захворювань та тромботичним пошкодженням судинного ендотелію та супроводжується змінами реологічних властивостей крові, співвідношення кількості формених елементів крові і плазми, порушеннями ангіогемічних взаємодій та мікроемболією дрібних капілярів судинного басейну [70,71].

Пусковим механізмом адгезії тромбоцитів є пошкодження ендотелію спричинене ішемією, механічними факторами, пригніченням локального фібринолізу. Внаслідок цього зменшується індукція простацикліну. У результаті дії фізіологічних стимуляторів колагену і тромбіну відбувається активація тромбоцитів, посилюється синтез та вивільнення метаболітів арахідонової кислоти, у першу чергу тромбоксан А₂, який, у свою чергу, підвищує агрегацію тромбоцитів та інших клітинних елементів крові [72,73].

Отже, співвідношення між простацикліном і тромбоксаном А₂ є визначальним фактором функціонального стану тромбоцитів. Саме його порушення може бути однією з причин, які викликають агрегацію тромбоцитів і процес тромбоутворення.

Додатковим фактором, що сприяє посиленню тромбогенного потенціалу плазми крові, є активація коагуляційної ланки гемостазу, зокрема, зростання концентрації фібриногену, що сприяє підвищенню в'язкості крові та зниженню деформованості еритроцитів.

Варто наголосити, що форменим елементам крові відводиться виключно важлива роль у процесах судинно-тромбоцитарного згортання, а також активації плазменного гемостазу, яка реалізується за рахунок вивільнення ними низки біологічно активних сполук, зокрема цитокінів, та забезпеченні поверхні для протікання реакції активації факторів згортання крові.

Найчисленнішою популяцією клітин крові є еритроцити, загальний об'єм яких у 50 разів перевищує об'єм лейкоцитів і тромбоцитів. Серед основних причин виникнення синдрому високої в'язкості крові при церебральній ішемії є активація внутрішньосудинної еритроцитарної агрегації на тлі еритроцитозу і мікрореологічних порушень еритроцитів, зокрема підвищення концентрації внутрішньоклітинного Ca²⁺, виснаження пулу АТФ, порушення в'язкості та еластичності мембран.

Таким чином, зміни гемореології, клітинного і плазменного гемостазу, що супроводжуються ендотеліальною дисфункцією, порушенням функціональної

активності формених елементів крові, гіперкоагуляційним синдромом та зниженням антикоагулянтного потенціалу можна виокремити як важливі ланки під час патогенезу церебральної ішемії.

Одним з визначальних механізмів, що обумовлює ініціацію каскаду патобіохімічних реакцій пошкодження нервової тканини та розвиток апоптотичної, а подекуди і некротичної загибелі нейронів та безпосередньо пов'язаний з функціонуванням окремих компонентів системи гемостазу, є розвиток оксидативного стресу [74,75].

Вільнорадикальні процеси активно залучені у реалізацію ключових механізмів тромбоутворення, сприяють прогресуванню прокоагуляційної спрямованості змін у системі гемостазу та провокують розвиток ендотеліальної дисфункції. Внаслідок даного комплексу патологічних змін зростає ауто-паракринний механізм активації тромбоцитів, що, у свою чергу, обумовлює їх більшу адгезійну та агрегаційну здатність, а також сприяє вторинній необоротній агрегації тромбоцитів.

За розвитку оксидативного стресу посилюється синтез і секреція ендотелієм інгібітору активатора плазміногену 1 типу (ПАІ-1). У хворих з інсультом діагностується значне зростання концентрації ПАІ-1, що дозволяє розглядати даний показник як один з клінічно значимих біомаркерів тромбоутворення.

Отже, активація судинно-тромбоцитарної та плазменної ланок системи гемостазу на тлі зниження антикоагулянтної і фібринолітичної активності належать до важливих факторів патогенезу ішемічного інсульту.

1.3. Цукровий діабет 2 типу як фактор ризику протромбогенного стану

Згідно сучасних уявлень, цукровий діабет 2 типу, особливо ускладнений ожирінням, характеризується протромбогенними змінами системи гемостазу, що у поєднанні з інсулінорезистентністю, компенсаторною гіперінсулінемією, порушенням вуглеводного обміну, атерогенною дисліпідемією та артеріальною гіпертензією значно підвищує ризик виникнення та прогресування серцево-судинних захворювань, у тому числі і розвиток ішемічного інсульту. Інсульт у хворих на цукровий діабет у більшості випадків проявляється як ішемічний та розвивається, зазвичай, по атеротромботичному типу, оскільки патогенез цукрового діабету характеризується значними атерогенними ураженнями коронарних та мозкових артерій. Летальність при інсульті у хворих на цукровий діабет перевищує середній показник у популяції у цілому і складає 40-60% [76,77]. Хворі на цукровий діабет характеризуються підвищеною схильністю до коагуляції. Згідно сучасних уявлень протромбогенний характер змін системи гемостазу у хворих на цукровий діабет безпосередньо пов'язаний з такими проявами захворювання, як інсулінорезистентність, дисліпідемія, гіперінсулінемія, окиснювальний стрес та запальні реакції [78]. Кожен з перерахованих чинників окремо здатен впливати на функціонування системи гемостазу, а їх поєднання призводить до значних комплексних метаболічних перебудов, що впливають на функціонування всіх ланок системи гемостазу.

Низкою досліджень показано, що інсулінорезистентність тісно асоційована з підвищеними рівнями вітамін-К-залежних факторів коагуляції, зокрема, факторів VII, IX, X [79,80]. Зростання концентрації фібриногену, фактору VII та комплексів тромбін-антитромбін сприяють стабілізації та збереженню основи фібринового згустку у місцях пошкодження ендотелію.

Однією з характерних рис, що супроводжують патогенез цукрового діабету та ожиріння, є підвищення концентрації фібриногену у плазмі крові. Виявлено позитивну кореляцію між концентрацією фібриногену та рівнем глюкози натще і

негативну – з рівнем холестерину ЛПВЩ [81]. При підвищених рівнях фібриногену ризик розвитку серцевих та мозкових інфарктів зростає у декілька разів, що безпосередньо пов'язано з підвищенням в'язкості крові, посиленням агрегації тромбоцитів та еритроцитів, стимуляцією проліферації ендотеліальних та гладенько м'язевих клітин. Окрім того, накопичуючись в області атеросклеротичної бляшки фібрин сприяє стабілізації тромбоцитарних утворень [82].

Патогенез цукрового діабету супроводжується патологічними змінами фібринолізу, що проявляється у зниженні активності даного процесу на фоні активізації коагуляційних реакцій сприяє розвитку прокоагулянтного стану. Так, наприклад, у плазмі крові хворих на цукровий діабет концентрації антитромбіну III та протейну C є зниженими, особливо за умов декомпенсованості захворювання [83]. Також виявлено існування кореляції між вираженістю стану інсулінорезистентності та вмістом тканинного активатора плазміногену [84].

Свідченням пригнічення фібринолізу є підвищення концентрації та активності інгібітору активатора плазміногену типу I (ПАІ-1), який є головним фізіологічним інгібітором процесу активації плазміногену, гальмуючи, таким чином, розщеплення фібринового згустку. Саме рівень ПАІ-1 розглядають як один із значимих маркерів зниженої активності фібринолітичної системи [85].

Окрім того, підвищення концентрації ПАІ-1 сприяє утворенню нестійких атеросклеротичних бляшок. Відповідно до результатів епідеміологічних досліджень підвищений рівень ПАІ-1 можна розглядати як клінічно-значимий предиктор розвитку інфаркту та атеротромбозу [86,87,88]. Виявлено прямий зв'язок плазменого рівня ПАІ-1 з гіперінсулінемією, інсулінорезистентністю та рівнем глікемії в осіб з цукровим діабетом та порушеною толерантністю до глюкози. Окрім того, за гіперінсулінемії також спостерігається посилення синтезу та секреції ПАІ-1 гепатоцитами. Рівень ПАІ-1 достовірно корелює з індексом маси тіла, окружністю талії, рівнем артеріального тиску, вмістом фібриногену, С-реактивного білка, холестеролу та ЛПДНЩ. Порушення метаболізму ліпідів, особливо характерне для хворих на діабет, ускладнений ожирінням, призводить до накопичення

тригліцеридів, що здатні безпосередньо впливати на експресію гену ПАІ-1[89]. Дані щодо вмісту основного інгібітору плазміну – α_2 -антиплазміну неоднозначні, проте є низка робіт, де автори показують підвищення його вмісту у хворих з цукровим діабетом.

Структурно-функціональні порушення тромбоцитарної ланки є ще одним вагомим чинником наростання коагулянтного потенціалу за розвитку діабету 2 типу. Зазвичай, хворі на цукровий діабет як 1, так і 2 типу характеризуються підвищеною функціональною активністю тромбоцитів, обумовленою, перш за все, значним посиленням мобілізації внутрішньоклітинного кальцію, посиленням перетворення фосфоінозитиду.

Існують дані щодо порушень стану мембран тромбоцитів, зокрема, відмічається зниження експресії GPIIb-а, підвищення експресії P-селектину та наростання чутливості до стимулів, що посилюють мобілізацію кальцію із внутрішньоклітинних депо. Мембрани тромбоцитів характеризуються підвищеною текучістю, внаслідок зміни співвідношення холестерину та фосфоліпідів [90].

У цілому, патологічні зміни у функціонуванні тромбоцитів при діабеті пов'язані з порушенням гомеостазу двохвалентних катіонів (зниження концентрації Mg^{2+} та підвищення Ca^{2+}), посилення реакцій глікозилювання мембранних білків та фосфорилування легких ланцюгів міозину, зниження вмісту поліфосфоінозитиду, зниження утворення оксиду азоту, простацикліну та інших простаноїдів, які сприяють розширенню просвіту судин на тлі посиленого синтезу простаноїдів вазоконстрикторної дії, що у комплексі призводить до посилення процесів адгезії, агрегації тромбоцитів та знижує їх виживаність.

Стан інсулінорезистентності також впливає на функціональну активність тромбоцитів [91]. Автори роботи [92] проаналізували реакцію на інсулін тромбоцитів людей з ожирінням та без даної патології і показали, що інсулін пригнічує адгезію тромбоцитів до колагену у осіб з цукровим діабетом, що мали надлишкову вагу, у той час як для осіб з нормальною вагою такого ефекту виявлено не було. Більше того, інсулін, через підвищення концентрації цГМФ,

сприяє інактивації тромбоцитів після їх адгезії, проте подібний вплив реалізується лише за відсутності ожиріння.

Низкою клінічних та експериментальних досліджень доведено, що саме хронічна гіперглікемія є одним з найважливіших метаболічних факторів, задіяних у розвиток судинних патологій [93]. Враховуючи, що глюкоза утилізується всіма типами клітин та безпосередньо чи опосередковано впливає на перебіг різноманітних внутрішньоклітинних процесів, реалізація негативного ефекту довготривалої гіперглікемії відбувається за різноманітними механізмами.

При підвищеній концентрації сироваткової глюкози відбувається блокування адренорецепторів на судинах, що пригнічує їх здатність до скорочення у відповідь на дію вазоконстрикторів. При тривалій некомпенсованості цукрового діабету спостерігається дилатація та гіперфузія мікросудин у органах-мішенях, підвищується внутрішньо капілярний гідростатичний тиск, порушуються процеси авторегуляції капілярного кровотоку. У відповідь на зростання гідравлічного тиску активізується синтез ендотеліальними клітинами факторів релаксації судин [94].

Вагомим патогенетичним механізмом реалізації негативного ефекту тривалої гіперглікемії є значне зростання швидкості аутоокиснення глюкози з подальшим накопиченням вільних радикалів та розвитком оксидативного стресу [95], прогресування якого ускладнюється на фоні виснаження ферментативної та неферментативної ланок антиоксидантної системи, порушень у функціонуванні ферментів поліолового шляху обміну глюкози, мітохондріального окиснення, обміну простагландинів та лейкотрієнів [96].

У відповідь на індуковану гіперглікемією надлишкову продукцію активних форм кисню відбувається інгібування ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, ключового ферменту гліколізу. Коли вільні радикали спричиняють розрив у молекулі ДНК, спостерігається активація одного з ключових ферментів репарації ДНК полі(АДФ-рибозо)полімерази. У подальшому ПАРП каталізує полі-АДФ-рибозилування молекули гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, спричиняючи у такий спосіб пригнічення активності

ферменту. Це призводить до накопичення низки проміжних метаболітів гліколізу, наслідком чого є залучення до патогенезу діабету п'яти патогенетичних механізмів, що сприяють розвитку ендотеліальної дисфункції та ускладнень діабету: 1) активація поліпного шляху; 2) накопичення кінцевих продуктів глікування (AGEs); 3) зростання кількості рецепторів для AGEs; (4) активація ізоформ протеїнази C; 5) гіперактивація гексозамінового шляху.

Зниження резерву антиоксидантної системи призводить до порушення регуляції судинного тонуусу, сприяє посиленню проліферації м'язевих клітин, адгезії макрофагів та нейтрофілів. Окрім того, ішемія та гіпоксія, як елементи патогенезу цукрового діабету, також вносять певний вклад в утворення активних кисневих метаболітів. Виникає своєрідне замкнене коло, коли розвиток оксидативного стресу через накопичення продуктів перекисного окиснення ліпідів, окисно модифікованих білків, вуглеводів, зростання рівня АКМ та вільних радикалів призводить до патологічних порушень на рівні функціонування внутрішньоклітинних каскадів та позаклітинних процесів, що у свою чергу викликає утворення так званих вторинних джерел індукції та підтримання оксидативного стресу.

В умовах інтенсифікації вільнорадикальних реакцій, перекисного окиснення зазнають ліпіди та фосfolіпіди стінок судин, що призводить до зміни їх фізико-хімічних властивостей та імунологічних особливостей [97]. Окисній модифікації підлягають також ліпіди та апобілки, які входять до складу ліпопротеїдів, що призводить до порушення метаболізму даних часток. На додачу, глікозилювання апопротеїну В знижує здатність ЛПНЩ до розпізнавання класичними рецепторами. Адаже зазвичай їх катаболізм протікає у печінці, частково у фібробластах і гладеньком'язевих клітинах, де рецептор-опосередкований метаболізм ЛПНЩ регулюється за механізмом зворотного зв'язку. Окиснені ЛПНЩ (окси-форми) розпізнаються та захоплюються макрофагами та іншими імунокомпетентними клітинами, що обумовлює накопичення у цитоплазмі даних клітин ефірів холестеролу, появу великої кількості ліпідних вакуоль – фенотип так званих «пінистих» клітин [98,99]. Окиснені ЛПНЩ характеризуються імуногенними

властивостями, призводячи до утворення комплексів з антитілами, які стимулюють подальше утворення «пінистих» клітин та посилюють процеси агрегації тромбоцитів. За таких умов відбувається активація гуморальної ланки імунітету та накопичення у плазмі специфічних антитіл до окиснених ЛПНЩ, що створює додаткове навантаження на імунну систему [100].

Модифіковані ліпопротеїди викликають активацію макрофагів та посилення ними продукції низки цитокінів, зокрема, інтерлейкіну-1 та фактору некрозу пухлин, які обумовлюють пошкодження ендотелію судин та здатні впливати на чутливість периферичних тканин до дії інсуліну. Невеликі розміри дрібних щільних ЛПНЩ полегшують їх проникнення у судинну стінку через шар ендотелію, цьому сприяє і стійка гіперглікемія, адже глікозильовані ліпопротеїди погано розпізнаються рецепторами печінки та повільно виводяться з кровотоку.

Окрім макрофагів, модифіковані ЛПНЩ можуть захоплюватися шляхом ендцитозу гладеньком'язовими клітинами артерій, після чого вони також набувають ознак «пінистих» клітин, що слугує одним з патогенетичних механізмів утворення атеросклеротичних бляшок [101]. Підвищені рівні ліпопротеїдів належать до чинників, що сприяють пригніченню тромболізу та формуванню і прогресуванню формування атеросклеротичних бляшок. Для цукрового діабету характерний певний тип нестійких бляшок зі зниженим вмістом гладеньком'язевих клітин, підвищеним вмістом активованих макрофагів (пінистих клітин), Т-лімфоцитів, ліпідним ядром, що розташоване безпосередньо під тонкою та рихлою фіброзною оболонкою [102,103]. Накопичення макрофагів через посилення секреції низки металопроїназ є додатковим фактором, що сприяє руйнуванню колагенової покривки атеросклеротичної бляшки та підвищує її схильність до розриву. Розриви таких бляшок у хворих з діабетом 2 типу зустрічаються втричі частіше, ніж у осіб без діабету.

Неферментативне глікозилювання білків призводить до утворення та накопичення кінцевих продуктів глікозилювання, які характеризуються значним токсичним потенціалом – впливають на структуру та метаболізм білків і ліпідів,

активують процеси перекисного окиснення ліпідів, сприяють розвитку та підтриманню високого артеріального тиску у хворих з діабетом, порушують чутливість стінок судин до дії судинорозширюючих агентів.

Патогенез цукрового діабету тісно асоційований з функціональною та анатомічною дисфункцією ендотелію [104], що підтверджується результатами морфологічних досліджень та підвищенням у плазмі крові рівня фактору фон Вілебранда, ендотеліну-1. Посилене утворення вільних радикалів та активних кисневих метаболітів обумовлює безпосереднє пошкодження судинної стінки. При цьому судинний ендотелій зазнає дистрофічних перебудов, його тромборезистентний потенціал та здатність перешкоджати агрегації тромбоцитів та тромбоутворенню різко знижується. Порушення на рівні ендотелію включають також посилення злущування клітин, ослаблення міжклітинних зв'язків, порушення синтезу білків адгезії [105]. До функціональних порушень у системі дрібних судин, що не в останню чергу пов'язані з ендотеліальною дисфункцією, належать підвищення проникності судинної стінки для макрофагів та ліпопротеїдів, гемодинамічні порушення та порушення функціонування тромбоцитів [106]. У хворих на цукровий діабет спостерігається потовщення базальної мембрани, посилюється синтез колагену, фібронектину, знижується вміст сульфат протеїнгліканів, хондроїтину, ламініну. Накопичення окиснених форм ліпопротеїдів сприяє адгезії циркулюючих моноцитів до пошкодженого ендотелію та їх подальшій міграції в інтиму судин, окрім того і самі ЛПНЩ виявляють цитотоксичну дію [107].

Однією з причин генералізованої дисфункції судинного ендотелію є різке пригнічення синтезу оксиду азоту, який виконує антиатерогенну та антиагрегатну функції, блокує проліферацію гладеньком'язевих клітин, перешкоджає адгезії моноцитів та тромбоцитів [108]. Зниження секреції оксиду азоту відбувається у відповідь на підвищення концентрації інсуліну, який також обумовлює зниження секреції простагліцину. Зазначені зміни протікають на фоні посиленого утворення вазоконстрикторів - ендотеліну та тромбоксану.

Кінцеві продукти перекисного окиснення ліпідів інгібують синтез простагліцинів та посилюють синтез тромбоксанів, що сприяє адгезії тромбоцитів до ендотелію та їх агрегації [109].

Наслідком низки структурно-метаболических, гемодинамічних та реологічних змін всередині дрібних судин є зв'язування адгезивних молекул, що експресуються одними клітинами з своїми контррецепторами на поверхні інших клітин, що призводить до локального скупчення клітин у просвіті судини, розвитку стазу та тромбозу.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Характеристика груп, які досліджувалися

У дослідженні було використано сироватку та плазму крові, яку одержували відразу після надходження пацієнтів з симптоматикою ішемічного інсульту до I та II неврологічних відділень Київської міської клінічної лікарні № 4. Діагноз «ішемічний інсульт» був підтверджений на основі результатів комп'ютерної та/або магнітно-резонансної томографії. Цукровий діабет виявляли за наявністю гіперглікемії натще, підвищеного рівня глікозильованого гемоглобіну та стану інсулінорезистентності. Хворі у стані коми, з вираженою дихальною недостатністю або з підозрою на онкологічне захворювання були виключені з дослідження.

Таким чином було сформовано дві дослідні групи – пацієнти з ішемічним інсультом окремо та з інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу. За контроль було взято результати досліджень у групі умовно здорових донорів, які не мали тромботичних захворювань в анамнезі та відповідали досліджуваним групам пацієнтів за статтю і віком.

Всі хворі або їх родичі добровільно погодилися на участь у клінічному дослідженні та дали письмову згоду на участь у ньому.

При надходженні до стаціонару, кожному пацієнту вводили аспірин 325 мг з наступним щоденним прийомом 100 мг аспірину внутрішньо. Починаючи з другої доби перебування у стаціонарі, пацієнти отримували низькомолекулярний гепарини у профілактичній дозі.

2.2. Реагенти і матеріали

У роботі було використано наступні реактиви та матеріали: акриламід, N,N'-метилен-біс-акриламід, персульфат амонію, ТЕМЕД (N,N,N',N'-тетраметилен-1,2-діамін) (GE Healthcare AB, Швеція), діамінобензидин (ДАБ) та р-нітрофенолфосфат (Sigma, Німеччина), β -меркаптоетанол, хромогенні субстрати, реагенти для проведення хронометричних тестів та плазми-калібратори ("Ренам", РФ), маркери молекулярних мас для електрофорезу (Fermentas, Литва). Антитіла для імунодетекції інгібітору активатору плазміногену типу-1 (ПАІ-1), тканинного активатора плазміногена (ТАП) та фактору фон Віллебранда (Invitrogen, США). Хімічні реактиви вітчизняного виробництва, такі як солі, кислоти та луги були кваліфікації «чда» та «хч».

2.3. Обладнання

В роботі використовували: апарат для препаративного вертикального диск-електорофорезу (BioRad, США), спектрофлуорофотометр (Shimadzu RF-1505, Shimadzu, Japan), спектрофотометр (SmartSpec Plus, BioRad, США), аналізатор агрегації тромбоцитів АТ-02 («Медицина-Техніка», Білорусь), мікропланшетний спектрофотометр (BioTek Instruments, BioTek, USA), коагулологічний аналізатор (Rayto Life and Analytical Sciences, China), центрифуги.

Магнітні мішалки, піпетки автоматичні, термостат, шейкер, водяна баня та т.ін. є продукцією фірм, що працюють згідно стандарту ISO 9001. Пластиковий лабораторний посуд (планшети для імуноферментного аналізу, планшети з несорбуючою поверхнею, пластикові мікропробірки типу епендорф,) отримано від фірми Costar і ColeParmer (США). Скляний лабораторний посуд (колби, стакани, пробірки, циліндри та ін.) отримано від фірм Kimax і Wheaton, (США).

2.4. Отримання плазми крові

Кров, відбирану пункційно з ліктьової вени пацієнтів у період з 8 до 9 годин ранку перед сніданком, вносили у пластикову пробірку, що містила лимоннокислий натрій (38 мг/мл) у кінцевому співвідношенні 9:1 та обережно перемішували. Вміст пробірки центрифугували впродовж 40 хв. при 900g, надосадову переносили у пластикові пробірки.

Отриману плазму крові використовували для аналізу або, за необхідності, заморожували при -20°C у епендорфах. Плазму розморожували прогріванням на водяній бані (37°C) впродовж 20 хв., після чого обережно розмішували та перемішували на лід. Даний спосіб розморожування дозволяє зберегти активність факторів зсідання крові [110].

2.5. Отримання плазми крові, збагаченої тромбоцитами

Кров, відбирану пункційно з ліктьової вени пацієнтів у період з 8 до 9 годин ранку перед сніданком, вносили у пластикову пробірку, що містила лимоннокислий натрій (38 мг/мл) у кінцевому співвідношенні 9:1 та обережно перемішували. Вміст пробірки центрифугували протягом 15 хв. за 150 g і температурі 20°C .

Надосадову рідину відбирали та перевіряли отриману фракцію тромбоцитів на їх агрегаційну здатність. Для цього використовували аналізатор агрегації тромбоцитів АТ-02 та стандартний протокол визначення агрегаційної здатності плазми, збагаченої на тромбоцити [110].

2.6. Визначення концентрації ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ), ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), тригліцеридів та загального холестеролу у сироватці крові

Концентрацію ЛПВЩ, ЛПНЩ, тригліцеридів та загального холестеролу у сироватці крові вимірювали спектрофотометричним методом за допомогою біохімічного аналізатору Microlab 300. У ході дослідження було використано

стандартні набори для визначення концентрації відповідних компонентів виробництва "PLIVA-Lachema Diagnostika" (Чехія). Визначення проводили відповідно до рекомендацій фірми виробника [111].

2.7. Визначення аланінамінотрансферазної активності у сироватці крові

Активність аланінамінотрансферази (АЛТ) визначали спектрофотометрично використовуючи біохімічний аналізатор Microlab 300 за довжини хвилі 340 нм [111]. Для дослідження активності АЛТ використовували стандартні набори виробництва "PLIVA-Lachema Diagnostika" (Чехія).

Принцип методу полягає у перенесенні АЛТ аміно-групи від L-аланіну до α -оксоглутарату, з утворенням пірувату та L-глутамату. Далі, за присутності НАДН, піруват перетворюється на L-лактат. Активність АЛТ визначається прямо пропорційним зменшенням оптичної щільності розчину при перетворенні НАДН та НАД⁺. Активність ферменту виражали в од/л.

2.8. Визначення активності аспартатамінотрансферази у сироватці крові

Активність аспартатамінотрансферази (АСТ) визначали спектрофотометрично використовуючи біохімічний аналізатор Microlab 300 при довжині хвилі 340 нм [111]. Для дослідження активності АСТ використовували стандартні набори виробництва "PLIVA-Lachema Diagnostika" (Чехія). Принцип методу полягає у перенесенні АСТ аміно-групи від L-аспартату до α -оксоглутарату, з утворенням оксалацетату та L-глутамату. Отриманий оксалацетат вступає в реакцію з НАДН, з утворенням L-малату та НАД⁺. Активність АСТ визначається прямо пропорційним зменшенням оптичної щільності розчину при перетворенні НАДН та НАД⁺. Активність АСТ виражали в од/л.

2.9. Визначення активності гамма-глутамілтранспептидази у сироватці крові

Активність гамма-глутамілтранспептидази (ГГТ) визначали спектрофотометрично, використовуючи біохімічний аналізатор Microlab 300 при довжині хвилі 400-430 нм [111]. Для дослідження активності ГГТ використовували стандартні набори виробництва "PLIVA-Lachema Diagnostika" (Чехія). Під дією гамма-глутамілтранспептидази глутаміновий залишок з γ -L-(+)-глутаміл-4-нітроаніліда переходить на пептидний акцептор - гліцилгліцин. При цьому звільняється хромоген - п-нітроанілін. Концентрацію вільного п-нітроаніліну вимірюють сектрофотометрично після гальмування ферментативної реакції оцтовою кислотою). Активність ГГТ виражали у од/л.

2.10. Визначення активності лужної фосфатази у сироватці крові

Активність лужної фосфатази у сироватці крові щурів вимірювали спектрофотометричним методом за допомогою біохімічного аналізатору Microlab 300 при довжині хвилі 405 нм [111]. Для дослідження активності лужної фосфатази використовували стандартні набори виробництва "PLIVA-Lachema Diagnostika" (Чехія). Принцип методу полягає у гідролітичному розщепленні за допомогою лужної фосфатази сироватки субстрату реакції – п-нітрофенілфосфату до п-нітрофенолу, що має в лужному середовищі жовте забарвлення. Активність лужної фосфатази визначається прямо пропорційним збільшенням оптичної щільності при зростанні інтенсивності забарвлення в пробі, внаслідок збільшення вмісту п-нітрофенолу. Активність лужної фосфатази виражали в од/л.

2.11. Визначення концентрації креатиніну у сироватці крові

Концентрацію креатиніну визначали спектрофотометричним методом на біохімічному аналізаторі Microlab 300 при довжині хвилі 500 нм [111]. Для дослідження концентрації креатиніну використовували стандартні набори виробництва "PLIVA-Lachema Diagnostika" (Чехія). Принцип методу базується на взаємодії в лужному середовищі пікринової кислоти з сироватковим креатиніном з утворенням комплексу помаранчево-червного кольору, концентрація якого вимірюється фотометрично. Концентрацію креатиніну виражали в мкмоль/л.

2.12. Визначення концентрації сечовини у сироватці крові

Сироваткову концентрацію сечовини визначали спектрофотометричним методом на біохімічному аналізаторі Microlab 300 при довжині хвилі 340 нм [111]. Для дослідження концентрації сечовини використовували стандартні набори виробництва "PLIVA-Lachema Diagnostika" (Чехія). Метод базується на гідролітичному розщепленні сечовини за допомогою уреази до діоксиду вуглецю та амонію, який, в свою чергу, в присутності нітропрусиду, вступає в реакцію з фенолом і гіпохлоритом, утворюючи забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації сечовини дослідного зразка. Концентрацію сечовини виражали у ммоль/л.

2.13. Визначення тромбінового часу зсідання плазми крові

Визначення проводили відповідно до загальноприйнятої методики [112]. У пластиковий посуд для аналізу вносили 0,1 мл плазми крові, попередньо проінкубованої впродовж 2 хв при 37°C, після чого додавали 0,1 мл розчину тромбіну (6 МО/мл). Фіксували час зсідання у секундах на коагулологічному аналізаторі.

2.14. Визначення протромбінового часу зсідання плазми крові

Визначення проводили відповідно до загальноприйнятої методики [112]. У пластиковий посуд для аналізу вносили 0,1 мл плазми крові, попередньо проінкубованої впродовж 2 хв при 37°C, після чого додавали 0,2 мл ренампластину. Фіксували час зсідання у секундах на коагулологічному аналізаторі.

2.15. Визначення активованого часткового тромбопластинового часу зсідання плазми крові

Визначення проводили відповідно до загальноприйнятої методики [112]. У пластиковий посуд для аналізу вносили 0,1 мл плазми крові, 0,1 мл АЧТЧ-реagenta та інкубували впродовж 3 хв при 37°C, після чого додавали 0,1 мл 25 мМ CaCl₂ та фіксували час зсідання у секундах на коагулологічному аналізаторі.

2.16. Визначення анцистронового часу зсідання плазми крові

Визначення проводили відповідно до загальноприйнятої методики [112]. У пластиковий посуд для аналізу вносили 0,2 мл плазми крові, попередньо проінкубованої впродовж 2 хв при 37°C, після чого додавали 0,1 мл розчину тромбіноподібного ферменту анцистроу (0,35 NIH) та фіксували час зсідання у секундах на коагулологічному аналізаторі. За 1 NIH приймали міжнародну одиницю активності зсідання, що відповідає такій кількості ферменту, яка забезпечує згортає 1 мл 0,1% фібриногену за температури 29°C за 15 с.

2.17. Визначення рівня протромбінового пулу у плазмі крові

Протромбін отримували з плазми крові шляхом сорбування вітамін К-залежних білків на сірчанокиислому бар'ї з розрахунку 120 г BaSO₄ на 1 л плазми. Проби інкубували впродовж 60 хв на льоду, обережно перемішуючи кожні 10 хв. Суміш центрифугували при 2 000 g впродовж 15 хв. Елюцію протромбінвмісного пулу проводили використовуючи 50 мМ трис-НСl буфер, рН 7.4, що містить 200 мМ NaCl, 10 мМ бензамідин і 20 мМ ЕДТА [113].

Контроль якості виділеного протромбінового пулу проводили методом диск-електрофорезу у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію відповідно до методу Лемлі [114]. Відносний вміст протромбінового пулу вимірювали за допомогою стандартного твердофазного імуноферментного аналізу, використовуючи антитіла до протромбіну та згідно загальноприйнятої методики [6.]

2.18. Визначення концентрації фібриногену у плазмі крові

Визначення концентрації фібриногену проводили спектрофотометрично відповідно до методу [110]. У скляну пробірку вносили 0,2 мл плазми, 1,7 мл 0,1 М фосфатного буфера рН 7, 0,1 мл тромбіну (2 НН) та 0,1 мл 0,04 М моноіодоцтової кислоти. Суміш ретельно перемішували скляною паличкою та залишали у термостаті при 37°C впродовж 30 хв. Утворений згусток фібрину виймали шляхом викручування на паличку. Далі згусток на паличці декілька разів промивали холодним розчином 0,13 М NaCl, надлишок рідини видаляли за допомогою фільтрувального паперу. Одержаний згусток розчиняли у 5 мл 1,5% розчину оцтової кислоти. Концентрацію білка визначали спектрофотометрично за довжин хвилі 280 та 320 нм. Концентрацію фібриногену у плазмі крові розраховували відповідно до формули:

$$\Phi = (E_{280} - E_{320}) 255 / 15,06$$

де Φ – концентрація фібриногену, г/л; 255 – коефіцієнт перерахунку концентрації фібриногену в об'ємі зразка на його концентрацію в плазмі; 15,06 –

коефіцієнт екстинкції поглинання 1% розчину фібрину у кислому середовищі за довжини хвилі 280 нм.

2.19. Визначення концентрації розчинних фібрин-мономерних комплексів у плазмі крові

Визначення концентрації розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) проводили використовуючи о-фенантроліновий тест [110]. Дана методика ґрунтується на оцінці часу появи у досліджуваній плазмі фібринових часток після додавання 0,78% розчину о-фенантроліну (1:1). Результати оцінювали напівкількісно за часом від моменту додавання о-фенантроліну до початку появи перших частинок та за формою осаду: дрібні частинки - 0,035 мг/мл (1 у.о.), пластівчаста муть - 0,07 мг/мл (2 у.о.), пластівці, нитки - 0,105 мг/мл (3 у.о.), гелеподібний осад - 0,14 мг/мл (4 у.о.).

Після оцінки концентрації РФМК проводили подальше доочищення отриманих комплексів шляхом промивання фізіологічним розчином. Для цього РФМК спочатку осаджали шляхом центрифугування при 3000 g впродовж 10 хв, після чого до осаду додавали фізіологічний розчин у об'ємі, що відповідав початковому внесеному об'єму плазми крові. Проби ретельно перемішували та знову центрифугували (3000g, 15 хв). Процедуру відмивки повторювали тричі.

2.20. Дослідження параметрів АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів

Процес агрегації тромбоцитів досліджували на фотооптичному агрегометрі AP2110 «Солар» (Білорусь) [115].

Кров, відбирану пункційно з ліктьової вени пацієнтів у період з 8 до 9 годин ранку перед сніданком, вносили у пластикову пробірку, що містила лимоннокислий натрій (38 мг/мл) у кінцевому співвідношенні 9:1 та обережно перемішували. Як збагачену, так і збіднену на тромбоцити плазму крові отримували шляхом

центрифугування проб, відповідно, при 160 g та 250 g. Агрегацію тромбоцитів Дослідження параметрів АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів проводили впродовж перших 2 годин після забору крові. Як індуктор агрегації використовували АДФ у кінцевій концентрації 2,5 мкМ. Ступінь агрегації визначали як максимальний рівень світлопропускання плазми крові після внесення індуктора агрегації у кювету аналізатора. Вміст тромбоцитів у зразках стандартизували за показниками агрегометра до $2 \times 10^5 \pm 5\%$ на 1 мкл проби шляхом розведення плазмою, збідненою на тромбоцити.

2.21. Визначення загального часу лізису еуглобулінів плазми крові

Загальну фібринолітичну активність плазми крові оцінювали за загальним часом лізису фібринового згустку плазми крові, який утворився після полімеризації фібрину еуглобулінової фракції, після додавання розчину CaCl_2 . Отриману еуглобулінову фракцію розчиняли у 0,25 мл 0,05 М трис-НСІ буферу, рН 7,4 та додавали 0,1 мл 25 мМ CaCl_2 . Пробу інкубували при температурі 37°C та визначали час (в годинах), який був необхідний для повного лізису згустку [116].

2.22. Визначення часу Хагеман-залежного фібринолізу плазми крові

У пластиковий посуд для аналізу вносили 8 мл дистильованої води, 0,2 мл 1 % розчину оцтової кислоти, 0,5 мл плазми крові та 0,5 мл 0,5 % суспензії каоліну. Суміш обережно перемішували та інкубували впродовж 30 хв при 37°C. Після чого проби центрифугували впродовж 6 хв при 900g, осад розчиняли у 0,5 мл 0,05 М трис-НСІ буферу, рН 7,4. Утворення згустку індукували внесенням рівного об'єму 0,025 М розчину CaCl_2 . Після утворення згустку визначали час (у хв), впродовж якого відбувався повний лізис згустку [117].

2.23. Визначення відносного рівня тканинного активатору плазміногену та інгібітору активатору плазміногену типу 1

Визначення відносного рівня тканинного активатору плазміногену, інгібітору активатору плазміногену типу 1 проводили імуноферментним методом [118], використовуючи планшети із сорбційною здатністю для мікропланшеточного спектрофотометру. Плазму крові розводили 0,05 М трис-НСІ буфером, рН 7,4 у співвідношенні 1:100 та інкубували при 4°C впродовж ночі. Видалення несорбованого антигену проводили триразовим промиванням лунок 50 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4, що містив 0,1% твін-20. Для блокування вільних місць зв'язування після інкубації з антигеном, використовували 5% розчин знежиреного молока. Для цього плашку інкубували при 37°C впродовж 60 хв. Первинні та вторинні антитіла готували відповідно до рекомендацій фірми виробника, інкубацію проводили за 37°C впродовж 60 хв.

Візуалізацію реакції проводили використовуючи субстрат для лужної фосфатази (1 мг/мл паранітрофенілфосфату у 10% диетаноламіні, рН 9,8) за 37°C впродовж 60 хв. Оптичне поглинання проб вимірювали за довжин хвиль 405 та 492 нм на мікропланшеточному спектрофотометрі μ Quant (BioTek Instruments). Оптичну похибку планшета визначали шляхом віднімання показників при 550 нм від показника при 450 нм.

2.24. Визначення активності плазміногену у плазмі крові

Активність плазміногену визначали, використовуючи хромогенний субстрат S_{2251} . У лунку мікропланшету послідовно вносили 0,05 М трис-НСІ буфер, рН 7,4, плазму, 3 мМ S_{2251} , стрептокіназу (5-10 МО/мл). Загальний об'єм інкубаційного середовища становив 0,25 мл. Проби інкубували впродовж 2-3 хв при 37°C. Реєстрацію поглинання вивільненого п-нітроаніліну проводили в двоххвильовому режимі за довжини хвилі 405 нм та 492 нм на спектрофотометрі для мікропланшетів

SmartSpec Plus через кожні 5 хв. У плазмі практично здорових донорів активність плазміногену становила $100 \pm 5\%$ [117].

2.25. Визначення активності α_2 -антиплазміну у плазмі крові

Активність α_2 -антиплазміну визначали, використовуючи хромогенний субстрат S₂₂₅₁. У лунку мікропланшету послідовно вносили 0,05 М трис-НСІ буфер, рН 7,4, плазму, плазмін (0,5 к.о./мл) та 3 мМ субстрат. Проби інкубували впродовж 2-3 хв при 37°C. Реєстрацію поглинання вивільненого п-нітроаніліну проводили в двохвильовому режимі за довжини хвилі 405 нм та 492 нм на спектрофотометрі для мікропланшетів SmartSpec Plus через кожні 5 хв. У плазмі практично здорових донорів активність α_2 -антиплазміну становила 80 -110% [117].

2.26. Визначення концентрації олігопептидів та молекул середньої маси у сироватці крові

Для визначення рівня молекул середньої маси у центрифужні скляні пробірки вносили 1 мл сироватки крові та 0,5 мл розчину трихлороцтової кислоти (25%), обережно перемішували та центрифугували впродовж 30 хв при 1500 g. Надосадову рідину відбирали та розводили у 10 разів дистильованою водою. Проводили спектрофотометричне вимірювання за λ 254 нм. Концентрацію олігопептидів у складі фракції молекул середньої маси визначали за методом Бредфорд [119].

2.27. Визначення концентрації білка

Визначення концентрації білка проводили відповідно до методу Бредфорд [119]. Виміри проводили на мікропланшетному спектрофотометрі (BioTek Instruments, BioTek, USA) при довжині хвилі 595 нм. Концентрацію визначали за калібрувальним графіком і виражали у мг/мл.

2.28. Визначення відносного вмісту інтерлейкіну-6 та TNF α у сироватці крові

Визначення відносного вмісту цитокінів проводили імуноферментним методом [118]. Плазму крові розводили 0,05 М трис-НСІ буфером, рН 7,4 у співвідношенні 1:100 та інкубували при 4°C впродовж ночі. Видалення несорбованого антигену проводили триразовим промиванням лунок 50 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4, що містив 0,1% твін-20. Для блокування вільних місць зв'язування після інкубації з антигеном використовували 5% розчин знежиреного молока. Для цього плашку інкубували при 37°C впродовж 60 хв. Первинні та вторинні антитіла готували відповідно до рекомендацій фірми виробника, інкубацію проводили за 37 С впродовж 60 хв.

Візуалізацію реакції проводили, використовуючи субстрат для лужної фосфатази (1 мг/мл паранітрофенілфосфату у 10% диетаноламіні, рН 9,8) за 37°C впродовж 60 хв. Оптичне поглинання проб вимірювали за довжин хвиль 405 та 492 нм на мікропланшеточному спектрофотометрі μ Quant (BioTek Instruments). Оптичну похибку планшета визначали шляхом віднімання показників при 550 нм від показника при 450 нм.

2.29. Визначення відносного вмісту ММП-2 та ММП-9 у сироватці крові

Визначення відносного вмісту ММП-2 та ММП-9 проводили імуноферментним методом [118]. Плазму крові розводили 0,05 М трис-НСІ буфером, рН 7,4 у співвідношенні 1:100 та інкубували при 4°C впродовж ночі. Видалення несорбованого антигену проводили триразовим промиванням лунок 50 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4, що містив 0,1% твін-20. Для блокування вільних місць зв'язування після інкубації з антигеном використовували 5% розчин знежиреного молока. Для цього плашку інкубували при 37°C впродовж 60 хв. Первинні та

вторинні антитіла готували відповідно до рекомендацій фірми виробника, інкубацію проводили за 37 С впродовж 60 хв.

Візуалізацію реакції проводили, використовуючи субстрат для лужної фосфатази (1 мг/мл паранітрофенілфосфату у 10% диетаноламіні, рН 9,8) за 37°С впродовж 60 хв. Оптичне поглинання проб вимірювали за довжин хвиль 405 та 492 нм на мікропланшеточному спектрофотометрі μ Quant (BioTek Instruments). Оптичну похибку планшета визначали шляхом віднімання показників при 550 нм від показника при 450 нм.

2.30. Ензим-електрофорез (зимографія) у поліакриламідому гелі за присутності додецилсульфату натрію

Ензим-електрофоретичний аналіз проводили відповідно до методу [120]. Розділяючий гель полімеризували за присутності субстратних білків (желатин чи фібриноген) з розрахунку 1 мг/мл. Концентрація розділяючого гелю складала 15%, що унеможливило міграцію заполімеризованих у розділяючий гель субстратних білків.

Електрофорез проводили в камерах для вертикального препаративного диск-електрофорезу («BioRad», США) у пластинах товщиною 1 мм за сили струму 19 мА для концентруючого та 36 мА для розділяючого гелів. Після закінчення електрофоретичного розділення гелі відмивали у 2,5% розчині тритону X-100 впродовж години для видалення залишків додецилсульфату натрію. Далі гелі заливали 50 мМ трис-НСІ буфером, рН 7,4, що містив 130 мМ NaCl, та інкубували впродовж 12 годин.

Фіксацію та фарбування гелів здійснювали відповідно до стандартного протоколу проведення одновимірного диск-електрофорезу.

2.31. Визначення концентрації серотоніну та триптофану у сироватці крові

До сироватки крові додавали 0,4 М HClO_4 у співвідношенні 1:5 (в/о). Проби витримували при 4°C впродовж 60 хв, після чого центрифугували 5 хв при 800 g при 4°C. Після розділення фаз обережно відбирали супернатант та підводили рН до 5-6 використовуючи 2 М КОН. Проби повторно осаджали центрифугуванням при 4°C. Надосадову рідину наносили на колонку з КМ-сефарозою, попередньо врівноважену 0,01М Na-фосфатним буфером, рН 6,2. Елюцію проводили, використовуючи буфер I (0,01М Na-фосфатний буфер, рН 6,2) для одержання триптофану та буфером II (0,03М Na-фосфатний буфер, рН 6,2) для одержання серотоніну.

Вимірювання оптичної густини проб з триптофаном проводили на спектрофлуорофотометрі при довжині хвилі збудження – 295 нм та довжині хвилі поглинання – 550 нм, проти контролю, що замість дослідної проби містив відповідний об'єм дистильованої води [121].

Вимірювання оптичної густини проб з серотоніном проводили на спектрофлуорофотометрі при довжині хвилі збудження – 359 нм та довжині хвилі поглинання – 485 нм, проти контролю, що замість дослідної проби містив відповідний об'єм дистильованої води [122].

2.32. Статистична обробка отриманих результатів

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики [123] та кореляційного аналізу з використанням комп'ютерних програм OriginLab Origin® Pro 9.1 та Statsoft Statistica® 10. Підраховували показники середньої арифметичної (M), середньої квадратичної помилки середньої арифметичної (m). Перевірку гіпотези нормального розподілу вибірки проводили за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. При відповідності

вибірки критеріям нормального розподілу достовірність відмінностей між вибірками визначали за допомогою критерію Стюдента (t). При невідповідності вибірки критеріям нормального розподілу, достовірність відмінностей між вибірками визначали за допомогою критерію Манна-Уїтні (U). Достовірними вважались різниці при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

Загальна клініко-біохімічна характеристика пацієнтів з ішемічним інсультом та пацієнтів, що хворіли на цукровий діабет 2 типу

Поширеність цереброваскулярних патологій серед населення більшості країн світу досягла загрозливо високих темпів зростання [1,2]. Попередження та подолання негативних наслідків таких захворювань потребує активного залучення новітніх знань та розробок в області медицини і біології з метою вдосконалення існуючих на сьогодні лабораторно-діагностичних критеріїв оцінки як гострого, так і хронічного порушення мозкового кровопостачання та впровадження відповідних профілактичних заходів чи терапевтичних стратегій. Відтак існує нагальна потреба у нових інформативних показниках, які можуть бути застосовані під час диференційної діагностики.

Вирішення даних проблем значно ускладнюється за наявності в анамнезі хворих низки захворювань, патогенез яких впливає, а зачасти і визначає тяжкість прояву первинного інсульту чи виникнення повторних рецидивів. До таких захворювань відносять, зокрема, цукровий діабет 2 типу, метаболічні порушення за розвитку якого, створюють вагомні передумови для виникнення ускладнень на рівні функціонування серцево-судинної та нервової систем, окремих ланок системи гемостазу. Спричинені патогенезом цукрового діабету порушення вуглеводного та ліпідного обмінів займають особливе місце у маніфестації ішемічного інсульту, обумовлюючи посилення вираженості проявів захворювання, підвищуючи вірогідність його повторного виникнення у найближчі 10 років та призводячи до більшої летальності під час розвитку інсульту. Гіперглікемія, інсулінорезистентність та супутня гіперінсулінемія слугують основними механізмами, що прискорюють процеси пошкодження судинної стінки, розвиток атерогенезу, тромбофілічних станів, сприяючи таким чином високій летальності від серцево-судинних захворювань [3,4]. Захворюваність на ішемічний інсульт серед хворих на цукровий діабет 2 типу у середньому у 2-6 разів вища, ніж серед осіб, що не мають цукрового

діабету, при цьому смертність досягає 40%, тоді як для хворих лише з інсультом даний показник знаходиться у межах 12-15% [124].

Тому своєчасна та об'єктивна оцінка основних клінічних показників, визначення неврологічного статусу, рівня глікемії у гострій та постішемичний період є надзвичайно важливим і без перебільшення належить до питань, що визначають подальшу долю хворого.

З метою виявлення можливих відмінностей між групами пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, які б дозволили оцінити тяжкість наслідків перенесеного інсульту та попередньо встановити чи впливає наявність цукрового діабету на вираженість порушень за інсульту, було проаналізовано деякі загальні клініко-біохімічні показники у хворих обох дослідних груп.

Як бачимо з даних, наведених у таблиці 1.1, у групі пацієнтів з інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу відсоток осіб з ускладненнями, що асоційовані зі станом серцево-судинної системи, був вищим. Так, зокрема, у 34% обстежених було верифіковано ішемічну хворобу серця, у 17% - патології периферійних судин. Близько 74% пацієнтів страждали на артеріальну гіпертензію. Відповідно до робіт [125,126], тяжкість клінічних проявів інсульту при поєднанні цукрового діабету з артеріальною гіпертензією визначається наявністю попереднього асимптомного мультиінфарктного ураження мозку і лейкоареозу, обумовленого дрібними різночасними постгеморагічними і постішемічними вогнищами.

Наявність в анамнезі цукрового діабету 2 типу не впливала на середній вік, за якого у пацієнтів було зафіксовано ішемічний інсульт. Так, середній вік виникнення інсульту становив 76 років у групі пацієнтів без діабету та близько 74 роки для хворих з діабетом. Є низка досліджень, де автори показують, що у осіб похилого віку діабет зазвичай протікає більш стабільно і значну роль у розвитку цереброваскулярних патологій відіграють саме судинні фактори [127].

Також не було виявлено різниці між чоловіками і жінками у вірогідності розвитку ішемічного інсульту, хоча, відповідно до літератури, схильність до

виникнення інсульту у жінок, що страждають на цукровий діабет, є вищою у порівнянні з чоловіками.

Таблиця 3.1

Загально-клінічні показники пацієнтів з ішемічним інсультом окремо та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу

	Пацієнти з ішемічним інсультом, n=36	Пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету, n=24
Вік, роки (M±m)	76,2 ± 10,9	73,8 ± 9,7
Стать, чоловіки, %	50	35
Гіпертензія, %	70,3	73,9
Гіперліпідемія, %	31,2	47,8
Ішемічна хвороба серця, %	29,7	34,9
Ангіопатії периферійних судин, %	9,4	17,3
Сумарний бал за шкалою NIHSS (M±m)	9,9±0,5	12,2±1,0
Індекс Barthel на 7 добу після перенесеного інсульту (M±m)	66,4±2,6	57,3±5,9
Індекс маси тіла, кг/см ² (M±m)	20,26±1,6	34,01±5,48
Концентрація глюкози, ммоль/л (M±m)	4,9±1,34	9,47±2,65

Порівняння тяжкості неврологічної симптоматики пацієнтів у гострій період ішемічного інсульту, оцінене на основі сумарного балу по шкалі NIHSS, виявило більшу вираженість функціональних розладів у групі пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу – 12,2±1,0 балів у порівнянні з 9,9±0,5 для пацієнтів, які страждають виключно на ішемічний інсульт. Варто зазначити, що обидва показники знаходилися у межах значень (по шкалі NIHSS від 6 до 14 балів), що характеризують середню ступінь неврологічного дефіциту [http://manuals.sdc-eu.info/library/12_t2.pdf]. Також було визначено індекс Бартела, який дозволяє оцінити фізичну активність пацієнтів у повсякденному житті та свідчить про здатність самостійно здійснювати елементарні маніпуляції по самообслуговуванню.

Значення індексу Бартела було дещо нижчим у пацієнтів, які перенесли ішемічний інсульт на фоні цукрового діабету ($57,3 \pm 5,9$) у порівнянні зі значенням для пацієнтів лише з ішемічним інсультом ($66,4 \pm 2,6$), що вказує на більш виражені психомоторні порушення у даній групі хворих з діабетом.

Оскільки хворі на цукровий діабет 2 типу часто мають надлишкову вагу, також було проаналізовано індекс маси тіла (ІМТ) пацієнтів. Дана величина свідчить про відповідність маси тіла людини до її зросту і тим самим дозволяє непрямо оцінити, чи є вага нормальною чи надмірною. Як бачимо (табл.3.1) пацієнти з ішемічним інсультом окремо мали даний показник у межах нормальних значень ($20,26 \pm 1,60$ кг/м²), у той час як за наявності цукрового діабету величина ІМТ становила $34 \pm 5,47$ кг/м². За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я підвищення ІМТ до 30 кг/м² розцінюється як прояв ожиріння. Таким чином, значення ІМТ, визначене для пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, відповідає стану ожиріння першого ступеня [128]. Відтак, можна підсумувати, що пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету, характеризуються наявністю зайвої ваги. Тому при надходженні до стаціонару пацієнтів з первинними випадками ішемічного інсульту, у яких спостерігається тенденція до ожиріння, необхідно приділити особливу увагу оцінці їх глікемічного статусу та стану інсулінорезистентності.

На сьогодні встановлено взаємозв'язок між тяжкістю перебігу інсульту та підвищеним вмістом глюкози у крові. Згідно даних Міжнародного реєстру тромболізису при інсульті (SITS-ISTR), гіперглікемія незалежно асоційована з високою смертністю, низьким рівнем функціональної незалежності та зростанням частоти симптомних внутрішньо мозкових крововиливів [129]. Є низка даних, згідно яких рівень глюкози у сироватці крові безпосередньо корелює з розміром ділянок ураження кори головного мозку та тяжкістю прояву постінсультних ускладнень. Враховуючи представлені у літературі дані клінічних досліджень щодо впливу рівня сироваткової глюкози на тяжкість інсульту та здатність організму до відновлення після перенесеного інсульту та беручи до уваги, що більшість пацієнтів у групі з

цукровим діабетом страждають на надлишкову вагу, нами було проаналізовано концентрацію глюкози у пацієнтів об'єктів дослідних груп.

Незважаючи на той факт, що маніфестація гострих порушень мозкового кровопостачання часто супроводжується явищем так званої «стресової» гіперглікемії, пов'язаної з вивільненням кортизолу та норадреналіну, ми не виявили змін концентрації глюкози у крові пацієнтів з ішемічним інсультом окремо. Даний показник не відрізнявся від контрольних величин, у той час як у групі хворих з цукровим діабетом 2 типу концентрація глюкози складала $9,47 \pm 2,65$ ммоль/л, що перевищує верхню межу контрольних значень та свідчить про декомпенсованість перебігу базового захворювання.

Результатами чисельних досліджень підтверджено, що ступінь компенсації вуглеводного обміну під час патогенезу цукрового діабету є одним з визначальних факторів, які обумовлюють розвиток ускладнень за даного захворювання [130,131]. Несприятливий вплив гіперглікемії пов'язують з погіршенням стійкості тканин головного мозку до ішемії; посиленням анаеробного метаболізму глюкози, що призводить до зростання концентрації молочної кислоти та стимулює розвиток ацидозу. За умов довготривалої гіперглікемії спостерігається надлишкове утворення проміжних та кінцевих продуктів глікозилювання, зростання рівня АФК внаслідок активації альтернативних шляхів метаболізму глюкози та порушень у роботі електрон-транспортного ланцюга. Зазначені порушення як безпосередньо, так і опосередковано через залучення низки каскадів, призводять до індукції запальних процесів, обумовлюють пошкодження судинної стінки, розвиток ендотеліальної дисфункції та порушення кровоплину у судинах. Все вищеперераховане сприяє прискоренню клітинної загибелі та розширенню зони інфаркту мозку як у хворих з цукровим діабетом, так і у пацієнтів, у яких гіперглікемія була вперше діагностовано у гострій фазі інсульту. Негативний вплив гіперглікемії виявляється у більшій частоті геморагічної трансформації інфаркту, у тому числі і після тромболізу. Підвищений рівень глюкози у сироватці крові належить до визнаних маркерів тяжкості цереброваскулярної катастрофи [132].

У цілому, розвиток інсульту на фоні підвищеного вмісту глюкози слугує негативним прогностичним маркером, адже за гіперглікемії прояв існуючих ішемічних порушень ще більше посилюється. При цьому зростання відсотку летальних випадків та ускладнень інсульту може бути наслідком мікро- та макросудинних порушень раніше діагностованого латентного діабету. Мікросудинні порушення, що лежать в основі розвитку ретино-, нефро- та невропатій виявляються з більшою частотою та розвиваються дещо раніше, проте макросудинні ускладнення, такі як облітеруючі захворювання периферійних артерій, ішемічна хвороба серця, цереброваскулярні патології є однією з провідних причин смертності та первинної інвалідизації серед осіб з цукровим діабетом. На основі патолого-анатомічних даних доведено, що захворюваність на інсульт серед хворих на цукровий діабет 2 типу у 4-7 разів перевищує даний показник у загальній популяції. Вплив цукрового діабету виявляється на всіх трьох структурно-функціональних рівнях судинної системи мозку – магістральних артеріях, які є мішенню атеросклеротичного процесу; інтракраніальних перфоруємих судинах, які є об'єктом артеріальної гіпертензії; мікроциркуляторного русла, де розвиваються дисметаболічні процеси, особливо виражені за умов пошкодження гематоенцефалічного бар'єру.

Тому враховуючи негативний вплив гіперглікемії, особливо у гостру фазу ішемічного інсульту, на подальший перебіг захворювання та здатність організму до реабілітації, вкрай необхідним є постійний моніторинг рівня цукру не лише для хворих на цукровий діабет, а й для пацієнтів з ішемічним інсультом, але без даного захворювання.

З огляду на існування тісного метаболічного взаємозв'язку між порушеннями вуглеводного і ліпідного обмінів, а також враховуючи той факт, що зміни ліпідного профілю є одним з визначальних патогенетичних механізмів розвитку атеросклерозу [133] – основи більшості серцево-судинних захворювань, надалі було проаналізовано ліпідний спектр у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу.

У результаті проведених досліджень було виявлено відхилення значень досліджуваних показників ліпідного обміну від значень у групі умовно здорових донорів (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Ліпопротеїновий профіль у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу (M±m)

	Умовно здорові донори, n=35	Пацієнти з ішемічним інсультом, n=36	Пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету, n=24
Холестерол загальний, ммоль/л	4,4±0,5	4,2±0,5	6,4±0,5*#
Триацил-гліцероли, ммоль/л	1,5±0,3	1,6±0,3	1,8±0,3
ЛПВЩ, ммоль/л	1,7±0,3	1,7±0,3	1,3±0,3
ЛПНЩ, ммоль/л	2,6±0,5	3,8±0,5*	4,1±0,5*#
ЛПАТ, ммоль/л	3,3±0,5	4,3±0,5	5,2±0,5*#

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$; # статистично достовірно відносно показника у групі пацієнтів з ішемічним інсультом, $P \leq 0,05$

Обидва досліджувані патологічні стани характеризувалися подібною тенденцією змін показників ліпідного обміну, однак за цукрового діабету спостерігалися більш виражені порушення, що цілком узгоджується з описаним у літературі явищем діабетичної дисліпідемії.

У цілому характер змін свідчить про розвиток стану дисліпідемії, що слугує негативним прогностичним маркером та може сприяти прогресуванню порушень, спричинених розвитком ішемічного інсульту. Особливо це значимо для пацієнтів, що мають в анамнезі цукровий діабет, патогенез якого тісно асоційований зі змінами ліпідного обміну. Зростання концентрації ЛПНЩ було більш вираженим у пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, що у цілому не суперечить даними літератури, відповідно до яких концентрація ліпопротеїдів низької щільності у хворих на цукровий діабет 2 типу майже не відрізняється від такої у осіб без даного захворювання.

Було виявлено зниження концентрації ЛПВЩ, так званого «гарного холестеролу», що свідчить про підвищений ризик розвитку атеротромботичних явищ. Зниження концентрації ЛПВЩ було зафіксовано як у пацієнтів з ішемічним інсультом окремо, так і на фоні цукрового діабету. Зміни у концентрації ЛПВЩ можуть бути пов'язані з прискоренням їх катаболізму [134], що зазвичай має місце під час цукрового діабету 2 типу. За даного патологічного стану спостерігається посилення перенесення ефірів холестеролу з ЛПВЩ до ЛПДНЩ та хіломікронів в обмін на триацилгліцероли. Насичені триацилгліцеролами ЛПВЩ зазнають швидшого руйнування за участі печінкової протеїнліпази. З іншого боку, зниження концентрації ЛПВЩ може бути пов'язано зі зменшенням біодоступності аполіпропротеїну А1 (apoA1) – основного білку ЛПВЩ. За даними літератури, при цукровому діабеті 2 типу відбувається посилення катаболізму apoA1 [135], внаслідок відщеплення apoA1 від насичених тригліцерідами ЛПВЩ та подальшого його виведення нирками.

Більш інформативним показником схильності до розвитку серцево-судинних захворювань вважається рівень атерогенних ліпопротеїдів ЛПАт, концентрація яких, відповідно до результатів проведених досліджень, перевищувала показник для групи умовно здорових донорів для пацієнтів обох дослідних груп.

Варто підкреслити, що під час патогенезу цукрового діабету 2 типу може змінюватися не лише співвідношення між окремими фракціями ліпопротеїдів, але і

їх якісний склад, обумовлений, зокрема, неферментативним глікозилюванням молекул ліпопротеїдів, що суттєво впливає на властивості та метаболізм останніх. Так, глікозильовані ЛПНЩ погано розізнаються рецепторами печінки та повільніше виводяться із кровотоку, у той час як глікозилювання та окиснення ЛПВЩ знижує їх антиатерогенний потенціал та прискорює катаболізм.

Наслідком порушення обміну ліпопротеїдів є зростання кількості функціонально неповноцінних частинок ЛПВЩ та накопичення дрібних щільних часток ЛПНЩ – так званих ЛПНЩ фенотипу В, які характеризуються високою атерогенністю, пов'язаною з їх здатністю до окиснення, що особливо ускладнюється за умов прогресуючого оксидативного стресу, що зазвичай спостерігається під час патогенезу цукрового діабету 2 типу. Експериментально доведено, що для пацієнтів, у яких виявлено ЛПНЩ фенотипу В, ризик розвитку серцево-судинних захворювань підвищений втричі. Модифіковані ЛПНЩ залучаються у різні стадії розвитку запального процесу при атеросклерозі, вони виявляють виражені прозапальні і проатерогенні властивості – стимулюють синтез молекул адгезії, хемокінів, факторів росту, посилюють проліферацію гладком'язевих клітин і деградацію колагену [136,137]. На відміну від звичайних, модифіковані ЛПНЩ розпізнаються та поглинаються макрофагами з утворенням збагачених на холестерин «пінних клітин» [138]. Окрім того, пінні клітини секретують біологічно активні сполуки, включаючи хемотаксиси, мітогени, фактори росту, котрі викликають міграцію гладеньком'язевих клітин та фібробластів до інтими, їх проліферацію та утворення сполучної тканини. Малі розміри дрібних часток ЛПНЩ значно полегшують їх безпосереднє проникнення у судинну стінку через шар ендотелію, де вони здатні індукувати апоптоз гладком'язевих клітин, знижуючи, таким чином, їх вміст у складі атеросклеротичної бляшки.

Згідно сучасних уявлень, збільшення пулу атерогенних ліпопротеїдів є одним з факторів, що впливає на функціонування окремих ланок системи гемостазу. Так, їх зв'язування з тромбоцитарними рецепторами прискорює перетворення арахідонової кислоти та накопичення метаболітів, які сприяють підвищенню агрегаційної

здатності тромбоцитів. Протромбогенний ефект атерогенних фракцій ліпопротеїдів пов'язують з пригніченням фібринолізу внаслідок інгібування секреції ендотеліальними клітинами тканинного активатора плазміногену та стимуляції синтезу інгібітору активатора плазміногену 1 типу. У досліджах Vidal F. et al. (1998) показано здатність модифікованих ліпопротеїдів впливати на активність ендотеліальної NO-синтетази [139], що призводить до зниження продукції NO та, відповідно, посилення вазоконстрикції, а також адгезії і агрегації тромбоцитів, лейкоцитів до ендотеліальних клітин. За гіперліпідемії спостерігаються порушення на рівні коагуляційної ланки системи гемостазу, обумовлені активуючим впливом деяких фракцій ліпопротеїдів на фактор VII та посиленням, відповідно, продукції фібриногену [140].

Наслідком виявлених змін вмісту загального холестеролу, ліпопротеїнів низької щільності та атерогенних ліпопротеїнів є зростання індексу атерогенності, який згідно з нашими результатами був підвищений у пацієнтів з ішемічним інсультом окремо та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу.

Оскільки відомо, що атеросклероз судин головного мозку є причиною більшості випадків ішемічного інсульту, а порушення ліпідного обміну – визначений фактор ризику розвитку атеросклерозу, виявлені нами зміни ліпідного профілю у сироватці крові підтверджують даний факт для пацієнтів обох дослідних груп та слугують несприятливим прогностичним критерієм щодо прогнозу подальшого перебігу захворювання.

Узагальнюючи отримані нами результати, можемо стверджувати, що маніфестації інсульту у групі пацієнтів з цукровим діабетом передував період розвитку патологічних порушень метаболізму ліпопротеїдів, однією з ознак якого є певна дисліпідемія - зростання вмісту загального холестеролу, ліпопротеїнів низької щільності, триацилгліцеролів на фоні зниження концентрації ліпопротеїдів високої щільності. Зазначені порушення не лише відіграють певну роль під час розвитку захворювання, а й визначають особливості подальшого клінічного перебігу хвороби. Характерна дисліпідемія, відома як «атерогенний фенотип ліпопротеїнів», може

зберігатися навіть у пацієнтів з цукровим діабетом, які мають ефективний глікемічний контроль. За ішемічного інсульту зміни показників ліпопротеїнового спектру були значно менше виражені порівняно з результатами, отриманими при дослідженні сироватки крові пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу, що дозволяє зробити висновок про вплив обумовлених діабетом метаболічних порушень на прояв вищеописаних змін ліпідогам, які мають класичний атерогенний характер.

Для більш детальної оцінки загального стану пацієнтів з ішемічними інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу було визначено активність деяких маркерних ферментів, що широко використовуються у клінічній практиці для швидкої діагностики метаболічних порушень. Це, зокрема аспартатамінотрансфераза (АСТ, КФ 2.6.1.1) та аланінамінотрансфераза (АЛТ, КФ · 2.6.1.2) - ферменти з групи трансаміназ, що беруть участь у реакціях переамінування амінокислот.

Відповідно до результатів проведених досліджень, значних відхилень активності обох досліджуваних трансаміназ від середніх величин у групі умовно здорових донорів виявлено не було (табл.3.3). У випадку АЛТ було відмічено незначне зниження активності, більш виражену для пацієнтів з інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу. Подібні результати є цілком закономірними, враховуючи той факт, що розвиток цукрового діабету 2 типу може супроводжуватися дефіцитом вітаміну В6, активна форма якого – піридоксаль-5'-фосфат - є коферментом для амінотрансфераз [141].

У цілому, відсутність активності даного ферменту у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом можна розглядати як позитивний прогностичний маркер, що вказує на відсутність виражених порушень у роботі печінки. Збереження належної метаболічної активності печінки є вкрай важливим, враховуючи одну з провідних ролей даного органу у компенсації метаболічного ацидозу, який зазвичай має місце у перші дні розвитку ішемічного інсульту.

Біохімічні показники у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу (M±m)

	Умовно здорові донори, n=35	Пацієнти з ішемічним інсультом, n=36	Пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету, n=24
АЛТ, од/л	8,35±1,75	7,89±1,10	5,96±0,85*
АСТ, од/л	30,75±1,25	32,35±0,45	35,45±0,57*
ЛФ, од/л	111,65±6,45	120,87±8,75	104,65±7,50
ГГТ, од/л	21,23±2,05	19,15±2,56	24,55±2,78
Сечовина, ммоль/л	4,88±0,65	4,62±0,51	4,68±0,59
Креатинін, мкмоль/л	80,20±4,55	72,45±3,85*	66,05±3,80*,#

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$; # статистично достовірно відносно показника у групі пацієнтів з ішемічним інсультом, $P \leq 0,05$

Активність іншого ферменту – АСТ, статистично достовірно відрізнялася лише для групи пацієнтів з інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, при цьому було виявлено перевищення середнього показника у групі умовно здорових донорів лише на 15%.

Важливим критерієм діагностики функціонального стану організму є визначення активності гамма-глутамілтранспептидази (ГГТ, КФ 2.3.2.2.) – ферменту, що бере участь в обміні амінокислот, каталізуючи перенесення γ -глутамінового залишку з пептиду (зазвичай глутатіону) на амінокислоту чи інший пептид. У результаті проведених досліджень (табл. 3.3) було виявлено різнонаправлені зміни активності ферменту - незначне зниження у групі пацієнтів з ішемічним інсультом та підвищення у групі пацієнтів з інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу. Однак слід відмітити, що активність ГГТ у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу була майже на 20% вищою у порівнянні з результатами,

отриманими для пацієнтів лише з ішемічним інсультом. Оскільки підвищення активності ГГТ спостерігається при ураженнях гепатобіліарної системи, зокрема, є одним з маркерів розвитку холестазу, виявлене нами зростання активності даного ферменту у пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу за відсутності змін активності ферменту у групі пацієнтів з ІІ може свідчити про обумовлені діабетом порушення жовчоутворювальної та жовчовидільної функції печінки [142]. Окрім того, існують дані про прямий зв'язок між активністю ГГТ у сироватці крові та підвищеним індексом маси тіла, дисліпідемією, артеріальною гіпертензією та цукровим діабетом [143]. Показано зв'язок між зростанням активності сироваткової ГГТ та розвитком ряду кардіоваскулярних захворювань, у тому числі і гіпертонії, інсульту та інфаркту міокарда.

У ході проведених досліджень статистично достовірних змін активності лужної фосфатази (ЛФ, КФ 3.1.3.1) виявлено не було, хоча, з огляду на одержані результати, можемо говорити про незначну тенденцію до зростання активності даного ферменту у групі пацієнтів з ішемічним інсультом у порівнянні з аналогічним показником у групі пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу. Подібні дані цілком узгоджуються з інформацією, відповідно до якої, зростання активності ЛФ спостерігається у більш віддалені терміни після перенесеного інсульту та корелює із тяжкістю перебігу захворювання [144]. Незначна тенденція до зниження активності досліджуваного ферменту може бути обумовлена недостатністю вітамінів В12 і В6, яка часто спостерігається у хворих з ожирінням.

З огляду на виявлене коливання активності трансаміназ, було оцінено вміст сечовини як кінцевого продукту фіксації аміаку та індикатора функціональної активності нирок, у сироватці крові пацієнтів з інсультом окремо та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу. Порівняння даного показника для пацієнтів обох дослідних груп не виявило статистично достовірних змін ні по відношенню до значень у групі умовно здорових донорів, ні при порівнянні груп між собою. Зокрема, концентрація сечовини у групі умовно здорових донорів складала

4,88±0,65 ммоль/л, а при ішемічному інсульті та інсульті, ускладненому цукровим діабетом 2 типу, даний показник становив, відповідно, 4,62±0,51 ммоль/л та 4,68±0,59 ммоль/л.

Ще одним метаболітом обміну білків, що синтезується у м'язах та виводиться нирками, є креатинін. Нами було виявлено тенденцію до зниження концентрації креатиніну як у групі пацієнтів з ішемічним інсультом, так і у пацієнтів з інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу. Визначення концентрації креатиніну у сироватці крові дозволяє оцінити функціональний стан нирок та використовується для діагностики порушень у їх роботі, зокрема, для виявлення діабетичної нефропатії [145], тому відсутність достовірних змін концентрації креатиніну у сироватці крові пацієнтів з цукровим діабетом є позитивним прогностичним фактором, особливо враховуючи частоту розвитку нефропатій у хворих на цукровий діабет.

Порушення за розвитку ішемічного інсульту безпосередньо пов'язані зі змінами фізико-хімічних властивостей крові, у тому числі і порушенням електролітного балансу. Зниження швидкості мозкового кровоплину та подальша гіпоксія обумовлюють низку метаболічних зрушень, наслідком яких є зниження енергопостачання нейронів внаслідок переключення на анаеробний шлях метаболізму глюкози та синтезу АТФ. Подібні перебудови лише частково компенсують енергетичні потреби мозку, проте призводять до значних порушень клітинного гомеостазу за умов їх довготривалості. До найбільш енергозалежних клітинних ферментів належить Na^+/K^+ -АТФаза, яка, забезпечуючи перенесення іонів проти градієнту їх концентрації, підтримує належний рівень трансмембранного потенціалу – показника, надзвичайно важливого для функціонування у першу чергу нервових клітин. Пригнічення активності Na^+/K^+ -АТФази внаслідок дефіциту АТФ може призводити до надлишкового надходження до цитоплазми іонів Na^+ та Ca^{2+} , що обумовлює зміну поляризації плазматичної мембрани та, відповідно, впливає на здатність нейронів проводити нервовий імпульс. Порушення іонного гомеостазу, як правило, супроводжується набуханням

клітин і сприяє розвиток набряку тканин головного мозку, вираженість якого знаходиться у прямій залежності від розміру ділянки мозкового інфаркту.

Враховуючи вищевикладене, нами було проаналізовано концентрацію іонів K^+ , Na^+ та Cl^- у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом (табл.3.4).

Таблиця 3.4

Концентрація іонів у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом окремо та на фоні цукрового діабету 2 типу ($M \pm m$)

	Умовно здорові донори, n=35	Пацієнти з ішемічним інсультом, n=36	Пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету, n=24
K^+	4,5±0,99	3,31±0,3	3,35±0,3
Na^+	143,6±13,05	160,3±10,7	173,5±9,5*
Cl^-	101,9±6,9	89,2±4,3*	93,2±4,5

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$

У результаті проведених досліджень було виявлено незначне зниження концентрації іонів K^+ у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, яка складала у середньому $3,3 \pm 0,33$ ммоль/л для обох дослідних груп, що у цілому є несприятливим прогнозом. Дані епідеміологічних та клінічних досліджень підтверджують роль дефіциту калію у патогенезі есенціальної артеріальної гіпертензії. Калій є одним з основних внутрішньоклітинних катіонів, концентрація якого у сироватці крові у нормі становить 3,5-5,5 ммоль/л, а в середині клітини – близько 150 ммоль/л. Така значна різниця підтримується саме завдяки роботі Na^+/K^+ -АТФази, тому виявлене нами зниження концентрації даного іону може бути пов'язано саме з порушенням у функціонуванні ферменту. Слід додати, що хворі на цукровий діабет перебувають у групі ризику щодо розвитку гіпокаліємії. Остання може бути діагностована у разі, якщо концентрація K^+ у сироватці крові є нижчою 3,6 ммоль/л [146].

При визначенні концентрації іонів Na^+ було виявлено тенденцію до її зростання у групі пацієнтів з ішемічним інсультом та достовірне підвищення у групі пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу. Так, у пацієнтів з ішемічним інсультом концентрація іонів натрію перевищувала показник у групі умовно здорових донорів на 10%, у той час як концентрація іонів Na^+ у крові пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету, була вища контрольних величин на 20%. Разом з іонами K^+ іонам Na^+ притаманні ряд функцій, важливих для підтримання та забезпечення гомеостазу, зокрема, створення умов для формування мембранного потенціалу, підтримання осмотичного, кислотного-лужного та водного балансу організму, забезпечення мембранного транспорту та активація ензимів [147].

Виявлене нами підвищення концентрації іонів Na^+ за умов ішемічного інсульту може опосередковано свідчити про загибель частини клітин нейроглії. Відомо, що порушення іонного гомеостазу, зокрема, концентрації іонів Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- у поза- та внутрішньоклітинному середовищі, спричиняє масову анокисичну деполяризацію мембран, яка на сьогодні вважається основним критерієм необоротного пошкодження клітин. Наслідком змін різниці потенціалів є вивільнення у синаптичну щілину ряду нейромедіаторів, зокрема, глутамату, який опосередковує весь спектр відповіді нейронів на різноманітні стимули. Варто підкреслити, що вивільнення глутамату відбувається на фоні пригнічення його зворотного захоплення, що призводить до розвитку явища глутаматної ексайтотоксичності (від англ. to excite - збуджувати) [148]. Активація за участі даного медіатора іонотропних NMDA-рецепторів сприяє додатковому надходженню до клітини іонів Ca^{2+} та спричиняє обумовлене Ca^{2+} /кальмодулін-залежними ферментами (фосфоліпазами, протеїнкіназами, ендонуклеазами) множинне ушкодження макромолекул, порушення цілісності клітинних мембран і, у кінцевому результаті, реалізацію механізмів некротичної чи програмованої загибелі нейронів. У ряді досліджень було показано, що посилення вивільнення глутамату під час

моделювання фокальної ішемії на кривих та мишах у перші хвилини є триггером розвитку уражень центральної кори з подальшим неврологічним дефіцитом.

Не дивлячись, на виявлену нами тенденцію до гіпокаліємії та гіпернатріємії, дослідження щодо іонів Cl^- показали певне зниження концентрації даного аніону. При цьому більш виражене відхилення від контрольних значень було зафіксовано за умов ішемічного інсульту. Так, концентрація іонів Cl^- у сироватці крові пацієнтів з ішемічними інсультами складала $89,2 \pm 4,3$ ммоль/л у порівнянні з $93,2 \pm 4,5$ ммоль/л виявленим для пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, при значенні контролю $101,9 \pm 6,9$ ммоль/л.

Таким чином, нами було виявлено тенденцію до зростання концентрації іонів Na^+ на фоні зниження концентрації іонів K^+ та Cl^- у сироватці крові пацієнтів як з ішемічними інсультами, так і інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу.

Підсумовуючи результати даного етапу досліджень, можемо зробити висновок, що для пацієнтів обох дослідних груп був притаманний певний спектр метаболічних порушень, які належать до загальновизнаних факторів ризику розвитку інсульту, особливо характерні для пацієнтів з цукровим діабетом. Також було виявлено низку відхилень, спричинених як безпосередньо постінсультними порушеннями, так і обумовлених патогенезом базового захворювання у випадку пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу. Дані зміни за відсутності своєчасних та відповідних терапевтичних заходів можуть слугувати підґрунтям для виникнення рецидивів.

РОЗДІЛ 4

Загальна характеристика окремих ланок системи гемостазу у пацієнтів з ішемічним інсультом та пацієнтів, що хворіли на цукровий діабет 2 типу

Серед ключових чинників, що обумовлюють первинну маніфестацію ішемічного інсульту та слугують вагомими патогенетичним механізмом виникнення рецидивів хвороби, є порушення на рівні функціонування окремих ланок системи гемостазу. Незважаючи на значну кількість робіт, присвячених дослідженню стану системи гемостазу у пацієнтів з інсультом, для багатьох хворих причини інсульту залишаються до кінця нез'ясованими. У літературі зустрічаються суперечливі дані щодо змін вмісту та функціональної активності компонентів системи гемостазу як у гостру фазу прояву хвороби, так і у постінсультний період. У результаті неоднорідності факторів ризику та етіології, які значно варіюють у залежності від віку, статі, загального фізіологічного стану пацієнтів, патофізіологія даного захворювання важко піддається деталізації та опису. Зазвичай, інсульт виникає як наслідок ускладнення вже існуючого одного чи декількох супутніх захворювань, які входять до групи «факторів ризику». Таким загально визнаним незалежним чинником виникнення інсульту є цукровий діабет, патогенез якого тісно асоційований з багатьма порушеннями, які традиційно розглядаються як передумови виникнення інсульту. Встановленим є факт, що цукровий діабет є протромбогенним станом, який пов'язаний з високим ризиком розвитку серцево-судинних патологій. Оскільки патогенез цереброваскулярних порушень як незалежно, так і за цукрового діабету, протікає із залученням порушень на рівні всіх трьох ланок системи гемостазу [5], детальна оцінка стану системи гемостазу і, першочергово, у хворих на цукровий діабет, є важливою та необхідною умовою профілактики розвитку серцево-судинних ускладнень, а отже і інсульту.

Тому на наступному етапі роботи було проведено порівняльний аналіз показників, що характеризують судинно-тромбоцитарний, плазменно-коагуляційний гемостаз та дозволяють оцінити загальний стан фібринолітичної системи у

пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу.

У клініко-лабораторній практиці для попередньої діагностики стану плазменно-коагуляційного гемостазу використовують ряд хронометричних тестів, зокрема, визначення протромбінового часу, активованого часткового тромбoplastинового часу, тромбінового часу та анцистронового часу. Скорочення часу зсідання плазми крові хоча б в одному із зазначених тестів може свідчити про потенційну можливість розвитку тромбофілії.

Для оцінки внеску внутрішнього та зовнішнього шляхів згортання крові під час розвитку ішемічного інсульту нами було визначено час зсідання плазми, відповідно, у тесті «активованій частково тромбoplastиновий час» (АЧТЧ) та тесті «протромбіновий час» (ПЧ) у групі пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу.

Тест АЧТЧ є досить інформативним та широко розповсюдженим скринінговим тестом, що відображає зміни активності факторів внутрішнього шляху згортання крові та порушення прокоагулянтно-антикоагулянтного балансу. Пригнічення часу зсідання плазми крові у даному тесті спостерігається при активації прокоагулянтної ланки системи гемостазу, у той час як подовження АЧТЧ вказує на дефіцит та аномалії факторів зсідання крові, а також на наявність у кровотоці антикоагулянтів, антифосфоліпідних антитіл чи продуктів деградації фібриногену/фібрину.

Нами було виявлено подовження часу зсідання крові у тесті АЧТЧ як для пацієнтів з ішемічними інсультом, так і для пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу (табл.4.1). Показник АЧТЧ перевищував верхню межу значень контролю (28,5-31,5 с) для 84% пацієнтів з ішемічним інсультом та для 100% пацієнтів з інсультом на фоні діабету.

Також було виявлено, що за розвитку ішемічного інсульту має місце подовження часу зсідання плазми крові у тесті «протромбіновий час», що модулює зовнішній шлях зсідання крові – основний механізм тромбогенезу у судинному руслі. У межах групи пацієнтів з ішемічним інсультом було виявлено три підгрупи,

що різнилися за показником даного тесту – у 73% пацієнтів було зафіксовано подовження часу зсідання плазми крові, для 20% час зсідання плазми знаходився у межах контрольних величин і лише для 7% пацієнтів даний показник був пониженим. За ішемічного інсульту на фоні цукрового діабету також спостерігалась неоднорідність показників даного хронометричного тесту – 41% хворих мали даний показник на рівні контролю, решта 59% пацієнтів характеризувалися значним подовженням часу зсідання плазми крові. Подовження ПЧ у групі пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету може бути пов'язано з порушенням синтезу вітамін К-залежних факторів (II, VII, X), задіяних у реалізації зовнішнього шляху, адже існують дані про дефіцит вітаміну К у хворих з довготривалим декомпенсованим цукровим діабетом.

Результати проведених скринінгових тестів у цілому не співпадають з існуючими на сьогодні уявленнями щодо підвищення прокоагулянтного потенціалу за розвитку ішемічного інсульту. Також є низка робіт [5,149], де показано, що для патогенезу цукрового діабету, зокрема, 2 типу, також характерний протромбогенний напрямок змін системи гемостазу та порушення фібринолізу, що значно підвищує ризик розвитку серцево-судинних захворювань. Так, у хворих на цукровий діабет виявлено зміни концентрації тканинного фактору (ТФ), зокрема, показано асоційоване зі стадією діабетичної ретинопатії підвищення його рівня у плазмі, водяній рідині камер ока, що дозволило авторам зробити висновок про можливу участь ТФ у розвитку та прогресуванні діабетичної ретинопатії. Є роботи, де показано підвищення концентрації фактору VIII (антигемофільного фактору А) та виявлено кореляцію між його вмістом та стадією цукрового діабету [150].

Серед найбільш вірогідних причин подовження показників часу зсідання плазми у тестах АЧТЧ та ПЧ може бути проведення пацієнтам під час надходження до стаціонару антитромботичної терапії, адже показники обох хронометричних тестів є досить чутливими до наявності укротоці антикоагулянтів.

Таблиця 4.1

Показники хронометричних тестів для пацієнтів з ішемічним інсультом окремо та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу (M±m)

Дослідні групи	АЧТЧ, с	ПЧ, с	ТЧ, с	АЧ, с
Умовно здорові донори, n=35	29±5	15±3	9±2	17±1
Пацієнти з ішемічним інсультом, n=36	46±5*	19±2	18±2*	13±2*
Пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету, n=24	50±5*	20±3	19±3*	10±3*

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$

Кінцевим етапом каскаду згортання крові є перетворення фібриногену за участі тромбіну у фібрин - ключову молекулу, що формує волокнисту основу тромбу. Тому далі було оцінено показники зсідання плазми крові у тесті «тромбіновий час» (ТЧ), який, власне, і характеризує процес перетворення фібриногену. Даний метод ґрунтується на здатності екзогенного тромбіну індукувати процес перетворення фібриногену у фібрин без участі інших факторів згортання крові. Відповідно до одержаних нами результатів, для 100% пацієнтів як з ішемічним інсультом, так і інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, тромбіновий час зсідання плазми крові вірогідно перевищував верхню межу контрольних значень.

Оскільки час зсідання плазми крові у тесті «тромбіновий час» практично не залежить від присутності продуктів деградації фібриногену/фібрину, але значно подовжується за наявності інгібіторів факторів зсідання крові, виявлене нами подовження часу зсідання плазми подібно до попередніх тестів також може бути результатом застосування антикоагулянтних препаратів.

Враховуючи результати трьох основних клінічних тестів на заключному етапі коагулометричного дослідження нами було визначено анцистроновий (рептилазний) час зсідання плазми крові. У даному методі застосовується анцистрон, який

належить до тромбіноподібних ферментів, що одержують з отрути щитомордника звичайного (*Agkistrodon halys halys*). На відміну від тромбіну, на анцистрон не впливають фізіологічні інгібітори, а отже його застосування є виправданим у випадку наявності у кровотоці антикоагулянтів.

З огляду на одержані результати можемо стверджувати, що саме тест «анцистроновий час» виявився найбільш інформативним для виявлення характеру порушень коагуляційної ланки системи гемостазу. При проведенні даного тесту у кожній дослідній групі було виявлено три підгрупи, що різнилися за показниками часу зсідання плазми. Так, для 59% хворих у групі з ішемічним інсультом та для 48% у групі з інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу показники значень анцистронового часу були нижче контролю; близько 25% та 22% пацієнтів характеризувалися подовженням часу зсідання плазми крові у даному тесті. У межах контрольних величин знаходилися показники для 15% пацієнтів з ішемічним інсультом та для 29% з інсультом на фоні діабету. Таким чином, виявлене нами скорочення часу зсідання плазми крові у тесті «анцистроновий час» свідчить про підвищену схильність до розвитку тромбофілії, характерну для більшості пацієнтів обох дослідних груп.

Як вже зазначалося, визначальна роль у каскаді зсідання крові належить фактору X, який інтегрує внутрішній та зовнішній шляхи активації системи зсідання крові. Оскільки визначення активності фактору X проводили з використанням відповідного хромогенного субстрату, це дозволило не брати до уваги вплив антикоагулянтної терапії на прояв активності досліджуваного фактору. У ході проведених досліджень було виявлено зростання активності фактору X_a у групах пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу (рис. 4.1). Даний показник на 27% перевищував значення контролю у групі пацієнтів з ішемічним інсультом та на 34% у групі хворих з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету.

Більш виражені зміни, виявлені за інсульту, ускладненого цукровим діабетом, опосередковано можуть свідчати про підвищений прокоагулянтний потенціал

хворих з діабетом, що обумовлено каскадом патофізіологічних реакцій та метаболічних порушень за патогенезу цукрового діабету. Зокрема характерна для цукрового діабету генералізація запального процесу може слугувати додатковим фактором, що впливає на функціональний стан системи гемостазу. Так, активація моноцитів, індукована накопиченням прозапальних медіаторів, призводить до експонування на їх поверхні адгезивних білків, у тому числі і інтегринів $\alpha M\beta 2$, які поряд з іншими білками здатні зв'язувати фактор X. Далі, катепсин G, що вивільняється з активованих лейкоцитів, викликає обмежений протеоліз фактору X, перетворюючи його у активну форму [24].

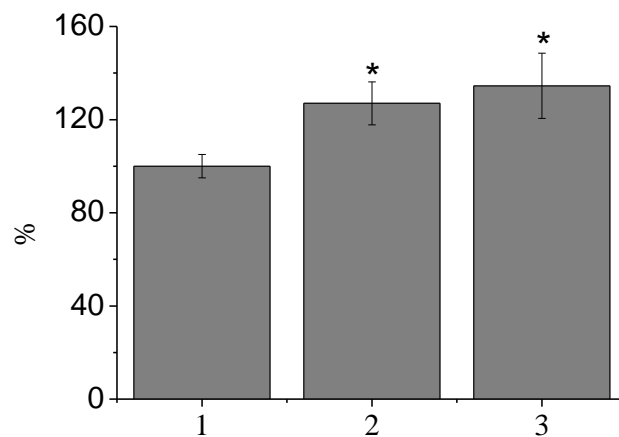


Рис. 4.1. Відносна активність фактору X у плазмі крові пацієнтів:

1 – умовно здорові донори, n=35;

2 – пацієнти з ішемічним інсультом, n=54;

3 – пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, n=15

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$

Процес перетворення протромбіну у тромбін може супроводжуватися накопиченням у плазмі крові низки продуктів його активації [151,152]. Окрім того, активний тромбін також здатен розщеплювати молекулу протромбіну з утворенням проміжних похідних, частина з яких є фізіологічно неактивними. Накопичення

протромбіну та його продуктів, так званий протромбіновий пул, може свідчити про існування тромботичної загрози, а рівень протромбінового пулу дозволяє опосередковано зробити висновок про ступінь активації системи згортання крові. Тому нами було оцінено рівень протромбінового пулу за розвитку ішемічного інсульту.

Відповідно до одержаних результатів (рис.4.2), за ішемічного інсульту безпосередньо та ішемічного інсульту, ускладненого цукровим діабетом 2 типу, спостерігалось зростання рівня протромбінового пулу, що відповідно до вищеописаного слугує додатковим підтвердженням факту розвитку протромботичного стану у пацієнтів обох дослідних груп. Так, рівень протромбінового пулу у групі пацієнтів з ішемічним інсультом вірогідно перевищував контрольний показник на 12%. У групі хворих з інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, даний показник перевищував значення у групі умовно здорових донорів на 23%.

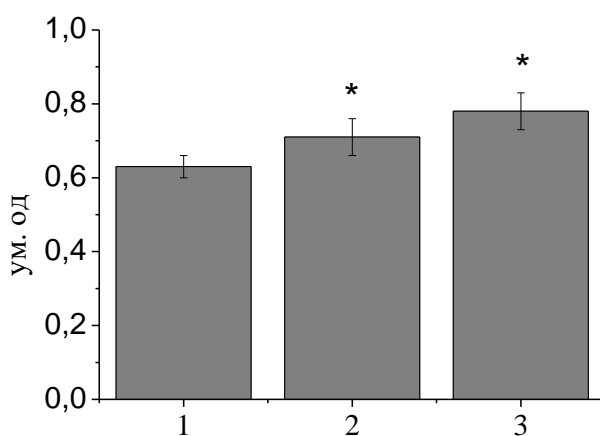


Рис. 4.2. Відносний рівень протромбінового пулу у плазмі крові пацієнтів:

1 – умовно здорові донори, n=35;

2 – пацієнти з ішемічним інсультом, n=61;

3 – пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, n=24

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$

Варто зазначити, що один з проміжних продуктів перетворення протромбіну - мезотромбін - здатен впливати на тромбоцитарну ланку гемостазу [152]. Викликаючи вторинну необоротну агрегацію тромбоцитів мезотромбін сприяє залученню нових тромбоцитів у формування тромбу. Мезотромбін здатен активувати фактори V, VIII, XIII та каталізувати перетворення фібриногену у нерозчинний фібрин, що сприяє формуванню і стабілізації фібринового згустку. З огляду на той факт, що мезотромбін виявляє як про-, так і антикоагулянтними властивостями, які визначаються ступенем насичення молекули іонами Na^+ , виявлена нами на попередніх етапах роботи певна гіпернатріємія обумовлює прояв переважно прокоагулянтної активності мезотромбіну.

Підвищення концентрації іонів Na^+ може безпосередньо впливати і на функціонування тромбіну, оскільки тромбін належить до Na^+ -залежних алостеричних ферментів. За підвищених концентрацій іонів Na^+ відбувається порушення співвідношення між так званою швидкою та повільною формами тромбіну. Спричинені взаємодією з натрієм, конфірмаційні перебудови у молекулі ферменту, обумовлюють утворення швидкої форми, яка характеризується вищою специфічністю та здатна розщеплювати фібриноген з більшою швидкістю, у той час як повільна форма тромбіну виявляє специфічність до протеїну С [24]. Активованій тромбіном протеїн С зв'язує інгібітор активатора плазміногену (ПАІ-1) і таким чином стимулює фібриноліз.

Одним з ключових компонентів системи зсідання крові є фібриноген. Його концентрація у плазмі крові розглядається як важливий прогностичний показник патогенезу багатьох патологічних станів, асоційованих з порушеннями системи гемостазу. За результатами низки епідеміологічних досліджень було встановлено високий ступінь кореляції між вмістом фібриногену та ризиком виникнення тромботичних ускладнень, оскільки фаза фібриноутворення є визначальною під час розвитку тромбозів. Концентрація фібриногену експоненціально пов'язана з в'язкістю крові, визначає процес агрегації тромбоцитів, еритроцитів та впливає на адгезію лейкоцитів.

Тому на наступному етапі роботи було проаналізовано концентрацію фібриногену у плазмі крові пацієнтів з ішемічним інсультом безпосередньо та на фоні цукрового діабету 2 типу. У результаті проведених досліджень було виявлено однонаправлені та статистично достовірні зміни концентрації фібриногену (рис.4.3).

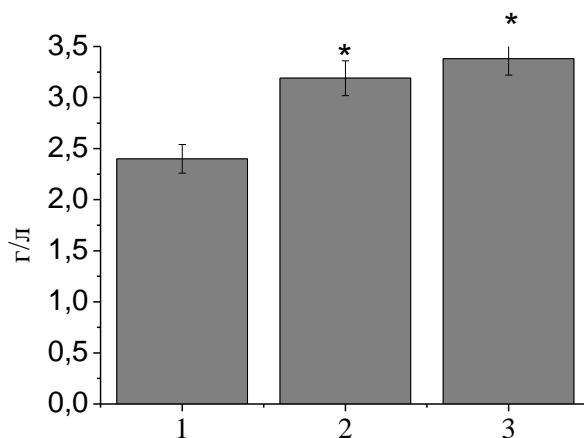


Рис. 4.3. Концентрація фібриногену у плазмі крові пацієнтів:

1 – умовно здорові донори, n=35;

2 – пацієнти з ішемічним інсультом, n=60;

3 – пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, n=24

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$

Так, концентрація фібриногену у групі пацієнтів з ішемічним інсультом складала $3,19 \pm 0,16$ г/л, що на 33% перевищувало контрольний показник, у той час як у групі пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, зміни концентрації фібриногену були більш значними та на 40% перевищували значення норми.

Подібні результати цілком узгоджуються з інформацією, наведеною у літературі, відповідно до якої у хворих на цукровий діабет 2 типу спостерігається підвищений рівень фібриногену, який зростає із тривалістю захворювання та безпосередньо корелює з наявністю судинних ускладнень [153,154]. Зміни вмісту

фібриногену за розвитку цукрового діабету обумовлені поєднанням низки чинників, зокрема, посиленням його синтезу у печінці у відповідь на тривалу гіперінсулінемію. Окрім того, за умов гіперглікемії відмічається скорочення періоду напіврозпаду фібриногену, що також сприяє накопиченню молекул останнього у кровотоці.

Варто зазначити, що фібриноген є не лише важливим компонентом системи зсідання крові, а й одним з «білків гострої фази», синтез яких посилюється при запальних процесах, стресових ситуаціях, інфекційних захворюваннях, травмах. З огляду на це, виявлена нами певна гіперфібриногенемія за умов цукрового діабету може бути свідченням хронічного підгострого системного запалення, яке зазвичай має місце у хворих на цукровий діабет 2 типу, особливо у осіб з надлишковою вагою. Один з механізмів, що обумовлює зв'язок між концентрацією фібриногену та запальним процесом, реалізується через зростання концентрації прозапального цитокіну інтерлейкіну-6 внаслідок посилення його синтезу ендотеліоцитами та/чи адипоцитами зростаючої маси вісцеральної жирової тканини [155] у випадку наявності у пацієнтів з цукровим діабетом ожиріння.

Підвищена концентрація фібриногену у пацієнтів з ішемічним інсультом, за відсутності цукрового діабету 2 типу чи інших метаболічних розладів, окрім свідчення наявності певного запального процесу, може свідчити про ураження судинної стінки, адже відомо, що зростання рівня фібриногену є раннім маркером пошкодження ендотеліальних клітин. Одержані нами результати узгоджуються з даними низки досліджень щодо зростання концентрації фібриногену за ішемічного інсульту [156,157].

Зростання рівня фібриногену є прогностично несприятливим фактором. Відповідно до даних, одержаних у рамках дослідницьких програм PROCAM (the Prospective Cardiovascular Munster), PRIME (the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction), Framingham study, Northwick Park Heart рівень фібриногену безпосередньо корелює з ризиком розвитку ішемічного інсульту та ішемічної хвороби серця. Точні механізми реалізації подібного ефекту фібриногену на

сьогодні достеменно не з'ясовані, проте це може бути пов'язано з підвищенням в'язкості крові, посиленням агрегаційної здатності тромбоцитів та еритроцитів, стимуляцією проліферації ендотеліальних і гладеньком'язових клітин. Підвищення концентрації фібриногену також є фактором активації ендотеліальних клітин, що призводить до експресії та/або активації адгезивних молекул, інтегринів, серед яких є і рецептори фібриногену. Ці зміни призводять до судинної дисфункції і посилюють мікроциркуляторні ускладнення, які супроводжують цереброваскулярні захворювання.

З огляду на протромбогенну спрямованість виявлених нами змін показників системи гемостазу, далі було проаналізовано концентрацію розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК), які належать до ранніх та діагностично значимих маркерів тромбонемії [158,159]. РФМК це високомолекулярні комплекси мономерного фібрину з фібриногеном та з продуктами їх деградації, що утворюються як проміжні сполуки під час трансформації фібриногену у фібрин. РФМК відсутні у кровотоці за фізіологічної норми проте з'являються ще на ранніх доклінічних стадіях перебігу захворювання.

Як бачимо з даних, наведених на рис.4.4, пацієнти обох дослідних груп характеризуються накопиченням у плазмі крові РФМК, більш вираженим для хворих з цукровим діабетом. Також було виявлено статистично достовірну різницю між концентрацією РФМК у пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу. Так, концентрація РФМК у групі пацієнтів з ішемічним інсультом була визначена на рівні $3,88 \pm 0,05$ г/л. Для хворих з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, даний показник був дещо вищим і становив відповідно $4,20 \pm 0,13$ г/л, а отже їх поява однозначно вказує на активацію системи зсідання крові

Одержані нами результати щодо зростання концентрації РФМК на фоні накопичення похідних протромбіну є свідченням активації протромбіну, що за умови підвищеного рівня фібриногену створює належні передумови для ескалації процесу згортання крові. Варто зазначити, що підвищення концентрації РФМК у пацієнтів

обох дослідних груп може не лише вказувати на активацію процесів внутрішньосудинного згортання крові, а й бути свідченням порушення динамічної рівноваги між функціонуванням системи згортання крові та фібринолізом.

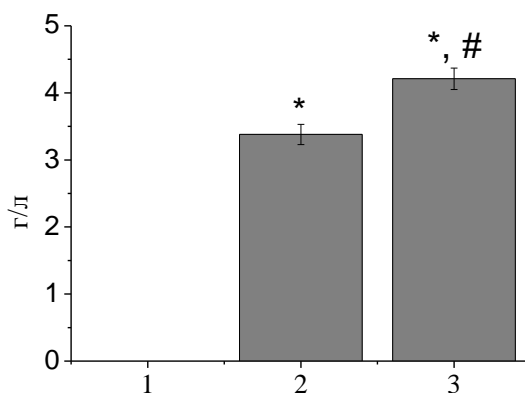


Рис. 4.4. Концентрація розчинних фібрин мономерних комплексів у плазмі крові пацієнтів:

1 – умовно здорові донори, n=35;

2 – пацієнти з ішемічним інсультом, n=86;

3 – пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, n=34

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$; # статистично достовірно відносно показника у групі пацієнтів з ішемічним інсультом, $P \leq 0,05$

Таким чином, на підставі проведених досліджень можемо зробити висновок про протромботичну спрямованість реакцій у системі гемостазу хворих з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу. Свідченням даних змін є активізація процесів перетворення протромбіну у тромбін, опосередковано підтверджена зростанням активності фактору X та накопиченням похідних протромбіну, а також підвищення концентрації фібриногену та концентрації РФМК.

Відомо, що контроль перебігу та інтенсивності процесів згортання плазми крові реалізується за участі системи антикоагуляції. Дана система включає низку білків, що виявляють свій ефект на різних рівнях функціонування коагуляційного

каскаду, забезпечуючи, таким чином підтримання тонкого балансу, необхідного для злагодженої роботи системи гемостазу. До ключових компонентів фізіологічного механізму антикоагуляції належить протеїн С (КФ.3.4.21.69), активація якого значно зростає у відповідь на дію тромботичних стимулів. Протеїн С гальмує перетворення протромбіну на тромбін і, відповідно, утворення фібрину. На відміну від інгібіторів тромбіну, безпосередньо діючих на молекулу ферменту, протеїн С шляхом обмеженого протеолізу неферментативних кофакторів Va та VIIIa вилучає останні з реакції і тим самим інгібує утворення активного фактору Ха та, відповідно, тромбіну. Активованій протеїн С не лише пригнічує процеси згортання крові, але й зв'язуючи інгібітор активатору плазміногену ПАІ-1 сприяє підвищенню фібринолітичного потенціалу. Тому для з'ясування можливих причин виявленої нами активації процесів згортання на наступному етапі дослідження було визначено активність протеїну С.

Як бачимо з даних, представлених на рис.4.5, зміни у прокоагулянтній ланці системи гемостазу відбуваються на фоні значного зниження активності протеїну С.

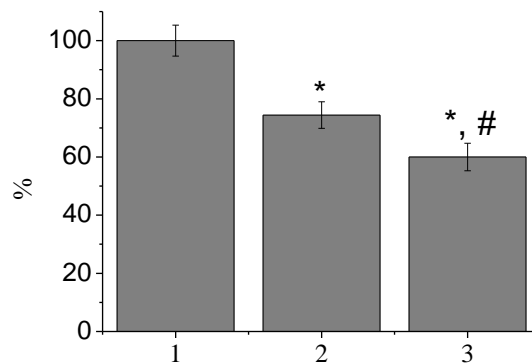


Рис. 4.5. Відносна активність протеїну С у плазмі крові пацієнтів:

1 – умовно здорові донори, n=35;

2 – пацієнти з ішемічним інсультом, n=48;

3 – пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, n=26

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$; # статистично достовірно відносно показника у групі пацієнтів з ішемічним інсультом, $P \leq 0,05$

Так, за ішемічного інсульту активність протеїну С була знижена на 25%. За ішемічного інсульту на фоні цукрового діабету 2 типу, спостерігається більш значне пригнічення активності протеїну С, яка у даному випадку становила 60% від значень у групі умовно здорових донорів.

Оскільки антитромботичний потенціал плазми крові на порядок перевищує потенціал системи згортання, виявлене нами пригнічення активності протеїну С у пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу є однозначним свідченням виснаження антикоагуляційного резерву за даних патологічних станів.

Узагальнюючи наведені дані можемо зробити висновок, що розвиток ішемічного інсульту та інсульту на фоні цукрового діабету 2 типу, характеризується зсувом прокоагулянтно-антикоагулянтного балансу у бік домінування прокоагулянтних реакцій, більш виражених на фоні метаболічних ускладнень, спричинених патогенезом цукрового діабету. Активація системи зсідання плазми крові, оцінена за накопиченням маркерів тромбонемії (РФМК та рівнем протромбінового пулу), відбувається на фоні зростання концентрації фібриногену та недостатньої активності антикоагулянтної системи, свідченням чого є зниження активності протеїну С. Комплекс зазначених змін однозначно є несприятливим прогностичним показником та за відсутності належної і своєчасної терапевтичної корекції може не лише спровокувати повторне тромбоутворення, значно ускладнити реабілітацію пацієнтів, а й стати причиною летальності.

Розвиток ішемічного інсульту безпосередньо пов'язаний та супроводжується вираженою дисфункцією судинно-тромбоцитарного гемостазу. У 70% випадків ішемічного інсульту активація судинно-тромбоцитарної ланки спостерігається впродовж першої доби після перенесеного інсульту [160,161]. Дослідження функціональної активності тромбоцитів та стану ендотелію набувають особливого значення у випадку наявності в анамнезі хворого цукрового діабету, адже відомо,

що патогенез даного захворювання тісно асоційований з підвищеним ризиком розвитку тромбозів та порушенням реології крові.

Тому з метою загальної оцінки стану судинно-тромбоцитарної ланки системи гемостазу та виявлення можливих особливостей її функціонування у пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу було визначено кількість тромбоцитів, досліджено їх агрегаційну здатність та визначено рівень фактору фон Віллебранда у плазмі крові пацієнтів дослідних груп.

Важливим структурно-функціональним елементом первинної (судинно-тромбоцитарної) ланки гемостазу є ендотелій кровоносних судин. Дисфункція ендотелію призводить до порушення мікроциркуляції, підвищення схильності до тромбоутворення внаслідок зниження тромборезистентності ендотелію та відіграє ключову роль під час розвитку гострих (інсульт, інфаркт міокарду) та хронічних ускладнень діабету.

Одним із загальновизнаних маркерів, що відображає стан ендотелію є фактор фон Віллебранда, тому нами було визначено рівень даного фактору у плазмі крові пацієнтів обох дослідних груп.

Фактор фон Віллебранда є необхідним фактором, який забезпечує фіксацію тромбоцитів до місця пошкодження ендотелію. Залучення фактору фон Віллебранда у процес адгезії реалізується через зв'язування двох його активних центрів з глікопротеїновими GPIIb-IX-V рецепторами тромбоцитів і одного центру з субендотеліальними структурами чи колагеновими волокнами. Таким чином, тромбоцити за допомогою фактору фон Віллебранда виявляються ніби «підвішеними» до травмованої поверхні судини.

Згідно одержаних результатів (рис.4.6) як ішемічний інсульт окремо, так і інсульт на фоні цукрового діабету супроводжується зростанням відносного вмісту фактору фон Віллебранда, проте у групі пацієнтів з інсультом та діабетом даний показник був значно вищим і перевищував значення у групі умовно здорових донорів на 63%. Такі результати узгоджують з даними літератури, відповідно до яких у хворих на цукровий діабет має місце підвищення концентрації фактору фон

Віллебранда у периферійній крові, що корелює з рівнем альбумінурії, вираженістю ретинопатії [162] та може бути свідченням ендотеліальної дисфункції.

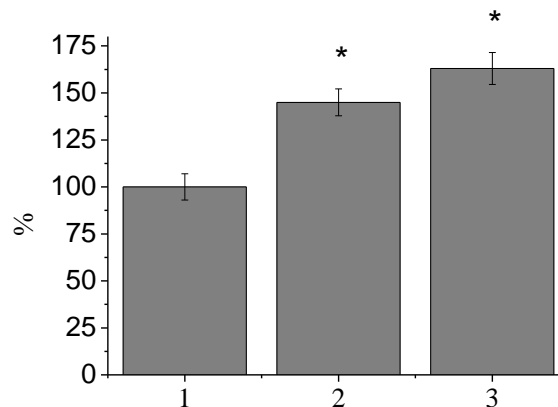


Рис. 4.6. Відносний вміст фактору фон Віллебранда у плазмі крові пацієнтів:

1 – умовно здорові донори, n=35;

2 – пацієнти з ішемічним інсультом, n=44;

3 – пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, n=25

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$

Для пацієнтів лише з ішемічним інсультом також була характерна динаміка до підвищення рівня фактору фон Віллебранда, проте у даній групі його рівень був дещо нижчим порівняно з результатами хворих, що страждають на цукровий діабет. Так, рівень фактору фон Віллебранда у плазмі крові пацієнтів з ішемічним інсультом був на 45% вищим за аналогічний показник у групі умовно здорових донорів.

Оскільки синтез фактору фон Віллебранда та його вивільнення у кровотоки посилюється у відповідь на порушення цілісності ендотелію, виявлене нами зростання рівня даного фактору можна розцінювати як індикатор ендотеліальної дисфункції у пацієнтів обох дослідних груп.

Більш виражені зміни рівня фактору фон Віллебранда за інсульту, ускладненого цукровим діабетом 2 типу, є цілком прогнозованими, адже

гіперглікемія належить до одних із найбільш значимих факторів, що обумовлюють дисфункцію ендотелію [163,164]. Епідеміологічні та проспективні дослідження вказують на існування прямої залежності між рівнем глікемії та ступенем прогресування мікросудинних ускладнень. Механізми пошкоджуючої дії гіперглікемії на судину стінку різноманітні. Так, за підвищеної концентрації глюкози, активуються реакції неферментативного глікозилювання, що призводить до накопичення у тканинах кінцевих продуктів глікування білків, які як безпосередньо, так і через додаткову активацію окиснювального стресу (і так значного внаслідок порушення вуглеводного та ліпідного обміну) сприяють розвитку структурно-функціональних порушень ендотелію. Окрі того, глікозильовані білки здатні активувати рецептори інтерлейкіну-1, TNF- α , ростових факторів, що викликає міграцію до місця ушкодження лейкоцитів, макрофагів та сприяє посиленню проліферації гладеньком'язевих клітин, рівень якої і так перевищує фізіологічну норму внаслідок стимулюючого ефекту надлишку інсуліну. Морфологічні зміни судинного ендотелію за спричиненій цукровим діабетом ендотеліальній дисфункції характеризуються посиленням адгезії лейкоцитів, тромбоцитів, відкладеннями на поверхні ендотелію фібрину, зростанням кількості багатоядерних клітин ендотелію, потовщенням базальної мембрани, збільшенням площі поверхні ендотеліоцитів, зростанням плинності їх мембран та підвищенням проникності капілярної стінки.

Ще одним вагомим чинником, що впливає на стан судинної стінки, є порушення інсулінової сигналізації та розвиток інсулінорезистентності [165], характерний для патогенезу цукрового діабету, особливо ускладненого ожирінням. За цих умов спостерігається посилення надходження вільних жирних кислот з адипоцитів до ендотеліальних клітин, що призводить до значного навантаження на мітохондрії та посилення утворення активних форм кисню. Одним з наслідків цього є окисна інактивація простациклінсинтетази та ендотеліальної синтетази оксиду азоту – ферментів, важливих для підтримання антиатерогенного статусу. Окрім того, оксидативний стрес, як невід'ємна складова патогенезу цукрового діабету,

через зростання кількості вільних радикалів викликає активацію процесів пероксидації ліпідів та зміну якісних характеристик ліпопротеїдів з їх подальшим накопиченням у так званих «пінистих клітинах», відкладення яких у судинній стінці згідно сучасних уявлень розглядається як основа атеросклеротичного ураження судин.

Варто підкреслити, що протромбогенний потенціал фактору фон Віллебранда пов'язаний не лише з його впливом на процес адгезії тромбоцитів, а й із стабілізацією за його участі прокоагулянтного фактору VIII, який є одним з кофакторів тенази внутрішнього шляху згортання крові [24]. За відсутності активуючих чинників даний фактор циркулює у кров'яному руслі у вигляді нековалентного комплексу з фактором фон Віллебранда, який стабілізує його структуру, захищає від протеолітичної деградації та забезпечує «адресну» доставку до місць ушкодження. Активація фактору VIII за дії тромбіну унеможливорює подальшу взаємодію між ним та фактором фон Віллебранда. Отже, можемо припустити, що зростання рівня вільного фактору фон Віллебранда частково може бути пов'язано із активацією фактору VIII та дисоціацією комплексу. Даний факт може слугувати опосередкованим підтвердженням активації системи зсідання крові.

Тромбоцити, як основна одиниця судинно-тромбоцитарного гемостазу, безпосередньо задіяні у процес тромбоутворення та генералізацію запальних реакцій, вивільняючи під час патологічної активації низку біологічно активних речовин. Тромбоцити сприяють рекрутуванню моноцитів у зону пошкодження, так як без попередньої взаємодії з тромбоцитами лейкоцити не здатні міцно адгезіювати до активованого ендотелію. Прикріплюючись до пошкодженої судинної стінки, тромбоцити сприяють утворенню тромбоцитарно-моноцитарних агрегатів, адгезії моноцитів до судинної інтими та їх трансендотеліальній міграції. Зміна адгезивно-агрегаційної активності тромбоцитів не лише свідчить про стан системи згортання крові, але і опосередковано вказує на функціональні можливості ендотелію та може бути показником тяжкості ураження судинної системи.

Порівнюючи показники, що характеризують тромбоцитарну функцію у пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету, більш виражені зміни було виявлено у групі хворих на цукровий діабет. Так, розвиток ішемічного інсульту у хворих на цукровий діабет супроводжувався посиленням відповіді тромбоцитів на введення індуктора АДФ. За цих умов максимальний рівень агрегації досягав 88%, що перевищувало значення у групі умовно здорових донорів на 33%. У пацієнтів з ішемічним інсультом даний показник був менш вираженим і становив 78%. Активація тромбоцитів ще на ранніх стадіях прояву хвороби призводить до утворення мікроагрегатів, які слугують основою для формування більших за розмірами агрегатів і, в кінцевому результаті, до утворення тромбів.

Таблиця 4.2

Показники АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів за ішемічного інсульту окремо та інсульту на фоні цукрового діабету 2 типу (M±m)

Група	Швидкість агрегації тромбоцитів на 30 с, %	Максимальна амплітуда агрегації тромбоцитів, %	Кількість тромбоцитів, ×1000/мкл
Умовно здорові донори, n=35	51,8±9,8	66,3±6,5	205±47
Пацієнти з ішемічним інсультом, n=30	59,8±3,1	78,9±4,8*	151±33
Пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, n=20	61,3±2,2	88,3±5,4*	162±27

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, P ≤ 0,05

Єдиним показником, який характеризувався більш вираженими змінами за ішемічного інсульту, була кількість тромбоцитів. Так, кількість тромбоцитів у

хворих на ішемічний інсульт становила $151 \pm 33 \times 10^3$ /мкл при показнику $205 \pm 47 \times 10^3$ /мкл у контролі, що у цілому узгоджується з даними, наведеними у літературі [166].

Незважаючи на низку досліджень, де було продемонстровано зростання кількості тромбоцитів у хворих на цукровий діабет, особливо ускладнений ожирінням [167,168], нами, навпаки, було виявлено тенденцію до зниження кількості тромбоцитів ($162 \pm 27 \times 10^3$ /мкл) у крові пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу. Такі результати корелюють з більш вираженою амплітудою та швидкістю агрегації тромбоцитів у пацієнтів даної дослідної групи. Враховуючи показаний нами високий агрегаційний потенціал тромбоцитів у пацієнтів з ішемічним інсультом, зниження їх кількості за обох патологічних станів, певною мірою можна пояснити спонтанною агрегацією тромбоцитів під час процедури одержання плазми, збагаченої на дані клітини.

Варто наголосити, що окрім кількості тромбоцитів, важливими параметрами, що безпосередньо пов'язані зі здатністю тромбоцитів до активації, є їх розмір та об'єм [169,170]. Великі за розмірами тромбоцити містять більш щільні гранули і, відповідно, потенційно більш активні та виявляють вищу протромботичну реакцію у відповідь на дію агрегуючих агентів, ніж менші за розміром тромбоцити. З іншого боку, показано, що середній об'єм тромбоцитів (MPV) під час гострої фази ішемічного інсульту є більшим, що супроводжується зменшенням кількості тромбоцитів та розглядається як негативний прогностичний критерій відновлення організму після перенесеного інсульту [171,172].

Не дивлячись на значну кількість досліджень, присвячених вивченню особливостей функціонування тромбоцитів при цукровому діабеті, точні механізми підвищення агрегаційної здатності тромбоцитів залишаються до кінця не з'ясованими. Тромбоцити хворих на цукровий діабет сенсibiliзовані до активації адгезії та агрегації, що частково пов'язано зі зниженням їх чутливості до дії простагліну та оксиду азоту. Так, до вагомих причин тромбоцитарної дисфункції у хворих на цукровий діабет відносять дисбаланс між вмістом простаглідинів та

простациклінів, а також порушення синтезу тканинного активатора плазміногену. Підвищення функціональної активності тромбоцитів супроводжується мобілізацією Са із внутрішньоклітинних депо, та активацію, відповідно, Са-залежних процесів, що обумовлює посилення каскаду реакцій метаболізму арахідонової кислоти, синтез та вивільнення тромбоксану А₂. Останній є потужним активатором процесу агрегації тромбоцитів, сприяє підвищенню доступності рецепторів тромбоцитів до фібриногену, обумовлює звуження просвіту кровоносних судин [173,174].

Окрім того, більш виражена агрегаційна активність тромбоцитів у пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу частково може бути наслідком порушення метаболізму ліпопротеїдів, що знайшло експериментальне підтвердження у публікаціях [175,176] та цілком узгоджується з виявленими нами на попередніх етапах роботи змінами ліпопротеїнового спектру та дещо вищим вмістом загального холестеролу у хворих даної дослідної групи. При цукровому діабеті на фоні гіперхолестеролемії зростає вміст фібриногену, РФМК, Д-димеру, змінюються показники хронометричних тестів та посилюються адгезійно-агрегаційні властивості тромбоцитів у тестах з АДФ та колагеном порівняно з такими у хворих з нормальним рівнем холестеролу. З одного боку, це може бути пов'язано з раннім розвитком ендотеліальної дисфункції і атеросклерозу у хворих на цукровий діабет, з іншого – здатністю атерогенних ліпопротеїдів активувати тромбоцити і тим самими підвищувати прокоагулянтну активність крові. Так, атерогенні фракції ліпопротеїдів, зв'язуючись з тромбоцитарними рецепторами, індукують посилення метаболізму арахідонової кислоти, а отже сприяють агрегації тромбоцитів. Також структурно-функціональні порушення на рівні судинного ендотелію спричиняють зміни у функціонуванні ліпопртеїнової ліпази – ферменту, асоційованого з ендотелієм та задіяного у метаболізм ліпопротеїдів.

Враховуючи, що середній рівень глюкози у крові пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу майже вдвічі перевищує контрольний показник, можемо припустити посилення процесів глікозилування білків мембран

тромбоцитів, що, відповідно до даних літератури, сприяє посиленню склеювання тромбоцитів між собою [177].

Додатковим патогенетичним механізмом, що викликає порушення функціональної активності тромбоцитів у групі хворих з цукровим діабетом, можуть бути зміни концентрації сироваткового інсуліну. У нормі інсулін сенситизує мембрану тромбоцитів до дії антиагрегатних агентів, але при діабеті подібного ефекту не спостерігається. Результати досліджень *in vitro* та *in vivo* свідчать про те, що інсулін пригнічує агрегацію тромбоцитів у здорових людей без ожиріння [178]. Westerbacka J. et al. досліджуючи регуляцію активації тромбоцитів інсуліном у осіб з ожирінням показали, що введення інсуліну пригнічує процес адгезії тромбоцитів на колагені у людей з нормальною вагою, проте не виявляє подібного ефекту при ожирінні [179]. Більш того, лише за відсутності ожиріння інсулін здатен підвищувати концентрацію цГМФ у тромбоцитах, що сприяє їх інактивації після адгезії.

Як відомо, тромбоцити синтезують, депонують і секретують низку білків та біологічно активних речовин, важливих для їх функціонування та забезпечення належної реакції у відповідь на дію стимулюючих агентів. Порушення функцій тромбоцитів супроводжується вивільненням у кровоток чисельних проагрегантів, у тому числі і фібриногену та фактору фон Віллебранда, що сприяє посиленню початкової агрегації тромбоцитів з одночасним залученням у даний процес сусідніх неактивованих клітин.

Таким чином, виявлені нами вищі показники, що характеризують процес агрегації тромбоцитів у хворих на цукровий діабет, певною мірою узгоджуються з вищою концентрацією фібриногену та фактору фон Віллебранда у пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу у порівнянні з результатами у групі хворих на ішемічний інсульт. Подібний характер змін досліджуваних показників дозволяє припустити існування перманентного процесу внутрішньосудинного згортання крові.

Отже, вплив метаболічних порушень, спричинених патогенезом цукрового діабету, особливо ускладненого ожирінням, на функціонування тромбоцитів є комплексним і реалізується із залученням низки патогенетичних механізмів (гіперглікемія, дисліпідемія, окиснювальний стрес, інсулінорезистентність), що у цілому пояснює більш виражені порушення у групі хворих з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету.

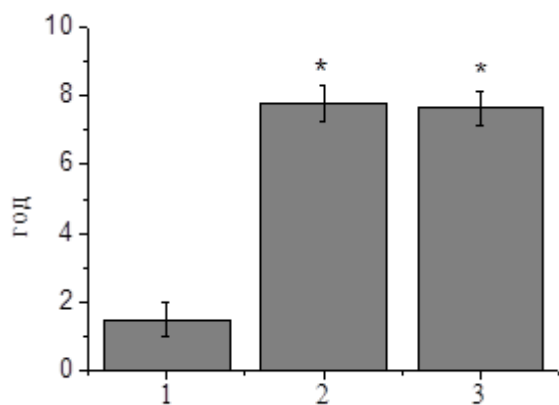
За фізіологічних умов в організмі постійно відбувається як помірна активація тромбоцитів, урівноважена на певних етапах антиагрегатним потенціалом ендотелію і плазменними інгібіторами, так і постійне (фонове) згортання крові, якому протидіє система фібринолізу. Каскад фібринолізу включає низку факторів, основним призначенням яких є регуляція перетворення плазміногену в активний плазмін (КФ. 3.4.21.7) – ключовий фермент, що каталізує лізис фібринового згустку, попереджуючи, таким чином, внутрішньосудинне тромбоутворення. Належне функціонування фібринолітичної системи обумовлено збалансованістю взаємодій активаторів та інгібіторів плазміногену. Активація плазміногену може відбуватися за участі активаторів плазміногену тканинного та урокіназного типу, які високоспецифічно гідролізують пептидний зв'язок (Arg₅₆₁-Val₅₆₂) у молекулі плазміногену обумовлюючи його активацію. Також розрізняють фактор XIIa (фактор Хагемана)-залежний шлях активації плазміногену, пов'язаний з активацією калекреїн-кінінової системи і системи комплементу. Проте даний шлях активації вносить незначний вклад у потенціал фібринолітичної системи.

Важливість підтримання належної фібринолітичної активності особливо гостро постає у випадку наявності хронічних захворювань, розвиток яких супроводжується патофізіологічними змінами на рівні всіх ланок метаболізму та проявляється більш чи менш вираженими ураженнями основних систем організму. Тому наступний блок досліджень включав комплексне дослідження стану фібринолітичної системи, оцінене за вмістом та активністю основних її компонентів, у пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу.

З метою загальної характеристики стану системи фібринолізу та виявлення можливих особливостей її функціонування у хворих на ішемічний інсульт та інсульт, ускладнений цукровим діабетом 2 типу, було проаналізовано час лізису еуглобулінової фракції плазми крові та час Хагеман-залежного фібринолізу.

Визначення часу лізису еуглобулінів дозволяє зробити висновок про загальний фібриногенолітичний потенціал плазми крові. Відповідно до результатів проведених досліджень (рис.4.7 А), гостра фаза інсульту супроводжується значним подовженням часу лізису еуглобулінів, який майже не відрізнявся у обох дослідних групах і становив близько 7,6-7,7 год у порівнянні з $1,5 \pm 0,5$ год, що характерні для осіб без порушень у системі гемостазу.

А



Б

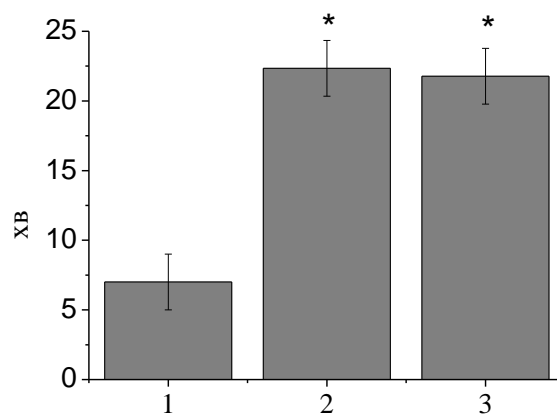


Рис. 4.7. Час лізису еуглобулінової фракції плазми крові (А) та час Хагеман-залежного фібринолізу (Б) у плазмі крові пацієнтів:

1 – умовно здорові донори, n=35;

2 – пацієнти з ішемічним інсультом, n=86;

3 – пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, n=34

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$

Таким чином, виявлені нами зміни є свідченням значного зниження фібринолітичного потенціалу плазми крові у пацієнтів, які перенесли ішемічний інсульт. Оскільки час лізису еуглобулінів є результуючою взаємодією цілого комплексу факторів, його подовження свідчить лише про зниження фібринолітичної активності, але не дозволяє виявити можливі ланки реалізації порушень. Також було проаналізовано час Хагеман-залежного фібринолізу. Як бачимо (рис.4.7 Б) обидві дослідні групи характеризуються значним подовженням часу Хагеман-залежного фібринолізу, рівень якого перевищував контрольний показник у середньому втричі як для пацієнтів з ішемічним інсультом, так і з інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу. Хагеман-залежний фібриноліз є одним з шляхів реалізації внутрішнього механізму активації фібринолізу, який протікає із залученням тих же факторів, що задіяні у процес згортання крові. Тому виявлене нами пригнічення часу Хагеман-залежного фібринолізу частково може бути обумовлене зміщенням балансу плазменних факторів у бік активації процесу коагуляції.

Враховуючи одержані нами результати щодо значного подовження часу фібринолізу в обох проведених тестах, доцільним видавалося визначити потенційну активність плазміногену. Даний показник був на 14% нижче значень у групі умовно здорових донорів для пацієнтів з ішемічним інсультом і на 18% нижче у групі пацієнтів, що мали в анамнезі цукровий діабет 2 типу (рис.4.8).

Зниження потенційної активності плазміногену на фоні описаної вище активації прокоагулянтної ланки системи гемостазу та зростання концентрації фібриногену створює передумови для прогресування тромбоутворення у пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу.

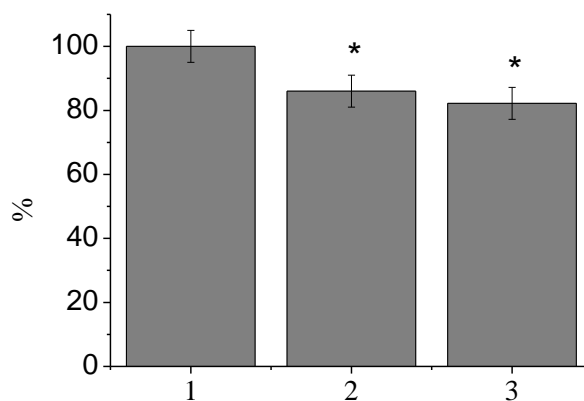


Рис. 4.8. Потенційна активність плазміногену у плазмі крові пацієнтів:

1 – умовно здорові донори, n=35;

2 – пацієнти з ішемічним інсультом, n=87;

3 – пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, n=34

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$

Як вже зазначалося, основним ендогенним активатором плазміногену у кровотоці є тканинний активатор плазміногену (ТАП). За присутності фібрину, ТАП перетворює плазміноген у його активну форму – плазмін. Інформація щодо змін вмісту ТАП у динаміці розвитку інсульту є клінічно важливою, тому що ТАП забезпечує до 90-95% всього фібринолітичного потенціалу крові [180]. Відповідно до результатів проведених досліджень, за розвитку ішемічного інсульту мало місце значне зниження рівня ТАП у плазмі крові пацієнтів обох дослідних груп. Так, рівень ТАП за обох патологічних станів коливався у межах $0,045 \pm 0,002$ ум.од, що було у п'ять разів нижче фізіологічної норми (рис.4.9 А).

Окрім участі у попередженні відкладень фібрину, ТАП також потенціює дезагрегаційний ефект NO та PGI₂ [24], тому зниження його вмісту є одним з чинників, що опосередковують підвищення загального агрегаційного потенціалу тромбоцитів.

Варто зазначити, що зниження ефективності розщеплення фібринового згустку, окрім порушень на рівні перетворення плазміногену чи пригнічення активності плазіну, може бути пов'язано з певними модифікаціями молекули фібриногену (глікозилювання та пошкодження за дії активних кисневих метаболітів) [181], зокрема, залишків лізину.

Це сприяє утворенню компактніших згустків, що характеризуються вищою стійкістю до фібринолізу [182,183]. Більш того, оскільки лізинові залишки безпосередньо залучені у процес взаємодії між фібриногеном та ТАП і плазміногеном, глікозилювання молекули фібриногену знижує ефективність зв'язування даних білків, знижуючи, таким чином швидкість лізису згустку. Дане припущення знайшло підтвердження у роботах Dunn et al., де автори виявили чітку кореляцію між пригніченням утворення плазіну у хворих на цукровий діабет 2 типу та погіршенням зв'язування ТАП і плазміногену з фібрином [184].

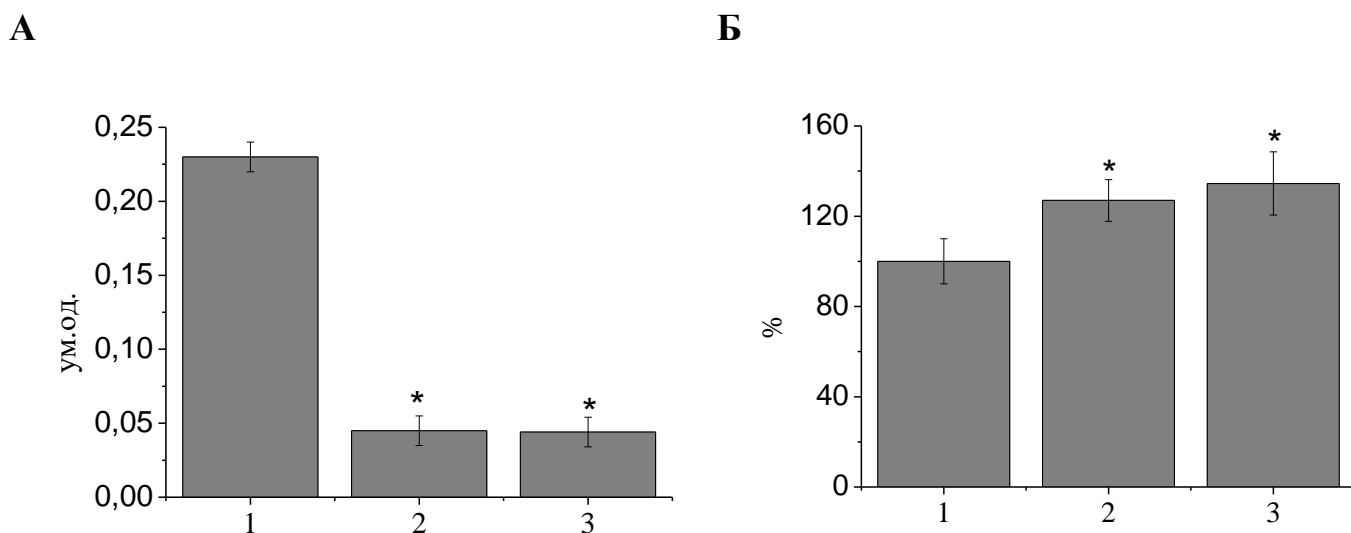


Рис. 4.9. Відносний вміст ТАП (А) та ПАІ-1 (Б) у плазмі крові пацієнтів:

1 – умовно здорові донори, n=35;

2 – пацієнти з ішемічним інсультом, n=87;

3 – пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, n=34

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$

Основним фізіологічним механізмом регуляції активності ТАП, а отже і процесу активації плазміногену, є взаємодія ТАП з інгібітором активатора плазміногену типу 1 (ПАІ-1). За відсутності патологічних порушень у системі гемостазу величина напруги зсуву у судинах є достатньою для вивільнення з ендотеліоцитів фонових кількостей ТАП та попередження вивільнення значних кількостей ПАІ-1. Разом з тим, зростання концентрації ПАІ-1 через його зв'язування з ТАП забезпечує інактивацію та подальше вилучення з кров'яного русла, а отже за даних умов унеможлиблюється зв'язування ТАП з фібрином та активація плазміногену. Закономірним наслідком цього є сповільнення швидкості розщеплення фібрину, зниження ефективності фібринолізу, зростання вмісту фібриногену, що сприяє агрегації тромбоцитів. Підвищення рівня ПАІ-1 сприяє утворення нестійких атеросклеротичних бляшок, схильних до розриву. Відповідно до низки клінічних спостережень, високий рівень ПАІ-1 чітко асоційований з атеротромбозом [185,186].

Тому для більш детальної характеристики стану системи фібринолізу у пацієнтів з ішемічним інсультом та з'ясування можливих причин виявленого нами відхилення від фізіологічної норми було визначено вміст ПАІ-1. Як бачимо з рис.4.9 Б, виявлені нами раніше порушення у функціонуванні системи фібринолізу супроводжуються підвищенням рівня ПАІ-1 у плазмі крові пацієнтів обох дослідних груп. Даний показник був вище значень у групі умовно здорових донорів у 2,9 та 3,2 рази, відповідно, для пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу.

Одержані нами дані слугують додатковим підтвердженням протромботичної спрямованості системи гемостазу у пацієнтів з ішемічним інсультом. Зростання вмісту ПАІ-1 за обох досліджуваних патологічних станів може бути пов'язано з

ендотеліальною дисфункцією, характерною для патогенезу ішемічного інсульту та частково підтверджене нами за накопиченням фактору фон Віллебранда.

Окрім того, не виключеним є внесок тромбоцитарної складової, адже при активації тромбоцитів під час тромбоутворення відбувається активація латентної форми ПАІ-1 у α -гранулах тромбоцитів та його подальша секреція у кровоток. Зміни рівня ПАІ-1 у пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету, узгоджуються з результатами низки клінічних досліджень, де було виявлено підвищення концентрації ПАІ-1 у хворих на цукровий діабет, особливо у осіб з надмірною вагою. Так, показано наявність чіткої позитивної кореляції між вмістом ПАІ-1 та маркерами інсулінорезистентності (ІМТ, накопичення вісцерального жиру, тиск, плазменний рівень інсуліну чи проінсуліну, вміст триацилгліцеролів, вільних жирних кислот), як у хворих на цукровий діабет 2 типу [187,188], так і у хворих з ізольованою інсулінорезистентністю і нормальною толерантністю до глюкози. Припускають, що підвищення вмісту ПАІ-1 є однією з вагомих складових синдрому інсулінорезистентності – патогенетичної основи метаболічного синдрому. Як відомо, саме у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу відмічається значна частота розвитку метаболічного синдрому, за якого значно підвищується ризик виникнення хвороб, пов'язаних з атеросклеротичним тромбоутворенням. Точні механізми залучення ПАІ-1 у розвиток інсулінорезистентності на сьогодні остаточно не з'ясовані, але є дані, що інсулін підвищує синтез та секрецію ПАІ-1 клітинами печінки [189,190]. З іншого боку, ПАІ-1 також здатен модулювати інсуліновий сигналінг, що було показано в експериментах на адипоцитах [191]. У клінічних дослідженнях було виявлено, що тривала терапія метформіном та тіазолідіндіонами, які підвищують чутливість тканин до дії інсуліну, достовірно знижувала рівень ПАІ-1 у пацієнтів з діабетом 2 типу та дисліпідемією [192,193].

У нормі основним джерелом синтезу ПАІ-1 є ендотеліальні, гладеньком'язеві клітини, гепатоцити [194]. Проте при ожирінні головним продуцентом ПАІ-1 стає жирова тканина. Враховуючи, що більшість пацієнтів у групі з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету страждають на надмірну вагу, зростання рівня ПАІ-1 у

крові пацієнтів даної групи може бути пов'язано саме із зростанням маси жирової тканини. Концентрація ПАІ-1 підвищується при наявності андроїдального типу ожиріння, знижується при нормалізації ваги і достовірно не змінюється у худих хворих на цукровий діабет 2 типу, що підтверджує важливість адипоцитів, як головних продуцентів даної молекули. Окрім того, у вісцеральній жировій тканині виробляється значно більше ПАІ-1, ніж у підшкірній.

Вільні жирні кислоти та триацилгліцероли, вміст яких у сироватці крові є підвищеним за декомпенсованого діабету та за ожиріння, а також прозапальні цитокіни (IL-6, IL-1, TNF- α , TGF- β) виступають потужними агоністами синтезу ПАІ-1 [195,196]. Дані речовини здатні як безпосередньо індукувати експресію, синтез та секрецію ПАІ-1 гепатоцитами, адипоцитами, інфільтрованими у жирову макрофагами, так і опосередковано, спричиняючи та посилюючи метаболічні порушення на рівні ключових органів і систем, залучених у регуляцію ліпідного, вуглеводного обмінів, збереження прооксидантно-антиоксидантної рівноваги та підтримання належного цитокінового профілю.

Регуляція фібринолізу, окрім контролю на рівні активації плазміногену, може реалізуватися за механізмом, пов'язаним з пригніченням активності власне плазміну. При цьому провідна роль відводиться α_2 -антиплазміну, який інгібує плазмін з дуже високою швидкістю ($t_{1/2} \sim 0.1-0.5$ с) та здатен інактивувати близько 2/3 всього плазміну, що утворюється при повній активації плазміногену.

У ході проведених досліджень було виявлено зростання активності α_2 -антиплазміну (рис. 4.10), вираженість змін якого, подібно до значень всіх вище проаналізованих показників, була дещо вищою у групі пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу. У даній групі активність α_2 -антиплазміну була на 18% вище значень у групі умовно здорових донорів.

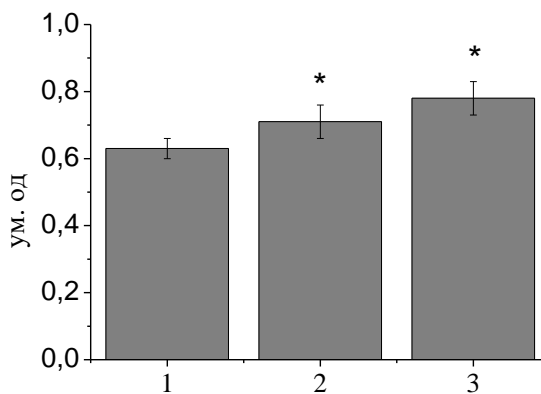


Рис. 4.10. Відносна активність α_2 -антиплазміну у плазмі крові пацієнтів:

1 – умовно здорові донори, n=35;

2 – пацієнти з ішемічним інсультом, n=87;

3 – пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, n=34

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$

Окрім дії на плазмін, антифібринолітичний потенціал α_2 -антиплазміну реалізується через зв'язування з іншими молекулами, важливими для підтримання належного рівня фібринолізу. Так, утворюючи комплекси з калікреїном, урокіназою, ТАП, α_2 -антиплазмін регулює перебіг ранніх стадій фібринолізу.

Підсумовуючи результати дослідження основних показників системи фібринолізу у пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету, можемо зробити висновок про значні порушення на рівні функціонування її компонентів (ТАП, ПАІ-1, α_2 -антиплазміну), що у кінцевому результаті виявляється у пригніченні активності ключового ферменту фібринолізу – плазміну та зниженні загального фібринолітичного потенціалу плазми крові.

Як інтегральний показник, що дозволяє оцінити потенціал системи фібринолізу використовують індекс тромботичного ускладнення (ІТУ), інформативність якого була підтверджена у роботах [197,198]. За норми ІТУ дорівнює нулю. Визначення ІТУ є важливим під час проведення контролю

ефективності лікування та прогнозування розвитку повторних тромботичних ускладнень. Чим більше значення ІТУ відхиляється від нуля, тим більшим є дисбаланс у системі гемостазу. Якщо ІТУ має від'ємний знак, то це свідчить про зниження потенціалу системи фібринолізу, функція якої не виконується у повній мірі. У кровотоці накопичується РФМК, внаслідок чого може бути реалізована загроза тромбоутворення. Якщо ІТУ має додатне значення, то це свідчить про високий потенціал фібринолітичної системи на фоні гіперактивації системи зсідання крові, що також свідчить про загрозу тромботичних ускладнень. Відповідно до проведених нами розрахунків, значення ІТУ у обох дослідних групах відрізнялося від нуля і мало від'ємний знак, причому більш виражені зміни були характерними для пацієнтів, що страждають на цукровий діабет. Так, значення ІТУ становило -2,09 для пацієнтів у групі з ішемічним інсультом та -2,25 для пацієнтів з інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу. Подібні результати свідчать про активацію системи зсідання крові, вищий ступінь дискоординації у функціонуванні зсідаючої та фібринолітичної ланок системи гемостазу у випадку наявності в анамнезі пацієнтів цукрового діабету та в цілому узгоджуються з результатами, одержаними на етапах аналізу окремих показників системи гемостазу.

Підсумовуючи результати проведеного блоку досліджень, можемо зробити висновок, що гостра фаза інсульту характеризується комплексом порушень, які реалізуються на всіх рівнях функціонування системи гемостазу та обумовлюють домінування протромботичних реакцій. У ході проведених досліджень нами не було виявлено змін показників системи гемостазу, які були б характерні лише для пацієнтів з інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу та дозволяли б говорити про клініко-біохімічні особливості гострого періоду ішемічного інсульту у хворих даної групи. При цьому у пацієнтів з ішемічним інсультом окремо та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу спостерігається активація як судинно-тромбоцитарної ланки, так і коагуляційного гемостазу, що на фоні виснаження антикоагулянтного резерву і пригнічення фібринолізу призводить до зміни реологічних властивостей крові, посилення внутрішньосудинного тромбоутворення та у цілому свідчить про

збереження загрози виникнення повторних рецидивів. Дещо більш виражені зміни всіх проаналізованих показників у пацієнтів з інсультом на фоні цукрового діабету пов'язані з системним ураженням і поліорганною дисфункцією, властивих фоновому дисметаболічному процесу.

РОЗДІЛ 5

Біохімічні особливості патогенезу ішемічного інсульту у пацієнтів з ішемічним інсультом та пацієнтів, що хворіли на цукровий діабет 2 типу

Патогенез багатьох захворювань як на початкових, ще доклінічних етапах, так і на пізніх стадіях, часто супроводжується розвитком низки реакцій, які є подібними для різних патологій незалежно від їх етіології. Проте ступінь прояву даних реакцій безпосередньо корелює з інтенсивністю патологічного процесу та залежить від функціонального резерву організму. Ці неспецифічні процеси є не лише проявом загальних метаболічних порушень у відповідь на генералізацію основного захворювання, а й у більшості випадків слугують додатковою патогенетичною ланкою на шляху розвитку ускладнень, спричинених прогресуванням хвороби. Тому дослідження неспецифічних станів, що супроводжують розвиток ішемічного інсульту, та пошук основних біомаркерів, що передують появі чи характеризують розвиток даних станів, дозволить покращити існуючі на сьогодні підходи щодо діагностики та терапії даного сегменту захворювань і, у кінцевому результаті, знизити наслідки перенесеного інсульту.

Не зважаючи на різну етіологію та певні відмінності у механізмах розвитку цукрового діабету та ішемічного інсульту, обидві патології характеризуються порушеннями на рівні окремих ланок обміну речовин, що на певних етапах перебігу захворювання може призвести до формування синдрому неспецифічної ендогенної інтоксикації (ендотоксикозу), вираженість якого є одним з критеріїв тяжкості стану хворих і нерідко слугує основною причиною смертності [199,200]. Тому виявлення ступеню та контроль динаміки розвитку стану ендотоксикозу має важливе прогностичне значення для полегшення об'єктивної оцінки метаболічних порушень та призначення належних терапевтичних заходів.

Під синдромом ендогенної інтоксикації розуміють патологічний стан, що виникає при різних захворюваннях внаслідок накопичення у тканинах та біологічних рідинах організму значних нефізіологічних кількостей проміжних та

кінцевих продуктів нормального обміну речовин, а також продуктів патологічно зміненого метаболізму, які, діючи як вторинні токсини, викликають ураження на клітинному, органному і тканинному рівнях [201,202]. На сьогодні універсальним біохімічним маркером розвитку стану ендогенної інтоксикації вважається рівень так званих молекул середньої маси (МСМ) - речовин різної хімічної природи з молекулярною масою у діапазоні від 500 до 5000 Да [203]. Відповідно до прийнятих уявлень МСМ поділяються на дві великі групи - речовини середньої молекулярної маси або катаболічний пул МСМ та олігопептиди [204]. Перша група включає, головним чином, небілкові похідні, зокрема, альдегіди, кетони, багатоатомні спирти, карбонові та жирні кислоти, олігосахариди, аміноцукри, глюкуронові кислоти, фосфоліпіди та їх похідні, деякі вітаміни та ін., що накопичуються у надмірних кількостях і є токсичними тільки у значно збільшених концентраціях. Друга група представлена речовинами пептидної природи - олігопептидами, які утворюються через посилення протеолітичних реакцій та поділяються на регуляторні і нерегуляторні. Вважається, що один з механізмів реалізації ефекту регуляторних олігопептидів полягає в їх здатності взаємодіяти з рецепторами для відомих пептидних гормонів [205]. При цьому їх низька спорідненість до рецепторів значною мірою компенсується високим, порівняно з специфічними лігандами, вмістом і, відповідно, кінцевий ефект може наближатися до впливу, обумовленого дією специфічних гормонів. Окрім реалізації біологічної активності на рівні взаємодії з поверхневими рецепторами, частина пептидів здатна проникати в середину клітини і далі у клітинне ядро [206], що знайшло підтвердження в експериментах Хавінсона В.Х. та співав. - у роботах з використанням синтетичних пептидів була продемонстрована їх здатність проникати через плазматичну та ядерну мембрани і активувати експресію ряду генів [207].

Незважаючи на можливі якісні відмінності складу МСМ при різних патологічних станах, за проявом більшості клініко-біохімічних та імунологічних ознак синдром ендогенної інтоксикації визначається як неспецифічний стан, що вказує на наявність спільних компонентів, вплив яких і обумовлює загальну

симптоматику. З огляду на існування залежності між концентрацією МСМ та тяжкістю стану хворих, саме накопичення даних молекул може слугувати інтегральним та об'єктивним показником розвитку синдрому ендогенної інтоксикації незалежно від етіопатогенетичних особливостей того чи іншого захворювання.

Незважаючи на представлені у літературі дані щодо концентрації МСМ за ішемічного інсульту як у гостру фазу, так і у віддалені терміни, та виражену ендотоксимию під час патогенезу цукрового діабету, вичерпна інформація щодо показників стану ендогенної інтоксикації за умов ішемічного інсульту, ускладненого цукровим діабетом, відсутня. Відтак метою даного етапу роботи було оцінити вміст молекул середньої маси та олігопептидів у крові пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу.

Нами було встановлено зростання вмісту МСМ за обох досліджуваних патологічних станів, при цьому більш виражені зміни спостерігалися за умов ішемічного інсульту окремо (табл. 5.1).

Так, у пацієнтів з ішемічним інсультом вміст МСМ втричі перевищував контрольний показник, а для хворих з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу у 2,7 рази. Також було виявлено статистично достовірну різницю між групами пацієнтів. Одержані результати узгоджуються з даними літератури - зростання вищезазначеного показника було показано Нікольською В.А. [208] при гестаційному цукровому діабеті та Єлеєвою М.А. [209] при різних формах інсульту. Автори виявили закономірне зростання МСМ з максимальними значеннями за умов високих клінічних проявів у хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу, поступове зниження їх рівня з паралельною позитивною динамікою захворювання та нормалізацією досліджуваного показника в період пізньої одужання.

Виявлене нами зростання вмісту МСМ у сироватці крові пацієнтів обох дослідних груп свідчить про розвиток стану метаболічної інтоксикації та слугує несприятливим прогностичним критерієм. Кореляцію між вмістом МСМ та негативним прогнозом щодо перебігу захворювання пов'язують з їх вираженною

цито- і нейротоксичною дією. Так, зокрема, у роботах [199,210] показано, що зростання рівня МСМ у сироватці крові пацієнтів у гострий період ішемічного інсульту негативно впливає на швидкість та ступінь відновлення неврологічних функцій.

Таблиця 5.1

Відносний вміст молекул середньої маси та олігопептидів у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу (M±m)

	Відносний вміст молекул середньої маси, ум.од	Відносний вміст олігопептидів, ум.од
Умовно здорові донори, n=35	0,31±0,15	0,12±0,09
Група пацієнтів з ішемічним інсультом, n=36	0,96±0,07*	0,34±0,05*
Група пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, n=22	0,84±0,03*#	0,42±0,07*

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$; # статистично достовірно відносно показника у групі пацієнтів з ішемічним інсультом, $P \leq 0,05$

Слід додати, що накопичення МСМ є не лише маркером стану ендотоксикації, але і фактором, який посилює патологічний перебіг захворювання – набуваючи властивостей вторинних токсинів, вони викликають порушення цілісності гематоенцефалічного бар'єру, мікроциркуляційного русла, порушують натрієво-калієвий баланс, пригнічують синтез білка, інгібують активність низки ферментів та викликають стан вторинної імунодепресії. Виявлено майже повне роз'єднання процесів окиснення та фосфорилування, порушення механізмів

регуляції інтенсивності дихання аденіловими нуклеотидами під впливом МСМ. Основний патологічний процес при ендотоксикації протікає на рівні клітинних мембран і пов'язаний із змінами їх властивостей, що закономірно обумовлює порушення внутрішньоклітинного гомеостазу [211,212].

Дещо більш виражені зміни вмісту МСМ у пацієнтів з ішемічним інсультом у порівнянні з результатами пацієнтів з інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, можна пояснити, враховуючи, що цукровий діабет - це довготривалий хронічний стан, за якого має місце певна оптимізація у роботі органів та систем, спрямована на забезпечення належного рівня обмінних процесів за умов значних метаболічних порушень. У той час як у гостру фазу ішемічного інсульту відбувається майже одночасна активація низки реакцій, зокрема, катаболічних, запальних, окисно-відновних, кожна з яких окремо супроводжується утворенням метаболітів, частину з яких за своїми характеристиками, можна віднести до пулу молекул середньої маси.

Відповідно до результатів проведених досліджень (табл. 5.1), обидва патологічні стани супроводжувалися однонаправленими змінами вмісту олігопептидів. Так, було показано зростання вмісту олігопептидів у 2,8 та 3,5 рази, відповідно, за ішемічного інсульту окремо та інсульту, ускладненого цукровим діабетом 2 типу. Оскільки рівень олігопептидів безпосередньо пов'язаний зі ступенем білкового метаболізму, виявлене нами накопичення у крові даних сполук свідчить про активізацію протеолітичних процесів за обох досліджуваних захворювань. Так, основним джерелом утворення середньомолекулярних пептидів є активація протеїназ крові та розщеплення, відповідно, низки білків, зокрема, фібриногену, альбуміну, тромбіну, імуноглобулінів, що супроводжується накопиченням продуктів з високою функціональною активністю та може призводити до появи пептидів, близьких за структурою до фізіологічних біорегуляторів, наприклад, ангіотезину, вазопресину, окситоцину, кальцитоніну, енкефалінів тощо. Деякі з них здатні інгібувати еритропоез, пригнічувати синтез гемоглобіну, що за умов ішемії є надзвичайно негативним фактором. Інші гальмують глюконеогенез і синтез ДНК, виявляють цитотоксичну дію, порушуючи

проникність клітинних мембран та впливаючи на трансмембранний транспорт. Також показана здатність олігопептидів взаємодіяти з компонентами системи гемостазу, що слугує додатковим патогенетичним чинником розвитку ускладнень за патологій, етіологія яких безпосередньо пов'язана з порушеннями на рівні окремих ланок системи гемостазу, зокрема, інсульту[213].

Можемо припустити, що вищий рівень олігопептидів у групі пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету частково може бути наслідком хронічного окисного стресу та інтенсифікації вільно радикальних реакцій, характерних для патогенезу даного захворювання. З одного боку, продукти пероксидації ліпідів та активні кисневі метаболіти, здійснюючи безпосередній вплив на клітинні мембрани, обумовлюють декомпартменталізацію внутрішньоклітинних протеїназ, зокрема, їх вивільнення з лізосом спочатку у цитоплазму, а далі у позаклітинний простір, що індукує розвиток деструктивних, запальних процесів та сприяє посиленню протеолітичної деградації молекул [214]. З іншого – дестабілізація білкових молекул, спричинена окиснювальними модифікаціями за участі продуктів пероксидації та агресивних кисневих радикалів, обумовлює їх спрямування на шлях протеолітичної деградації, що за наявності порушень у системі контролю та реалізації окремих етапів протеолізу, може супроводжуватися накопиченням продуктів їх розщеплення, у тому числі і низько- та середньомолекулярних пептидів [215].

Враховуючи, що одним з джерел утворення олігопептидів є білки крові, далі було проаналізовано вміст загального білка та альбуміну у сироватці крові пацієнтів з ішемічними інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу.

В результаті проведених досліджень було виявлено зниження концентрації загального білка у групі хворих з ішемічним інсультом (табл. 5.2), яке спостерігалось у 100% пацієнтів і було на 16% нижче референтної межі контрольних значень. У випадку ішемічного інсульту, ускладненого цукровим діабетом 2 типу, спостерігалася тенденція до зниження концентрації білка.

**Концентрація загального білка та альбуміну у сироватці крові пацієнтів
(M±m)**

	Умовно здорові донори, n=35	Пацієнти з ішемічним інсультом, n=36	Пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету, n=24
Загальний білок, г/л	67,2±2,2	56,8±1,1*	62,8±1,5
Альбумін, г/л	35,6±0,5	30,8±0,6	31,7±0,8

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$

Концентрація альбуміну у сироватці крові у пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу також мала тенденцію до зниження, однак не таку виражену, як у випадку визначення вмісту загального білка (табл. 5.2). Так, концентрація альбуміну складала близько 30 г/л для обох дослідних груп при значенні контролю 35-50 г/л.

Навіть незначне зниження рівня альбуміну у сироватці крові може мати негативне значення для організму [216], адже відомо, що найбільш вираженою токсичністю характеризуються гідрофобні ендотоксини, які у плазмі крові перебувають у зв'язаному вигляді, утворюючи, переважно комплекси з альбуміном. Сорбцію даних токсинів альбуміном розглядають як важливий механізм детоксикації крові, що забезпечує багаторазове зниження кількості токсинів та їх транспортування до печінки для подальшого виведення з організму.

Варто зазначити, що зниження концентрації альбуміну розглядають як один з інформативних критеріїв ендогенної інтоксикації. Прогресуюче накопичення у кровотоці ендогенних токсинів, проміжних та кінцевих продуктів деградації, пептидів, характерне для синдрому ендогенної інтоксикації, обумовлює блокування місць зв'язування на молекулі альбуміну та зниження його функціональної

активності, так званого резерву зв'язування альбуміну. Все вище зазначене призводить до зміщення балансу у системі елімінації гідрофобних токсичних метаболітів у бік їх накопичення. За таких умов ліпофільна частина сполук серед пулу МСМ здатна легко проникати через клітинні мембрани, викликаючи зміни на рівні внутрішньоклітинного метаболізму та за механізмом зворотного зв'язку обумовлювати посилення стану ендотоксемії.

Здатність альбуміну зв'язувати токсини також може бути порушена внаслідок конформаційних перебудов молекули, спричинених необоротним зв'язуванням з мембранотропними ендотоксинами, накопиченням глікованих форм альбумінів - фруктозамінів, зростанням вмісту аддуктів з ацетальдегідом [217].

Таким чином, постішемичний період, як за умов цукрового діабету 2 типу, так і окремо, характеризується розвитком стану ендогенної інтоксикації, підтверженого накопиченням у сироватці крові МСМ та олігопептидів, що, враховуючи їх виражену токсичність та мембранотропність, може зумовлювати вторинні патобіохімічні зміни на рівні клітин головного мозку та периферійних органів. Зростання показників стану ендотоксикації слугує негативним прогностичним критерієм перебігу основного захворювання та потребує негайного застосування належної терапії, спрямованої на покращення загального метаболічного статусу організму. В цілому, більш виражені зміни загальної концентрації білка та вмісту МСМ у групі пацієнтів з ішемічним інсультом, порівняно з даними для хворих на цукровий діабет, вказують на важливість інтенсифікації катаболічних реакцій, як одну з можливих патогенетичних ланок розвитку ускладнень, спричинених ішемічним інсультом.

Дослідження останніх років дозволили розширити існуючі на сьогодні уявлення щодо участі запальних процесів у розвитку ішемічного інсульту. Так, зростання вмісту прозапальних цитокінів відносять до неспецифічних та швидких реакцій організму у відповідь на гостре порушення мозкового кровопостачання [218,219]. Вже у перші хвилини після інсульту ішемізовані нейрони індукують продукування астроцитами на нейроглію низки прозапальних медіаторів, у тому

числі і цитокинів [220]. Гіперпродукція останніх, через посилення оксидативного стресу, вивільнення у позаклітинний простір матриксних протеїназ, обумовлює порушення цілісності гематоенцифалічного бар'єру, спричиняє набряк головного мозку та індукує апоптотичну загибель нейронів. Трансміграція макрофагів та лейкоцитів через гематоенцифалічний бар'єр сприяє подальшому прогресуванню та посиленню запальних процесів в ішемізованій тканині мозку. У цілому вираженість цитокинового дисбалансу корелює з тяжкістю перебігу захворювання та його клінічним результатом.

З іншого боку, атеросклероз судин, який лежить в основі патогенезу переважної більшості випадків ішемічного інсульту, сам по собі характеризується субхронічним запальним процесом судинної стінки [221]. На сьогодні накопичується все більше даних про те, що стан хронічного запалення, ідентифікований, зокрема, за підвищенням рівня С-реактивного білка і фібриногену, є додатковим фактором ризику розвитку інсульту або транзиторної ішемічної атаки. При цьому запальний процес не лише супроводжує атеросклероз, а й належить до чинників, що провокують його виникнення. Зокрема, формуванню ранніх атеросклеротичних змін в основних судинних магістралях мозку часто передують накопичення у субендотеліальному шарі судинної стінки макрофагів та Т-клітин. Ці клітини, продукуючи медіатори запалення та ростові фактори, сприяють подальшому прогресуванню запального процесу та посиленню прокоагулянтного статусу, підвищуючи, відповідно, експресію ендотеліальних молекул адгезії (Р- та Е-селектину та ін.) та прокоагулянтів, зокрема тканинного фактору та інгібітору активатора плазміногену типу-1 і знижуючи при цьому експресію тромбомодуліну і активатору тканинного плазміногену. Отже, запалення не лише обумовлює та супроводжує розвиток інсульту, але й впливає на ступінь ушкодження мозку у випадку, коли інсульт уже відбувся [222,223].

До основних прозапальних молекул, що виявляються у сироватці крові за інтенсифікації запальних реакцій, володіють широким спектром біологічної активності та тісно асоційовані з розвитком серцево-судинних захворювань окремо,

і патогенезом цукрового діабету, відносять цитокіни TNF α та інтерлейкін-6 [224,225]. Тому наступний етап дослідження передбачав оцінити вміст даних молекул у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу.

Як видно з даних, наведених у таблиці 5.3, вміст інтерлейкіну-6 значно перевищував контрольний показник за обох дослідних патологічних станів, при цьому зміни у групі пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, були більш вираженими у порівнянні з такими за ішемічного інсульту окремо. Так, вміст інтерлейкіну-6 у даній групі у 1,8 рази перевищував значення контролю та у 1,2 рази значення у хворих з інсультом. Даний показник у групі пацієнтів лише з ішемічним інсультом був у 1,5 рази вищим за значення у показника у групі умовно здорових донорів.

Таблиця 5.3

Відносний вміст прозапальних цитокінів у сироватці крові пацієнтів (M \pm m)

	Відносний вміст інтерлейкіну-6, ум.од/мг білка	Відносний вміст TNF- α , ум.од/мг білка
Умовно здорові донори, n=35	1,42 \pm 0,15	1,27 \pm 0,10
Пацієнти з ішемічним інсультом, n=45	2,21 \pm 0,21*	2,19 \pm 0,13*
Пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, n=24	2,58 \pm 0,19*	2,64 \pm 0,10*,#

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, P \leq 0,05; # статистично достовірно відносно показника у групі пацієнтів з ішемічним інсультом, P \leq 0,05

Незважаючи на те, що інтерлейкін-6 синтезується різними типами лімфоїдних та нелімфоїдних клітин, у тому числі Т- і В-лімфоцитами,

фібробластами, ендотеліальними клітинами, макрофагами та ін., близько 30% від його загальної кількості утворюється у жировій, зокрема, вісцеральній тканині, та корелює з індексом маси тіла. Тому виявлене нами більш виражене зростання вмісту інтерлейкіну-6 у пацієнтів з діабетом 2 типу можна пояснити з огляду на той факт, що більшість з них мали показник ІМТ більше 34 кг/м².

Зростання концентрації даного прозапального цитокіну через широкий спектр його біологічної активності та дію на різні типи клітин розглядається як негативний прогностичний маркер розвитку та перебігу серцево-судинних захворювань. Вплив інтерлейкіну-6 на розвиток кардіо- та цереброваскулярних порушень є комплексним і включає декілька механізмів, що реалізуються на рівні окремих компонентів системи гемостазу (посилення секреції гепатоцитами фібриногену, транскрипції гену фактору VIII, експресії поверхневого тканинного фактору моноцитами, пригнічення синтезу протеїну S та антитромбіну, вплив на агрегацію тромбоцитів) [226], обміну ліпідів (зниження концентрації апопротеїнів A1, A2, B, підвищення рівня триацилгліцеролів, посилення експресії рецепторів до ЛПДНЩ та зниження експресії ліпопротеїнової ліпази) [227,228], функціональної активності ендотелію [229], наслідком чого є активізація протромботичних реакцій, зміни ліпідного профілю у бік накопичення атерогенних ліпопротеїдів та виражена ендотеліальна дисфункція.

При дослідженні вмісту TNF α – одного з основних прозапальних та проапоптичних чинників, що характеризується різноманітними біологічними ефектами та належить до маркерів низько-градієнтного запалення, також було виявлено значне перевищення контрольного показника у пацієнтів обох дослідних груп. Так, вміст TNF α у сироватці крові хворих з ішемічним інсультом становив $2,19 \pm 0,13$ ум.од/мг білка у порівнянні з $1,27 \pm 0,10$ ум.од/мг білка у групі умовно здорових донорів. У хворих, що додатково страждали на цукровий діабет, даний показник складав $2,64 \pm 0,10$ ум.од/мг білка, що було вдвічі вище за значення у групі умовно здорових донорів та у 1,2 рази вище за значення у групі лише з ішемічним інсультом.

Вищий вміст інтерлейкіну-6 та TNF- α у групі пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, у порівнянні з результатами лише за ішемічного інсульту, є цілком закономірним, враховуючи, що цукровий діабет 2 типу належить до захворювань, у патогенезі яких ключову роль відіграє хронічне низько інтенсивне запалення, пов'язане з гіперпродукцією низки факторів, у тому числі й цитокінів надмірною кількістю жирової тканини.

TNF α , подібно до інтерлейкіну-6, також виявляє проатерогенний ефект, пов'язаний з індукцією міграції лейкоцитів до ендотелію, посиленням синтезу молекул адгезії та хемоатрактантів, підвищенням капілярної проникності [230]. В експериментах з використанням моноклональних антитіл до TNF α доведено його внесок у розвиток ендотеліальної дисфункції. За дії цитокіну відбувається активація НАДФН-оксидази та блокування активності NO-синтетази в ендотеліоцитах [231], що знижує антикоагулянтний потенціал ендотелію.

Таким чином, зростання рівня обох досліджуваних цитокінів у хворих з цукровим діабетом є не лише свідченням перманентного запального процесу та дисрегуляції у функціонуванні імунної системи, а й слугує вагомим патогенетичним механізмом розвитку та прогресування атеросклеротичних порушень.

Активізація запальних реакцій на фоні спричиненого інсультом певного виснаження адаптаційного потенціалу організму та відсутності належної терапевтичної корекції може створювати передумови для формування стану інсулінорезистентності у пацієнтів даної групи. Адже доведеним є факт тісної асоціації між вмістом даних цитокінів та порушенням вуглеводного обміну. Потенційний вплив інтерлейкіну-6 та TNF α на розвиток інсулінорезистентності пов'язаний зі зниженням рівня адипонектину, порушенням транслокації переносника глюкози ГЛЮТ-4, зниженням чутливості інсулінових рецепторів внаслідок активації процесів їх аутофосфорилування [232,233]. Окрім того, TNF α впливає на активність ліпопротеїніпази, знижує експресію транспортерів вільних жирних кислот у жировій тканині, перешкоджаючи, таким чином, синтезу та

поглинанню тригліцеридів адипоцитами [234,235]. У роботі Kirwan J.P. та співавт. [236] показано, що підвищення концентрації інтерлейкіну-6 та TNF α призводить до порушення нейросекреції у вентромедіальних ядрах гіпоталамуса, викликаючи гіперкортизолемію і, у подальшому, стан інсулінорезистентності.

Одним з наслідків цитокінового дисбалансу, спричиненого як гострим запальним процесом при ішемічному ураженні тканин мозку, так і станом хронічного запалення під час патогенезу цукрового діабету, є посилення синтезу та секреції низки ферментів, активація яких за умов порушення у функціонуванні систем контролю їх активності слугує вагомим патобіохімічним механізмом розвитку чи прогресування ускладнень пов'язаних з перебудовами екстрацелюлярного матриксу. До таких ферментів, зокрема, належать матриксні металопротеїнази (ММП) – родина ферментів, що гідролізують білки позаклітинного матриксу [237]. Ряд патологічних станів таких, як артрити, аутоімунні та нейродегенеративні захворювання, злоякісні трансформації, язва, фіброз легень, діабетична нефропатія та ін. характеризуються порушенням процесів регуляції деградації компонентів екстрацелюлярного матриксу, а отже і функціонування матриксних металопротеїназ [238,239,240]. На сьогодні існує достатній масив даних щодо участі металопротеїназ у розвитку кардіоваскулярних патологій. Так, ММП, зокрема, представники підродини желатиназ, задіяні у розвитку первинних церебральних геморагій, порушенні цілісності гематоенцифалічного бар'єру, постішемічних реперфузійних геморагіях при інсульті [241]. Також є низка робіт [242,243], де показано зміну активності деяких матриксних металопротеїназ у хворих на цукровий діабет.

Беручи до уваги все вищевикладене, нами було досліджено сироватковий вміст ММП-2 та ММП-9 у хворих з ішемічним інсультом окремо та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу.

У ході проведених досліджень було виявлено статистично значуще зростання вмісту ММП як у порівнянні з групою умовно здорових донорів, так і при порівнянні між собою результатів обох дослідних груп (табл. 5.4). Так, вміст ММП-

9 був вище значень норми у 1,2 та 1,9 рази, відповідно, у хворих з ішемічним інсультом та пацієнтів, що додаткового страждали ще й на цукровий діабет. Одержані результати у цілому узгоджуються з даними, наведеними у літературі, відповідно до яких у перші години після гострої ішемії головного мозку відбувається зростання рівня ММП-9 як безпосередньо у ядрі інфаркту та периінфарктній області, так і у периферійній крові [244,245].

Таблиця 5.4

**Відносний вміст матриксних металопротеїназ у сироватці крові пацієнтів
(M±m)**

	Відносний вміст ММП-2, ум.од/мг білка	Відносний вміст ММП-9, ум.од/мг білка
Умовно здорові донори, n=35	1,54± 0,03	0,86± 0,01
Пацієнти з ішемічним інсультом, n=45	2,23± 0,07*	1,01± 0,05*
Пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, n=24	3,38± 0,19*,#	1,63± 0,09*,#

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$; # статистично достовірно відносно показника у групі пацієнтів з ішемічним інсультом, $P \leq 0,05$

Підвищений вміст ММП-9 у ділянці інфаркту дозволяє розглядати даний фермент як потенційний маркер ушкодження тканин головного мозку [246] та свідчить про залученність ММП-9 у процес розширення зони інфаркту. В експериментах із застосуванням моноклональних антитіл, системно блокуючих ММП-9, чи інгібіторів даного ферменту, спостерігалось значне зменшення розмірів ділянок інфаркту головного мозку у щурів [247]. Поряд із підвищенням рівня ММП-9, було виявлено зростання вмісту ММП-2, яке було більш вираженим порівняно з показниками для ММП-9. Вміст даного ферменту у сироватці крові хворих

перевищував значення контролю у 1,4 рази для пацієнтів з ішемічним інсультом та вдвічі для пацієнтів з інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу.

З огляду на той факт, що ММП-9 належить до індукцибельних ферментів, рівень експресії яких знаходиться під контролем ростових факторів, цитокінів, гормонів та залежить від оксидативного статусу клітини [248], виявлене нами зростання вмісту ММП-9 у сироватці крові пацієнтів обох дослідних груп може бути безпосереднім наслідком підвищення рівня інтерлейкіну-6 та TNF α та посилення транскрипції генів даного ферменту.

Подібний механізм регуляції активності не характерний для ММП-2, промотори генів якої не містять регуляторних послідовностей, необхідних для зв'язування відповідних транскрипційних факторів. Тому даний фермент, на відміну від більшості матриксних металопротеїназ, належить до конститутивних. Виявлене нами значне зростання вмісту ММП-2 може бути результатом декількох подій, кожна з яких окремо здатна внести вагомий внесок у порушення чітко скоординованого та строго контрольованого балансу між вмістом і активністю ферментів та регуляторів їх активності.

Найбільш вірогідною причиною зростання вмісту ММП-2 може бути посилення секреції проММП-2 та їх подальше перетворення в активну форму за участі позаклітинних протеїназ, аутокаталітичного розщеплення чи дії інших ММП. Так, джерелом ММП-2 за розвитку ішемічного інсульту можуть виступати не лише активовані нейтрофіли та лейкоцити периферійної крові, а й безпосередньо клітини нервової тканини, зокрема, нейрони, астроцити, олігодендрогліоцити, мікроглія та ендотеліальні клітини [249].

Негативний вплив ММП за розвитку ішемічного інсульту певною мірою пов'язаний з їх здатністю розщеплювати компоненти базальної мембрани ендотеліальних клітин судин головного мозку, сприяючи, таким чином, міграції клітин через гематоенцифалічний бар'єр. Експериментально доведено існування зв'язку між вираженістю пошкодження гематоенцефалічного бар'єру при ішемії та рівнем активації ММП-9. У ділянках з підвищеним вмістом ММП-9 зафіксована

найвища нейтрофільна інфільтрація і геморагії - еритроцитарна екстравазація [250]. За таких умов, нейтрофіли, що мігрують в ішемізовану ділянку головного мозку із циркулюючої крові, слугують додатковим джерелом активованих ММП.

Незважаючи на низку негативних ефектів, обумовлених дією ММП, їх роль у патогенезі ішемічних ушкоджень не настільки однозначна. Дані ферменти активно залучаючись у процеси ремоделювання позаклітинного матриксу та міжклітинних взаємодій, здійснюють позитивний вплив на регенерацію пошкоджених тканин. Так, показана участь ММП у постінсультному нейрогенезі. Відповідно до результатів Lee S. et al. [251] у мишей з фокальною ішемією головного мозку ММП-9 сприяє міграції нейробластів із субвентрикулярної зони у ділянку пошкодження.

Значно вищий рівень обох досліджуваних ММП у пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету можна пояснити з огляду на той факт, що більшість хворих з цукровим діабетом страждали ще й на надмірну вагу. А згідно досліджень останніх років адипоцити зростаючої маси жирової тканини активно продукують низку ММП, у тому числі і ММП-2 та -9, які необхідні для забезпечення належних перебудов екстрацелюлярного матриксу під час процесу диференціювання адипоцитів [252,253]. Більш того, пригнічення активності ММП при використанні інгібіторів батимастату, каптоприлу чи специфічних до ММП антитіл, свідчить про роль даних ферментів у процесах диференціювання адипоцитів [254].

Оскільки розвиток ішемічного інсульту, зокрема, на ранніх стадіях перебігу захворювання та патогенез цукрового діабету, особливо ускладнений супутнім ожирінням, характеризуються активізацією вільнорадикальних реакцій та розвитком оксидативного стресу, можемо припустити, що один з механізмів виявленого нами зростання вмісту ММП реалізується через індуковану АКМ активізацію MAP-кіназних каскадів та посилення за участі транскрипційних факторів AP-1, NF- κ B, ERK транскрипції генів матриксних металопротеїназ, у тому числі і ММП-9. На додачу, АКМ здатні безпосередньо активувати молекулу ферменту, що було експериментально підтверджено при інкубації про-ММП-9 та про-ММП-2 у системі

ксантин/ксантинооксидаза [255]. Подібний ефект АКМ, як вважають, пов'язаний з окисненням сульфгідрильної групи, що входить до складу високо консервативної пептидної послідовності PRCGXPDV, так званого «цистеїнового вимикача». Цей вільний залишок цистеїну, утворюючи координаційний зв'язок з атомом цинку в активному центрі ферменту, забезпечує підтримання ферменту у неактивному стані. Порухення такої взаємодії внаслідок окиснення сульфгідрильної групи цистеїну чи вилучення цистеїнового залишку обумовлює аутоактивацію ММП-2 [256]. Аналогічний ефект спостерігається і при S-глутатіонілюванні цистеїнового залишку [257]. Варто відмітити, що за даних умов утворюється активна форма ферменту з молекулярною масою 72 кДа, у той час як активація за дії протеїназ супроводжується появою 64 кДа ММП-2.

Для оцінки присутності протеолітично активних форм ММП було проведено ензим-електрофоретичний аналіз зразків сироватки крові пацієнтів дослідних груп. Як видно з наведеної електрофореграми (рис.5.1), певна протеолітична активність присутня як у групах пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, так і у групі умовно здорових донорів.

Незважаючи на те, що обидва дослідні патологічні стани характеризуються подібним розподілом зон з протеолітичною активністю, інтенсивність смуг у зразках сироватки крові хворих на діабет є дещо вищою. У цілому, такі дані узгоджуються з наведеними нами раніше результатами щодо визначення вмісту матриксних металопротеїназ та свідчать про порушення механізмів контролю активності даних ферментів.

Відповідно до даних ензим-електрофорезу, гострий період інсульту, незалежно від наявності в анамнезі цукрового діабету, характеризується присутністю у кровотоці латентних та активованих форм обох досліджуваних металопротеїназ. Так, чітко видно смуги протеолітичної активності, що за молекулярною масою відповідають проММП-9 (92 кДа) та ММП-9 (85 кДа). Аналогічна картина спостерігається і у випадку ММП-2 – сироватка крові пацієнтів

з ішемічним інсультом окремо та інсультом на фоні цукрового діабету містить 72 кДа проММП-2 та активовану ММП-2, молекулярна маса якої складає 67 кДа.

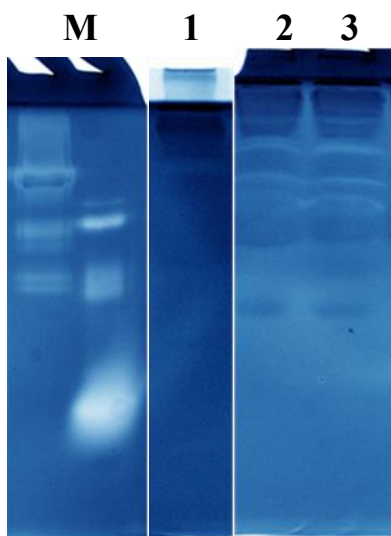


Рис. 5.1. Типова ензим-електрофореграма зразків плазми крові умовно здорових донорів (1), пацієнтів з ішемічним інсультом (2) та за наявності в анамнезі цукрового діабету 2 типу (3): М – маркери молекулярних мас (86 кДа плазмін, 36 кДа міні-плазмін, 23 кДа трипсин

Незважаючи на той факт, що сироватка крові здорових людей також містить латентні форми деяких ММП, що можуть виявляти незначну активність і за умов фізіологічної норми, поява у кровотоці активованих форм даних ферментів є однозначним свідченням порушення рівноваги між вмістом інгібіторів та ММП. За таких умов активація ММП є не лише опосередкованим підтвердженням змін, асоційованих з ремоделюванням позаклітинного матриксу, а й з огляду на здатність даних ферментів розщеплювати низку нематриксних білків, може бути одним з чинників, що сприяють розвитку ускладнень, супутніх основному захворюванню.

Також у зразках сироватки крові пацієнтів було виявлено низку смуг з молекулярною масою вище 100 кДа. Можемо припустити, що протеолітична активність в області локалізації високомолекулярних білків може бути обумовлена активністю проММП-9 у складі стабільного комплексу з ТІМП-1 (молекулярна маса близько 116 кДа) чи бути результатом утворення за даних патологічних станів гомодимерів проММП-9 (молекулярна маса близько 220 кДа). Накопичення останніх, через відсутність доступних для інгібіторів центрів зв'язування, сприятиме

збереженню певного пулу протеолітично активних ММП навіть у випадку відновлення інгібіторно-активаторного балансу.

Виявлена нами присутність активованих форм ММП може бути безпосереднім наслідком порушення механізмів контролю активності даних ферментів. Оскільки активність всіх представників ММП детермінується на рівні їх взаємодії з тканинними інгібіторами (ТІМП), зростання вмісту даних ферментів за відсутності узгодженості у зростанні вмісту їх інгібіторів створюватиме передумови для активації ММП.

Відомо, що активація ММП секреторного типу, зокрема, ММП-2 та ММП-9, відбувається лише після їх вивільнення у позаклітинний простір і здійснюється за участі низки тканинних та плазмених протеїназ, частина яких належить до фібринолітичної ланки системи гемостазу. Так, зокрема, ефективним регулятором активності ММП є плазмін та урокіназа. Зростання концентрації активаторів плазміногену тканинного та урокіназного типів, а також зниження концентрації інгібіторів активаторів плазміногену через вплив на кількість функціонально активного плазміну, опосередковано сприяє перетворенню проММП у активну форму. Більш того, згідно робіт Wang X. et al. тканинний активатор плазміногену здатен безпосередньо активувати молекулу проММП-9 [258].

Проте, незважаючи на значний внесок плазміну в активацію ММП, ми не можемо говорити про активну залученість даного механізму під час розвитку ішемічного інсульту як окремо, так і за цукрового діабету 2 типу.

Оскільки ММП-2, на відміну від решти секреторних ММП, є субстратом для дії ММП мембранного типу, вірогідною причиною виявленої нами активації ММП-2 може бути посилення секреції даних ферментів за обох дослідних патологічних станів. У подальшому, діючи на молекули проММП-1, -2, -9, -13, ММП-2 обумовлює каскадоподібний механізм активації решти матриксних металопротеїназ, що у кінцевому результаті призводить до ампліфікації первинного сигналу та значного посилення протеолітичних реакцій, опосередкованих ферментами даної групи.

Таким чином, результати проведених досліджень щодо визначення вмісту та активності матриксних металопротеїназ свідчать, що одним з патогенетичних механізмів, який лежить в основі розвитку ускладнень, спричинених гострою ішемією головного мозку, реалізується за участі ММП-2 та ММП-9. З іншого боку, зростання вмісту активованих форм даних ферментів у хворих з цукровим діабетом не лише сприяє прогресуванню ускладнень, асоційованих з перебудовами позаклітинного матриксу, а й може бути пусковим фактором ескалації атеротромботичних порушень.

У цілому, високий рівень активованих ММП у сироватці крові пацієнтів з ішемічними інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, на фоні запального процесу та виявленого на попередніх етапах дослідження певного зростання вмісту атерогенних ліпопротеїдів, опосередковано може свідчити про існування потенційної загрози виникнення повторних ускладнень, спричинених розривом атеросклерозних бляшок. Згідно існуючих уявлень, ММП, діючи на волокна колагену та еластину, що входять до складу фіброзної оболонки бляшки, призводять до її розмягчення та зниження механічної стійкості до розриву. Особливо висока активність ММП-9 виявляється у «плечевій» зоні бляшки, яка є найбільш уразливою до розривів.

Окрім компонентів екстрацелюлярного матриксу, субстратами для ММП є ряд білків (ангіотензини I і II, α_2 -макроглобулін, антиплазмін, фібрин та фібриноген, фібронектин, попередники інтерлейкінів та їх рецептори, плазміноген), неспецифічне розщеплення яких призводить до утворення низки продуктів різної молекулярної маси [259]. Зростання концентрації останніх може вносити певний вклад у формування стану ендогенної інтоксикації як безпосередньо через поповнення пулу олігопептидів чи МСМ, так і опосередковано внаслідок створення додаткового навантаження на детоксикаційні системи організму. Ще одним наслідком накопичення деградованих форм білків може бути поява аутоантитіл до цих змінених молекул, що впливає на загальний імунологічний статус організму.

За таких умов може мати місце часткова деградація за участі ММП проферментів чи ферментів, присутніх у кровотоці, що супроводжується появою їх ушкоджених деградованих форм, частина з яких потенційно може мати певну ферментативною активністю. Деградовані форми ферментів не здатні виконувати біологічні функції, притаманні цілісній молекулі, проте, можуть взаємодіяти з рецепторами на поверхні клітині, ініціюючи, у такий спосіб, запуск процесів та реакцій, не властивих для фізіологічного стану організму. Виявляючи активність щодо ряду білкових молекул, деградовані форми ферментів здатні впливати на перебіг окремих біохімічних реакцій, сприяючи у такий спосіб генералізації патологічного процесу. Порушення механізмів контролю активності протеолітично ушкоджених форм ферментів з боку ендогенних інгібіторів слугує додатковим фактором, що обумовлює патогенетичний потенціал даних молекул.

На особливу увагу при цьому заслуговують протеолітичні похідні плазміногену – попередника ключового ферменту фібринолітичної ланки системи гемостазу. Наявність у молекулі плазміногену кринглових структур, що забезпечують зв'язування молекули з різними лігандами, у тому числі і з фібрином, α_2 -антиплазміном, тромбоспондином, клітинними рецепторами обумовлює спрямованість протеолітичної дії активного ферменту на той чи інший субстрат. Порушення активаторно-інгібіторного балансу та надмірна активація ферментів, фізіологічно присутніх у кровотоці, а також вивільнення у позаклітинний простір клітинних протеїназ обумовлює часткову фрагментацію плазміногену та утворення низки його деградованих похідних. Останні можуть містити активний центр ферменту у комбінації з різними крингловими структурами, а отже потенційно можуть зв'язуватися та розщеплювати широкий спектр субстратів. Поява таких протеолітично ушкоджених форм плазміногену супроводжує розвиток деяких патологій. Так, відповідно до робіт Веревки С.В. та співавт. [260], плазма хворих із злякисними новоутвореннями верхніх дихальних шляхів містить набір протеолітично активних фрагментів плазміногену.

Тому, враховуючи вищевикладене та результати наших попередніх досліджень щодо певної активізації протеолітичних реакцій та зниження вмісту плазміногену у хворих з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, наступний етап досліджень передбачав оцінити вміст протеолітично активних форм плазміногену у плазмі крові пацієнтів за обох патологічних станів.

Для реалізації поставленої мети було використано метод ензим-електрофорезу із заполімеризованим у розділяючий гель фібриногеном. Відповідно до одержаних результатів (рис. 5.2), у зразках плазми крові умовно здорових донорів було виявлено лише одну смугу протеолітичної активності, локалізація якої в області 85 кДа відповідає молекулярній масі плазміну, у той час як зразки плазми пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету окрім плазміну додатково містили активні форми ферменту з молекулярними масами у діапазоні 36-56 кДа. Їх поява слугує підтвердженням активізації протеолітичних процесів та посилення деградації плазміногену за розвитку обох патологічних станів. Для виявлення так званих «латентних» деградованих форм плазміногену, потенційно здатних до активації, зразки плазми крові попередньо інкубували з стрептокіназою, яка належить до ефективних екзогенних активаторів плазміногену. За таких умов на електрофореграмах з'являлася низка додаткових смуг, обумовлених присутністю саме протеолітично активних форм плазміногену. При цьому, якщо у зразках донорів з'являлася лише одна смуга (56 кДа), то у групах пацієнтів з інсультом було ідентифіковано ряд смуг різної молекулярної маси, зокрема, 36, 38, 40, 42 кДа. Поява протеолітично активних форм у відповідь на дію специфічного активатора дозволяє віднести їх до деградованих похідних плазміногену, що зберегли активний центр ферменту.

Варто відмітити, що розщеплення плазміногену на окремі фрагменти, які відповідають крингловим структурам вихідної молекули, є відомим явищем. Дані фрагменти, об'єднані під загальною назвою ангіостатини, досить повно описані у сучасній літературі з позицій їх будови та біологічних ефектів [261,262]. Не зважаючи на досить широкий спектр властивостей, зокрема їх антиадгезивні,

протизапальні, антиангіогенні властивості, прискорення апоптозу клітин, ангіостатини не мають ферментативної активності.

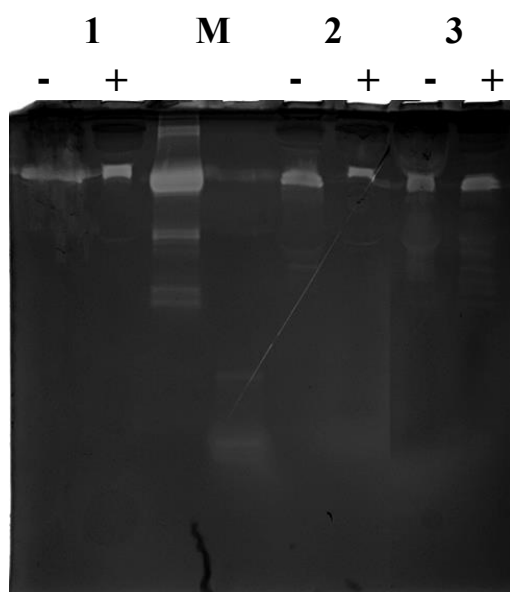


Рис. 5.2. Типова ензим-електрофореграма зразків плазми крові умовно здорових донорів (1), пацієнтів з ішемічним інсультом (2) та за наявності в анамнезі цукрового діабету 2 типу (3) без обробки проб стрептокіназою (-) та після обробки проб стрептокіназою (+): М – маркери молекулярних мас (86 кДа плазмін, 36 кДа міні-плазмін, 23 кДа трипсин)

Порівнюючи результати ензим-електрофоретичного аналізу для пацієнтів з інсультом в обох дослідних групах виявлено, що у плазмі крові хворих на ішемічний інсульт без цукрового діабету присутній фермент з молекулярною масою біля 23 кДа. Його відсутність у пробах, що не були проінкубовані з стрептокіназою, свідчить, що це один з протеолітично активних фрагментів плазміногену. Відповідність за молекулярною масою (26 кДа) виявленого нами фрагменту легкому ланцюгу плазміногену, який власне і формує активний центр ферменту та має виражену гомологію з трипсином, хімотрипсином та еластазою, дозволяє припустити, що це може бути позбавлений кринглів легкий ланцюг. Відсутність опосередкованих кринглами сайтів зв'язування з відповідними субстратами та інгібіторами обумовлює відносно широку субстратну специфічність даної молекули та її «неконтрольованість» з боку інгібіторів.

Отже, на основі результатів проведених досліджень можемо зробити висновок, що гостра фаза інсульту характеризується певною активізацією протеолітичних реакцій, наслідком чого є накопичення у плазмі крові хворих

протеолітично активних похідних плазміногену. Певні відмінності якісного складу деградованих форм у хворих з інсультом окремо та інсультом на фоні цукрового діабету, зокрема присутність у зразках плазми пацієнтів з діабетом більшої кількості смуг, свідчить, що метаболічні порушення, спричинені патогенезом цукрового діабету, також призводять до розщеплення молекули плазміногену та утворення протеолітично активних фрагментів.

Серед молекул, порушення метаболічних перетворень яких виявляється за різних патологічних станів, незалежно від їх етіології, та часто є не лише наслідком, а й одним з пускових чинників їх розвитку, вирізняють серотонін.

Серотонін (5-гідрокситраптамін, 5-НТ) – біогенний амін, який залучений у регуляцію низки важливих функцій організму, як на периферії, де він синтезується ентерохромафінними клітинами шлунково-кишкового тракту і виконує функції гормону, так і у ЦНС, де дана сполука утворюється у серотонінергічних нейронах стовбуру головного мозку і є одним з нейромедіаторів. Доведено, що серотонінергічні нейрони шва середнього мозку інервують судини головного мозку, впливаючи, таким чином, на інтенсивність мозкового кровопостачання. Серотонін, як медіатор запалення, потенціює запальні реакції та модулює імунну відповідь; регулює тонус гладеньком'язевих клітин судинної стінки та артеріальний тиск; впливає на агрегацію тромбоцитів [263,264].

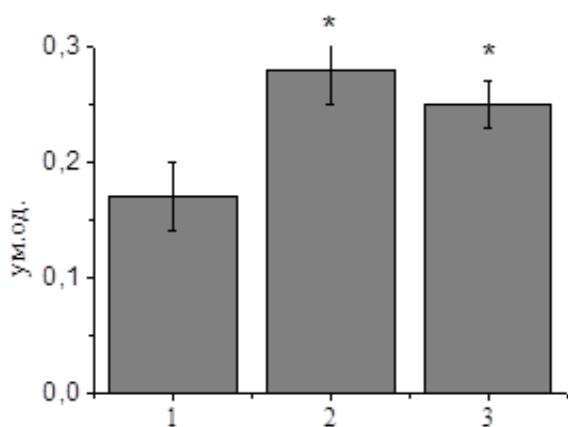
Тому молекулярно-біохімічні порушення на рівні окремих ланок метаболізму серотоніну, шляхів його транспортування через клітинні мембрани та депонування, що призводять до змін концентрації серотоніну як у ЦНС, так і на периферії, можуть бути однією з вагомих патологічних основ формування нейроендокринного, імунологічного дисбалансу, підтримання прозапальних реакцій та, як наслідок, розвитку цереброваскулярних захворювань.

Зважаючи на різноманітність біологічних ефектів серотоніну, у тому числі і його безпосередню залученність у регуляцію функціонування судинно-тромбоцитарної ланки гемостазу, на наступному етапі роботи було порівняно

концентрацію периферійного серотоніну за розвитку ішемічного інсульту та інсульту, ускладненого цукровим діабетом.

Як бачимо з наведених результатів (рис. 5.3 А), постінсультний період характеризується зростанням концентрації серотоніну, яка перевищує контрольний показник у 1,64 рази. За інсульту, ускладненого цукровим діабетом 2 типу, також було виявлено зростання рівня сироваткового серотоніну, проте дещо менш виражене, якщо порівнювати з результатами лише за ішемічного інсульту.

А



Б

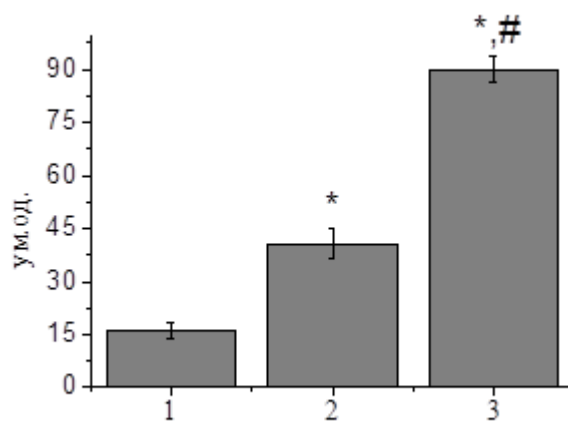


Рис. 5.3. Концентрація серотоніну (А) та триптофану (Б) у сироватці крові пацієнтів:

1 – умовно здорові донори, n=35;

2 – пацієнти з ішемічним інсультом, n=44;

3 – пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, n=24

* статистично достовірно відносно показника у групі умовно здорових донорів, $P \leq 0,05$; # статистично достовірно відносно показника у групі пацієнтів з ішемічним інсультом, $P \leq 0,05$

Так, концентрація серотоніну у крові пацієнтів даної групи була у 1,47 рази вищою за показник у групі умовно здорових донорів. Варто зазначити, що тимчасове локальне підвищення концентрації серотоніну є одним з механізмів забезпечення процесу згортання крові у місці пошкодження судинної стінки, проте

тривале системне зростання концентрації даного агенту сприятиме посиленню тромбоутворення та розвитку гіперкоагуляційного стану.

Зміни вмісту серотоніну можуть бути результатом поєднання ряду чинників, що включають порушення на рівні реакцій синтезу та деградації чи механізмів надходження серотоніну до клітин-депо. Зростання сироваткового серотоніну у групі пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету може відбуватися внаслідок посилення його синтезу ентерохромафінними клітинами гастроінтестинального тракту при одночасному посиленні його надходження у кровотік [265,266]. Так, морфологічний аналіз ентерохромафінних клітин у щурів з тривалим діабетом виявив присутність великих серотонін-позитивних клітин, що дозволило авторам зробити висновок про посилення синтезу даного аміну [267].

Одержані нами результати у групі пацієнтів з ішемічним інсультом не дозволяють зробити однозначний висновок чи зміни концентрації серотоніну відбувалися безпосередньо у гостру фазу інсульту, чи передували певний час маніфестації захворювання. Проте у будь якому випадку підвищений рівень серотоніну через його вплив на тромбоутворення, посилення коагуляційної та зниження фібринолітичної активності крові сприятиме ускладненню перебігу захворювання.

Враховуючи, що близько 10% всього периферійного серотоніну депонується у тромбоцитах, виявлене нами зростання концентрації серотоніну за обох патологічних станів може бути пов'язано з активацією тромбоцитів та вивільненням з їх щільних гранул серотоніну. Такі результати узгоджуються із встановленим раніше підвищенням показників АДФ-залежної агрегації тромбоцитів, зокрема, зростанням швидкості та максимальної амплітуди агрегації у групі пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету.

Вивільнення серотоніну є не лише наслідком активації тромбоцитів, а й одним з механізмів посилення даного процесу. Сам по собі серотонін є слабким агоністом процесу агрегації, проте його зв'язування з 5-НТ2А рецепторами тромбоцитарної мембрани потенціює реакцію тромбоутворення у відповідь на дію

інших стимулів – АДФ, колагену, тромбоксану А2 [268]. За цих умов підвищення локальної концентрації серотоніну у місцях ушкодження судин обумовлює спазм судин, адже відомим є вазоконстрикторний ефект серотоніну. В експериментах на моделі спонтанно-гіпертензійних щурів (SHR) застосування блокаторів серотонінових рецепторів нівелювало розвиток гіпертензії [269].

Ще одним механізмом зростання прокоагулянтної активності тромбоцитів за підвищених концентрацій серотоніну є його здатність посилювати захоплення тромбоцитами мікровезикул тканинного фактору [270], частина якого, окрім зв'язаного з мембранами ендотеліоцитів, гладеньком'язевих клітин, макрофагів, моноцитів та лейкоцитів стану, перебуває у вільній циркулюючій формі [271].

Накопичення серотоніну може сприяти посиленню протромбогенного стану внаслідок його здатності впливати на експресію генів ряду факторів, залучених у регуляцію функціонування коагуляційної та фібринолітичної ланок системи гемостазу. Так, в експериментах на культурі ендотеліальних клітин аорти щурів Kawano H. et al (2001) було продемонстровано здатність серотоніну стимулювати експресію генів тканинного фактору та ПАІ-1, у той час як достовірно значимих змін концентрації ТАП та інгібітору шляху тканинного фактору (TFPI) виявлено не було [272]. Як зазначалося вище, важливу роль у підтриманні рівня сироваткового серотоніну відіграють тромбоцити, які накопичують його у щільних гранулах. Транспорт серотоніну через тромбоцитарну мембрану відбувається за участі серотонінового транспортеру (serotonin transporter, SERT) – представника суперродини SLC6 Na^+/Cl^- -залежних переносників [273]. Значимість даного транспортеру підтверджена у досліджах на SERT-нокаутних (-/-) мишах, де було показано збільшення вмісту сироваткового серотоніну у цих тварин, зміни регуляції деяких 5-HT рецепторів, розвиток агресивно-депресивних станів, порушення циркадних ритмів, підвищену тягу до алкоголю та наркотичних речовин, а також накопичення надмірної ваги [274]. Функціонування SERT у відповідь на зростання у сироватці концентрації серотоніну має двофазний характер – спочатку спостерігається посилення поверхневої експресії молекул SERT; проте у

подальшому має місце зниження рівня даного транспортеру і, відповідно, зниження надходження серотоніну у середину тромбоцитів [275]. Зниження кількості SERT на поверхні мембран тромбоцитів першочергово пов'язано з підвищенням концентрації серотоніну у цитозолі внаслідок насичення та інактивації везикулярного транспортеру моноамінів (vesicular monoamine transporter, VMAT) і пригнічення транспортування серотоніну до щільних гранул. Наслідком зростання внутрішньоклітинного серотоніну є декілька подій. По перше, це обумовлює серотонілювання та активацію білка Rab4 наслідком чого є його асоціація з цитозольною формою SERT та пригнічення транспортування SERT до плазматичної мембрани тромбоцитів [276]. По друге, за даних умов посилюється екзоцитоз щільних гранул та α -гранул, що призводить до вивільнення у кров'яне русло додаткових кількостей серотоніну, а також прокоагулянтів з α -гранул.

Тромбоцити хворих на ожиріння характеризуються зниженою функціональною активністю SERT – автори роботи [277] виявили чітку негативну кореляцію між активністю SERT та індексом маси тіла, а оскільки пацієнти у дослідній групі з інсультом на фоні цукрового діабету мали надлишкову вагу, можемо припустити, що підвищення концентрації серотоніну частково обумовлено функціональною неспроможністю серотонінового транспортеру.

Зростання концентрації сироваткового серотоніну може вносити певний вклад у генералізацію запального процесу, адже відомо, що серотонін належить до медіаторів запалення. тому виявлене нами зростання концентрації серотоніну у хворих в обох дослідних групах певною мірою узгоджується з підвищеним вмістом прозапальних цитокінів, зокрема, інтерлейкіну-6. Автори роботи [278] експериментально довели, що серотонін, діючи на 5-HT_{2A} рецептори васкулярних гладеньком'язевих клітин, індукує синтез інтерлейкіну-6, посилюючи, у такій спосіб, місцеву запальну реакцію при атеросклеротичному ураженні судин.

Виявлене нами зростання рівня сироваткового серотоніну може бути наслідком залучення всіх вищеперерахованих механізмів підтримання та регуляції рівня серотоніну. Дещо вищий показник у групі хворих виключно на ішемічний

інсульт може бути результатом стресової гіперактивації гіпоталамо-гіпофізарно-наднирничкової системи, для якої даний серотонін є нейрогуморальним тригером, у відповідь на гострий стрес та посилене метаболічне навантаження.

Зважаючи на багатофункціональність серотоніну, можемо говорити, що зміни концентрації серотоніну, як супутній прояв патогенезу основного довготривалого метаболічного розладу (цукрового діабету, ожиріння чи метаболічного синдрому), є однією з передумов розвитку макроангіопатій та порушень на рівні серцево-судинної системи. Разом з тим зростання рівня сироваткового серотоніну у гостру фазу інсульту через виражений вплив на функціонування окремих компонентів судинно-тромбоцитарної, плазменної та фібринолітичної ланок системи гемостазу може сприяти прогресуванню порушень та у цілому може розглядатися як негативний прогностичний маркер подальшого перебігу захворювання.

Наступний етап роботи було присвячено аналізу вмісту триптофану, який є безпосереднім попередником під час синтезу серотоніну та впливає на швидкість його утворення. Додатковим аргументом на користь дослідження вмісту даної амінокислоти слугувала представлена у літературі інформація щодо існування кореляції між вмістом триптофану та розвитком цереброваскулярних ускладнень [279]. За іншими даними зміни концентрації сироваткового триптофану є предиктором ризику розвитку цукрового діабету 2 типу [280].

У ході проведених досліджень було виявлено значні відмінності концентрації триптофану у сироватці крові пацієнтів як у порівнянні з контрольною групою, так і при порівнянні між групами (рис. 5.3 Б). Так, концентрація триптофану у групі пацієнтів з ішемічним інсультом перевищувала значення контролю у 2,52 рази. Концентрація триптофану у групі хворих з інсультом на фоні цукрового діабету, була у 5,58 рази вище контролю і у 2,21 рази вище за аналогічний показник у пацієнтів лише з ішемічним інсультом. Більш виражені зміни досліджуваного показника у хворих на цукровий діабет можуть бути пов'язані з комплексними та хронічними обмінними порушеннями, обумовленими патогенезом основного

захворювання, у той час як за лише ішемічного інсульту дані зміни вірогідніше за все є результатом не стільки довготривалих метаболічних перебудов, скільки відображають відповідь організму на гострий стрес.

Відомо, що за умов фізіологічної норми пул вільних амінокислот у тканинах організму є досить стабільним та постійним, тому його зміни вказують на значні метаболічні порушення та у деяких випадках можуть слугувати вагомим діагностичним маркером розвитку певних патологій [281]. Зокрема, у ряді досліджень показано, що розвитку захворювань нирок та гепатобіліарної системи передуює зміна рівнів вільних амінокислот у сироватці крові, а саме амінокислот із розгалуженим ланцюгом (branched-chain amino acids, BCAA) і ароматичних амінокислот [282].

В обох випадках зростання концентрації триптофану може бути безпосереднім наслідком інтенсифікації процесів метаболізму білків, що характерно як для розвитку ішемічного інсульту незалежно від наявності супутніх захворювань, так і для патогенезу цукрового діабету. Так, згідно результатів низки клініко-біохімічних досліджень, тривале підвищення концентрації інсуліну стимулює катаболізм білків у тканинах, а гостра фаза розвитку інсульту супроводжується гіперфункцією деяких кірково-підкіркових структур, серцево-судинної системи, наднирників, що обумовлює порушення обміну білків та, відповідно, зміни вмісту вільних амінокислот у сироватці крові. При цьому у хворих з гострими порушеннями мозкового кровообігу за ішемічним типом та хронічною ішемією мозку мають місце не якісні зміни амінокислотного складу, а дисбаланс між вмістом окремих амінокислот. Незважаючи на ряд публікацій, присвячених даній тематиці, однозначних даних стосовно того, зміни вмісту яких амінокислот чітко корелюють з проявом ішемічного інсульту, у сучасній літературі не представлено. За даними одних авторів для гострого періоду ішемічного інсульту характерне підвищення сироваткового рівня майже всіх амінокислот з найбільш вираженими змінами для фенілаланіну, лейцину, валіну [283]; інші дослідники, навпаки, відмічають статистично достовірне зростання вмісту лише аспарагінової кислоти, аланіну на

фоні зниження вмісту треоніну, триптофану, метіоніну, валіну, серину, лейцину та відсутності змін вмісту лізину, аргініну, тирозину [284].

Активізація катаболічних реакцій і, як наслідок, зміна концентрації триптофану у цілому узгоджується з показаним нами раніше зниженням концентрації загального білка у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу.

Основною транспортною формою триптофану у крові є нековалентний комплекс між ним та альбуміном. Так транспортується близько 50-80% триптофану, решта перебуває у вільному вигляді [285]. Показане нами на попередньому етапі роботи зниження концентрації альбуміну у хворих з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету 2 типу, сприятиме порушенню співвідношення між вільним та зв'язаним триптофаном у бік зростання концентрації вільного триптофану.

Наявність в анамнезі пацієнтів з ішемічним інсультом цукрового діабету, а також їх надлишкова вага слугують додатковими чинниками, що посилюють порушення даного співвідношення за рахунок зростання у сироватці крові концентрації вільних жирних кислот, які конкурують з триптофаном за місця зв'язування з альбуміном та витісняють його з альбумінового комплексу [286,287,288].

Перетворення триптофану може відбуватися за двома основними шляхами. Більша частина метаболізує за L-кінуреніновим шунтом з утворенням кінуреніну та його похідних і лише близько 5-10% від загальної кількості триптофану перетворюється на серотонін [289].

Тому можемо припустити, що зростання концентрації триптофану сприятиме активізації шляхів його метаболізму. Саме активація периферійного серотонінового шляху може бути однією з причин встановленого нами підвищення рівня сироваткового серотоніну. Поряд з цим можливим є посилення перетворення триптофану за кінуреніновим шляхом.

Біологічна роль кінуренинового шляху полягає у регуляції вмісту сироваткового триптофану; утворені необхідної для синтезу НАД⁺ нікотинової кислоти. Метаболіти даного шляху здійснюють регулюючий вплив на функціонування нервових клітин; залучені у модуляцію активності макрофагів. Окрім того, один з проміжних метаболітів - кінуренинова кислота, виявляє певний антиоксидантний ефект інгібуючи активність ксантинооксидази, внаслідок чого знижується продукція АКМ [290]. Проте за умов розвитку захворювань, патогенез яких характеризується інтенсифікацією вільнорадикальних реакцій чи розвитком хронічного запального процесу, відбувається порушення узгодженості та скоординованості у функціонуванні окремих ферментів кінуренинового шляху. Так, підвищені рівні прозапальних цитокінів (IL-1, -2, 6, TNF α , IFN γ), АКМ викликають посилення експресії генів ферменту індоламін-2,3-диоксигенази (КФ 1.13.11.52) за межами печінки, який є основним органом, де протікає метаболізм триптофану та кінуреніну і за фізіологічних умов забезпечує перетворення до 95% всього триптофану, що не включився у синтетичні процеси [291]. Слід зазначити, що основним ферментом перетворення триптофану є печінкова триптофан-2,3-диоксигеназа (КФ 1.13.11.11). Поряд з цим відбувається активація інших ферментів даного шляху, зокрема, кінуренін-3-монооксигенази, що у кінцевому результаті призводить до порушення збалансованості перебігу ферментативних реакцій та зміщенню метаболізму кінуреніну у бік утворення токсичних продуктів. Деякі метаболіти кінуреніну виявляють нейротоксичний ефект, викликаючи апоптоз астроцитів і меншою мірою нейронів, що послаблює нейрогліальні взаємодії та призводить до зниження синтезу нейротрофічних факторів [292]. Інші можуть впливати на обмін вуглеводів. Так, наприклад, ксантуренова кислота здатна утворювати комплекс з інсуліном, що унеможлиблює подальшу взаємодію гормону з інсуліновими рецепторами. Як наслідок, утруднюється надходження глюкози у середину клітини [293].

Нестача вітаміну В6, яка часто спостерігається у хворих на цукровий діабет, спричиняє порушення катаболічних перетворень 3-гідрокскінуреніну. За даних

умов спостерігається накопичення ксантуренату - метаболіту, який за фізіологічних умов не утворюється. Ксантуренат здійснює токсичний вплив на β -клітини підшлункової залози, що є одним з патогенетичних факторів розвитку цукрового діабету. За умов посиленого розпаду триптофану додаткові кількості периферійного кінуреніну стають доступними для подальшого метаболізму у головному мозку, оскільки кінуренін легко проникає через гематоенцифалічний бар'єр, що на фоні супутніх ішемії запального процесу та оксидативного дисбалансу створює передумови для накопичення нейротоксичних метаболітів та сприяє формуванню додаткових механізмів ураження клітин головного мозку. Зростання концентрації хінолінової кислоти, 3-гідрокскінуреніну, 3-гідроксиантранілової кислоти, які є джерелами утворення вільних радикалів, призводить до зростання рівня клітинних оксидантів [294]. Відомо, що активація кінуренінового шляху метаболізму триптофану часто пов'язана з розвитком оксидативного стресу та запального процесу. Так, у сироватці крові пацієнтів з захворюваннями, патогенез яких ускладнений хронічними запальними процесами, виявляються підвищені концентрації як кінуреніну, так і продуктів перекисного окиснення ліпідів та білків гострої фази [295,296]. Важливість підтримання певного сталого рівня сироваткового триптофану знайшла підтвердження у ряді публікацій, де автори показали існування чітких взаємозв'язків між активацією кінуренінового шляху та розвитком низки патологічних станів, у тому числі і спричинених порушеннями на рівні серцево-судинної системи. Так, у роботі [297] показано, що накопичення кінуреніну співвідноситься з тяжкістю перебігу інсульту і розміром зон ураження головного мозку. Виявлено, що активація ІДО1 зазвичай відбувається на початкових етапах розвитку атеросклерозу і передуює появі виражених клінічних симптомів [298]. Активність даного ферменту значно підвищена у хворих з коронарною серцевою недостатністю та ішемічною хворобою серця [300]. Зростання співвідношення триптофану до кінуреніну корелює зі зростанням концентрації ЛПВЩ, триацилгліцеролів, індексу маси тіла та зниженням вмісту ЛПВЩ [301]. Таким чином, накопичення триптофану через потенційну активацію кінуренінового

шляху його метаболізму, слугує додатковим патогенетичним механізмом індукції та прогресування ускладнень на рівні клітин головного мозку.

Підсумовуючи результати проведених досліджень, можемо зауважити, що постінсультний період як окремо, так і на фоні цукрового діабету, характеризується розвитком низки неспецифічних проявів, першочергово асоційованих з порушеннями на рівні контролю та функціонування окремих ланок системи протеолізу. Одним з наслідків вищевказаних змін є зростання вмісту та активності низки ферментів, зокрема, ММП-2 і ММП-9 та поява у кровотоці протеолітично активних похідних плазміну, які, з огляду на відсутність визначеної субстратної специфічності, характерної для вихідної молекули плазміногену, можуть слугувати вагомим патогенетичним фактором ескалації клінічної симптоматики захворювання. Опосередкованим підтвердженням катаболічної спрямованості обмінних процесів за ішемічного інсульту окремо та на фоні цукрового діабету 2 типу, слугує зниження вмісту загального білка у сироватці крові пацієнтів. Неконтрольована активізація протеолітичних процесів належить до чинників, що обумовлюють формування стану ендогенної інтоксикації, ідентифікованого нами за накопиченням у крові хворих молекул середньої маси та олігопептидів. При цьому, зниження концентрації альбуміну, виявлене для більшості пацієнтів обох дослідних груп, сповільнює виведення із кровотоку найбільш агресивних гідрофобних ендотоксинів, сприяючи у такий спосіб порушенню внутрішньоклітинного та загального гомеостазу. За таких умов зростання вмісту цитокінів інтерлейкіну-6 та TNF- α (більш значуще для хворих з цукровим діабетом) виступає не лише свідченням активізації запальних процесів в організмі хворих, а й через широкий спектр їх біологічної активності є вагомим патогенетичним механізмом індукції та прогресування серцево-судинних ускладнень.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Щорічно у світі реєструється близько 6 млн. випадків інсульту. За даними ВООЗ, смертність від інсультів становить 12-15% від загального показника, тобто посідає друге-третє місце після серцево-судинних та онкологічних захворювань. Інсульт займає третє місце серед причин смертності і перше у структурі стійкої втрати працездатності. Не зважаючи на значні превентивні та профілактично-лікувальні заходи, кількість хворих з даною патологією не знижується, а навпаки невпинно зростає, що не в останню чергу пов'язано із зростанням відсотку осіб, які з огляду на свій спосіб життя чи наявність в анамнезі певних хронічних захворювань, входять до групи ризику виникнення гострих порушень мозкового кровопостачання. Саме цукровий діабет 2 типу, особливо на фоні надлишкової ваги, є тим патологічним станом, метаболічні порушення за розвитку якого створюють суттєве підґрунття для виникнення ускладнень, що лежать в основі розвитку та прогресування ішемічного інсульту.

Тому розширення спектру показників, які можуть бути використані для більш об'єктивної оцінки стадії захворювання та подальших прогнозів щодо реабілітації пацієнтів є вкрай необхідним та сприятиме індивідуалізації організаційних підходів під час планування обсягу терапевтичної та діагностичної допомоги хворим.

Оскільки порушення у системі гемостазу часто є визначальним фактором виникнення інсультів різного генезу, актуальним видається проведення досліджень, спрямованих на виявлення особливостей у функціонуванні ключових компонентів системи гемостазу як метаболічного підґрунття розвитку серцево-судинних ускладнень та основи для прогресування і маніфестації ішемічного інсульту, а також вивчення біохімічних проявів інсульту, обумовлених розвитком неспецифічних реакцій організму у відповідь на інтенсифікацію патологічного процесу. У зв'язку з цим необхідні більш детальні дослідження стану системи гемостазу при цукровому

діабеті, встановлення взаємозв'язків між порушеннями функціонування системи гемостазу та реалізацією ускладнень, що розвиваються у результаті цієї патології.

Саме тому стратегії, спрямовані на подолання хвороби, мають включати не лише терапевтичні підходи, направлені на відновлення порушених у результаті ішемії функцій та усунення умов, що сприяють виникненню повторних рецидивів захворювання, а й включати комплексний моніторинг стану пацієнтів, що перебувають у групі ризику розвитку ішемічного інсульту.

Враховуючи порушення, які виникають на рівні функціонування системи гемостазу як у цілому, так і на рівні її окремих складових, у формування патофізіологічного підрунтя розвитку інсульту, нами було проведено комплексну оцінку вмісту та активності ключових ефекторів системи гемостазу.

За результатами дослідження було підтверджено протромбогенний характер реакцій у системі гемостазу, оцінений за накопиченням у кровотоці визнаного маркера тромбонемії – розчинних фібрин-мономерних комплексів. Одержані результати повністю узгоджуються з виявленим нами зростанням активності фактору X у пацієнтів обох дослідних груп [302, 303].

Свідченням патологічної активації тромбіну за умов інсульту як окремо, так і на фоні цукрового діабету, слугує виявлене нами накопичення у плазмі крові хворих низки продуктів розщеплення протромбіну, об'єднаних загальною назвою «протромбіновий пул», частина з яких, діючи на тромбоцити, здатна викликати їх вторинну необоротну агрегацію.

За таких умов зростання концентрації фібриногену (на 33% для хворих з ішемічним інсультом та на 40% для хворих з інсультом на фоні цукрового діабету) не лише обумовлює підвищення в'язкості крові, сприяє стабілізації тромбоцитарної пробки, а і як безпосередній попередник фібрину та субстрат для тромбіну, створює суттєві передумови для розвитку стану тромбонемії.

Підтриманню протромбогенної спрямованості реакцій у системі гемостазу сприяє виснаження фібринолітичного резерву (подовження часу лізису еуглобулінової фракції та Хагеман-залежного фібринолізу) та зниження

функціональної активності даної системи. Виявлене нами пригнічення відносної активності плазміногену (на 14% та 18%, відповідно, у групі пацієнтів з ішемічним інсультом окремо та на фоні цукрового діабету) може бути результатом дисбалансу вмісту його основних регуляторів – ТАП, ПАІ-1, антиплазміну. При цьому знижується ймовірність утворення кількостей плазміну, відповідних потребам організму, та необхідних для відновлення рівноваги між процесами коагуляції і фібринолізу. Виявлені нами зміни у системі фібринолізу було доведено на основі розрахунку індексу тромботичного ускладнення (ІТУ) – інтегрального показника, який дозволяє оцінити потенціал даної системи.

Певним підтвердженням активації процесів зсідання крові у пацієнтів обох дослідних груп є зниження відносної активності інгібітору системи згортання крові – протеїну С, адже даний білок активно залучається у реакції інгібування білкових кофакторів, які є необхідними для процесу активації фактору X та подальшого перетворення протромбіну у тромбін. Зниження активності протеїну С може бути не лише результатом його активного використання у відповідь на посилення коагуляції, але й самостійним фактором, що відображає гемостатичну активацію у гострий період ішемічного інсульту.

З огляду на дані, отриманні у ході дослідження, можемо стверджувати, що своєчасний моніторинг основних маркерів, які дозволяють оцінити стан та спрямованість реакцій у системі гемостазу, є вкрай необхідним для максимально раннього виявлення прокоагулянтних порушень та попередження розвитку тромбозів.

Дисфункціонування у системі гемостазу не лише передують і деякою мірою обумовлюють виникнення ішемічного інсульту. Можлива й інша ситуація, коли некроз тканин головного мозку є тригером процесу внутрішньо судинної коагуляції, оскільки вогнища розпаду тканин при ішемії слугують джерелом надходження у кровоток потужного прокоагулянтного агента – тромбопластину, що призводить до розвитку явища стійкої гіперкоагуляції та декомпенсації фібринолітичної системи.

Таким чином, скорочення часу зсідання плазми крові у тесті «анцистроновий час» на фоні підвищення концентрації фібриногену, появи у кровотоці маркерів тромбонемії - розчинних фібрин-мономерних комплексів та накопичення проміжних похідних протромбіну свідчать про розвиток стану гіперкоагуляції у пацієнтів, які перенесли ішемічний інсульт. При цьому у хворих, які мають в анамнезі цукровий діабет, значення показників, що дозволяють оцінити стан коагуляційної ланки системи гемостазу, були дещо вищими у порівнянні з результатами у групі з ішемічним інсультом окремо. Протромбогенний стан системи гемостазу у хворих на цукровий діабет є цілком закономірним явищем, враховуючи, що патогенез діабету часто може супроводжуватися тривалою гіперглікемією і призводити до накопичення структурно-модифікованих молекул внаслідок посилення реакцій глікозилювання та активізації вільно радикальних процесів; ушкодження клітинних мембран; активації клітинної ланки імунітету. Зазначені порушення є однією з патогенетичних основ структурно-функціональних змін судинної стінки та розвитку ангіопатій.

Результати клініко-лабораторного обстеження, проведеного на момент надходження хворих до стаціонару, виявили наявність стадії декомпенсації цукрового діабету у більшості пацієнтів з даним захворюванням (середній рівень глікемії складав $9,4 \pm 2,6$ ммоль/л) [304,305], що відповідно до вище зазначеного створювало суттєві передумови для ініціації порушень у системі гемостазу та подальшого виникнення ішемічного інсульту.

Вагомим чинником, що не лише значно ускладнює патогенез базового захворювання, а й безпосередньо здатен спровокувати розвиток ускладнень на рівні серцево-судинної системи, є наявність у пацієнтів у групі з інсультом на фоні цукрового діабету ще й ожиріння, оціненого за показником індексу маси тіла хворих ($34,0 \pm 5,4$ кг/м²).

Відсутність відхилень концентрації глюкози ($4,9 \pm 1,3$ ммоль/л) від нормальних величин, а також значення індексу маси тіла ($20,2 \pm 1,6$ кг/м²) у межах фізіологічної норми у групі пацієнтів з ішемічним інсультом окремо, дозволяє

припустити, що незважаючи на схожу клінічну картину та однакову спрямованість змін проаналізованих показників системи гемостазу, порушення, що призвели до виникнення комплексу змін у системі гемостазу, могли реалізуватися на певних етапах розвитку патологічного процесу за дещо відмінними механізмами.

Значна частина хворих з цукровим діабетом мали ускладнення, які є визнаними факторами ризику розвитку ішемічного інсульту (гіпертензія – 47%, ішемічна хвороба серця – 35%). Дані порушення було виявлено і у групі пацієнтів з ішемічним інсультом окремо, проте відсоток хворих з подібними ускладненнями був дещо нижчим. Свідченням значних метаболічних порушень, безпосередньо асоційованих з розладами у функціонуванні системи гемостазу, є наявність у пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету ангіопатій периферійних судин (20% хворих у порівнянні з 9% хворих у групі з ішемічним інсультом окремо).

До факторів, що обумовлюють розвиток порушень, тісно асоційованих з серцево-судинними патологіями, а за деякими класифікаціями входять до групи факторів ризику виникнення ішемічного інсульту, належать порушення обміну ліпідів та розвиток дисліпідемії. В умовах нашого дослідження для 32% хворих у групі з ішемічним інсультом та для 48% у групі пацієнтів, які додатково страждали ще й на цукровий діабет 2 типу була характерна гіперліпідемія.

Аналіз ліпідного профілю у сироватці крові пацієнтів обох дослідних груп виявив наявність відхилень значень вмісту окремих ліпідних фракцій, що дозволяє говорити про стан дисліпідемії, зокрема, у хворих з цукровим діабетом. Так, було виявлено зростання концентрації холестеролу (на 45%), триацилгліцеролів (на 28%), ЛПНЩ (на 57%) на фоні зниження рівня ЛПВЩ (на 30%). Особливо негативним прогностичним маркером є накопичення у сироватці крові пацієнтів з інсультом атерогенних ліпопротеїдів (перевищення норми на 30% та 57%, відповідно, у групі з інсультом окремо та інсультом на фоні цукрового діабету), які, з огляду на невеликі розміри, легко проникають через шар ендотелію та акумулюються у судинній стінці викликаючи апоптоз гладенько м'язових клітин. Оксидативний

стрес та гіперглікемія, характерні для патогенезу цукрового діабету, слугують додатковими чинниками, що сприяють підвищенню патологічного потенціалу даних молекул. Модифіковані ліпопротеїни погано розпізнаються рецепторами печінки та повільніше виводяться з кровотоку, проте легше проникають у стінку судин та поглинаються макрофагами, сприяючи трансформації останніх у збагачені на холестерин «пінисті клітини».

Оскільки формування судинних патологій головного мозку відбувається переважно на фоні атеросклеротичних змін сонних та церебральних артерій значні відхилення показників ліпідограми від значень фізіологічної норми свідчать про тривале порушення обміну ліпідів, що на фоні каскаду метаболічних розладів, супутніх патогенезу цукрового діабету, може спровокувати розвиток атеросклерозу та утворення не міцних схильних до швидкого розриву атеросклеротичних бляшок.

Ініціація цілого комплексу молекулярно-біохімічних порушень, спричинених гіперглікемією (оксидативний стрес, накопичення кінцевих продуктів глікування, окисно модифікованих молекул, продуктів пероксидації ліпідів) та дисліпідемією (холестеринемія, триаацилгліцеридимія, підвищений рівень ЛПНЩ, атерогенних ліпопротеїдів та понижений рівень ЛПВЩ) можуть стати однією з причин розвитку ендотеліальної дисфункції у хворих з інсультом на фоні цукрового діабету.

Підтвердженням наявності ендотеліальної дисфункції у групі пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету є зростання у сироватці крові пацієнтів відносного вмісту фактору фон Вілебранда (на 65%), який синтезується ендотеліальними клітинами у відповідь на порушення структурної цілісності судин та є визнаним маркером, що відображає структурно-функціональний стан ендотеліоцитів. Підвищення вмісту даного фактору було виявлено і у хворих з ішемічним інсультом окремо (на 45%), що також слугує свідченням наявності певних порушень у функціонуванні ендотеліоцитів у гостру фазу ішемічного інсульту [306,307].

На сьогодні ішемічний інсульт не розглядається як окреме незалежне захворювання чітко визначеної етіології, а часто є наслідком комплексу змін,

обумовлених наявністю одного чи декількох факторів ризику судинних захворювань. Аналіз результатів загально-клінічних показників пацієнтів у групі з ішемічним інсультом свідчить, що більшість хворих перебували у групі ризику виникнення судинних ускладнень, адже мали гіпертензію, ішемічну хворобу серця, гіперліпідемію. Окрім того, необхідно враховувати вік пацієнтів, можливу генетичну схильність, а також існування факторів ризику, потенційно пов'язаних зі способом життя – низький рівень фізичної активності, гострий стрес або тривале психоемоційне навантаження.

За таких умов рано чи пізно відбувається порушення збалансованості механізмів контролю синтезу та утилізації ендотеліальних судинних агентів, що у подальшому реалізується в ініціюванні і прогресуванні патологічних змін судин, у тому числі церебральних. Дисфункція ендотелію може бути самостійною причиною локальних порушень кровообігу, оскільки провокує ангіоспазм чи тромбоз судин, з іншого боку – місцеві порушення кровообігу, наприклад за ішемії, можуть призводити до розвитку ендотеліальної дисфункції.

В умовах нашого дослідження ми не можемо однозначно визначити чи є ендотеліальна дисфункція причиною чи наслідком церебральної ішемії, але, беручи до уваги значне відхилення показника, що є визнаним біохімічним маркером пошкодження ендотелію судин, від значень фізіологічної норми можемо припустити, що мало місце залучення обох варіантів.

Підвищення вмісту фактору фон Віллебранда є однією з безпосередніх причин виникнення серцево-судинних патологій, пов'язаних з надмірним тромбоутворенням. Даний ефект реалізується як за рахунок активації первинного гемостазу, так і залучення фактору фон Віллебранда у перебіг реакцій вторинного коагуляційного гемостазу. Поряд з тромбоцитами та активним плазменним фактором VII, фактор фон Віллебранда є тригером процесу згортання крові внаслідок забезпечення судинно-тромбоцитарної взаємодії на етапах адгезії та агрегації тромбоцитів.

Ще одним високоселективним маркером, який дозволяє оцінити функціональну активність ендотелію, є вміст тканинного активатору плазміногену. Описане нами вище значне зниження вмісту ТАП у пацієнтів обох дослідних груп (у п'ять разів) може розглядатися як свідчення виснаження фібринолітичного потенціалу ендотелію у гострій період розвитку інсульту.

Отже, з огляду на одержані нами результати можемо говорити, що за ішемічного інсульту як окремо, так і на фоні цукрового діабету має місце розвиток ендотеліальної дисфункції, яка виражається у дисбалансі вмісту факторів, здатних впливати на коагуляцію та фібриноліз.

Порушення у функціонуванні ендотеліоцитів можуть бути безпосереднім наслідком накопичення у кров'яному руслі значних кількостей природніх метаболітів, які за умови перевищення функціонального резерву систем їх знешкодження та елімінації набувають функцій вторинних токсинів, викликаючи порушення різноманітних фізіологічних процесів, що суттєво ускладнює перебіг патологічного процесу. Значне зростання відносного вмісту ключового біохімічного маркера ендотоксикозу – молекул середньої маси - у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом (у 3 рази) та інсультом на фоні цукрового діабету (у 2,7 рази) є свідченням розвитку стану ендогенної інтоксикації у хворих обох груп [308]. Токсичний ефект МСМ обумовлений сумарним впливом молекул, що входять до загального пулу МСМ, внаслідок потенціювання та синергізму у їх дії. Враховуючи різноманітну біологічну активність МСМ, у тому числі й здатність безпосередньо чи опосередковано впливати на компоненти системи гемостазу, синдром ендогенної інтоксикації є важливою ланкою патогенезу тромботичних станів. Його прогресування викликає ураження ендотелію судин, порушення його тромборезистентності, обумовлюючи у такий спосіб протромбогенний характер змін у системі гемостазу.

Такі результати цілком узгоджуються з виявленою нами активацією системи зсідання крові. За таких умов тромбін, що асоційований з судинною стінкою або внаслідок його локального генерування у відповідь на порушення цілісності судин

або після зв'язування тромбіну, утвореного у плазмі, з пошкодженою ділянкою судинної стінки, сприяє подальшому нарощуванню коагуляційного потенціалу, оскільки впливає на продукування ендотеліоцитами низки сполук - ефektorів системи гемостазу.

Поповнення пулу ендотоксинів у пацієнтів з ішемічним інсультом частково може відбуватися за рахунок надходження у кровоток продуктів розпаду клітин та тканин із вогнищ тканинної деструкції, обумовлених локальною ішемією судин головного мозку. Надходження токсичних продуктів з вогнищ ураження та їх перерозподіл з током крові і лімфи сприяє подальшій генералізації ендогенної інтоксикації.

За таких умов виявлене нами зниження концентрації альбуміну у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом окремо та на фоні цукрового діабету, може розглядатися як додатковий патогенетичний механізм прогресування стану ендогенної інтоксикації, адже саме альбуміни виконують функцію детоксикації крові, сорбуючи на своїй поверхні найбільш агресивні гідрофобні ендотоксини.

У розвитку ендогенної інтоксикації, а отже і прогресуванні порушень, спричинених даним станом, суттєва роль відводиться активізації протеолізу з порушенням загального протеолітичного гомеостазу організму. Саме активація протеолітичних процесів розглядається як один з найбільш загальних та універсальних механізмів пошкодження тканин за умов патологій, особливо асоційованих на певних етапах розвитку хвороби з ішемією та порушенням структурної цілісності клітинних мембран.

Порівнюючи результати визначення концентрації загального білка та відносного вмісту олігопептидів у пацієнтів дослідних груп, можемо висунути припущення, що у випадку інсульту у хворих на цукровий діабет більш виражене накопичення олігопептидів на фоні менш виражених змін концентрації загального білка може бути обумовлено активізацією тканинного протеолізу та надходженням у кровоток продуктів деградації [309].

Чинником, що сприяє подальшому прогресуванню синдрому ендогенної інтоксикації та слугує незалежним механізмом ініціації та реалізації комплексу патобіохімічних порушень на клітинному, органному та системному рівнях, є розвиток запального процесу, підтверджений в умовах нашого дослідження накопиченням у сироватці крові медіаторів запалення – інтерлейкіну-6 та фактору некрозу пухлин α . Цитокіновий компонент виявляється при гострому, хронічному запаленні і при тромбозі. Інтерлейкіни є важливою ланкою функціонального сполучення імунної системи і фібринолізу. З наявністю у хворих з ішемічним інсультом запального процесу повністю узгоджується виявлене нами раніше зростання концентрації фібриногену, адже відомо, що даний фактор є одним з білків гострої фази запального процесу. Фібриноген, е свою чергу, сприяє формуванню запальної відповіді, оскільки стимулює експресію прозапальних цитокінів на моноклеарних клітинах, активує продукцію хемокінів ендотеліальними клітинами і фібробластами.

Високі рівні цитокінів через виражену нейротоксичну активність посилюють ішемічне пошкодження нервової тканини, адже гіперпродукція медіаторів запалення активованими астроцитами сама по собі може індукувати апоптотичну загибель нервових клітин, посилювати оксидативний та нітрозний стрес. Окрім того, цитокіни здатні впливати на функціонування системи гемостазу, зокрема, інтерлейкін-6 є одним з медіаторів коагуляційного каскаду. Ефект цитокінів на систему гемостазу є комплексним і реалізується на ключових етапах функціонування ланок даної системи. Цитокіни як безпосередньо через свою цитотоксичну активність, так і опосередковано через здатність підвищувати експресію тканинного фактору, посилювати генерацію тромбіну активованими моноцитами, індукувати синтез та секрецію інгібіторів фібринолізу ендотеліоцитами, лейкоцитами, підвищувати утворення оксиду азоту, обумовлюють подальше нарощування порушень у системі гемостазу, що на фоні виснаження резерву фібринолітичної системи сприятиме посиленню процесів внутрішньо судинного згортання та розвитку тромбозів.

Подібна ситуація є особливо загрозовою для осіб, що мають патології, асоційовані з хронічними запальними реакціями. Саме тому тривалий системний запальний процес, характерний для хворих з некомпенсованим діабетом, особливо на фоні зайвої ваги, можна розглядати як один з тригерів розвитку функціонального дисбалансу між окремими компонентами системи гемостазу.

Беручи до уваги все вище викладене можемо говорити про існування своєрідного «порочного кола», коли запалення слугує додатковим фактором пошкодження судин та органів за рахунок підтримання високої активності процесів перекисного окиснення ліпідів та розвитку гіпоксичних станів внаслідок порушення мікроциркуляції, що призводить як до місцевих, так і системних ускладнень.

На сьогодні активно розвивається концепція порушення протеолітичного балансу як принципово важливої ланки прогресування ускладнень, спричинених ішемічним інсультом. Комплекс метаболічних порушень, виявлений нами у пацієнтів з ішемічним інсультом, зокрема, наявність синдрому ендогенної інтоксикації, запальний процес, а також гіперглікемія (а отже і оксидативний стрес) до певної міри може бути асоційований зі змінами протеолітичного гомеостазу. З іншого боку може обумовлювати значні порушення у функціонуванні строго збалансованої системи контролю вмісту та регуляції активності ферментів, їх активаторів та/чи інгібіторів. Серед ферментів, підтримання компартменталізації та строгий контроль активності яких, є необхідною умовою для попередження розвитку постінсультних порушень, виділяють матриксні металопротеїнази. Представники даної родини ферментів руйнують компоненти базальних мембран і тому можуть обумовлювати порушення структурної цілісності гематоенцифалічного бар'єру та периферійних судин, а отже створювати умови для міграції клітин, активації прокоагулянтної та судинно-тромбоцитарної ланок системи гемостазу. З огляду на вище зазначене, підвищення відносного вмісту та зростання активності ММП-2 та ММП-9 у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом окремо та на фоні цукрового діабету слугує негативним прогностичним показником відновлення

організму після перенесеного інсульту, у тому числі і неврологічного статусу, порушеного, згідно з нашими даними, у пацієнтів з інсультом.

Надходження ММП у кров'яне русло та їх неконтрольована активація значно розширюють спектр потенційних субстратів для даних ферментів, неспецифічне розщеплення яких призводить до утворення низки продуктів з різною молекулярною масою, що накопичуються у кровотоці та вносять вагомий внесок у підтримання та генералізацію синдрому ендогенної інтоксикації. Потенційно субстратом для дії ММП можуть слугувати і білки крові, зокрема, попередники чи вже активовані ферменти системи гемостазу. За таких обставин їх протеоліз може супроводжуватися утворенням низки продуктів деградації, частина яких може містити активний центр, а отже може виявляти певну ферментативну активність. Таке припущення знайшло підтвердження у наших дослідженнях за накопиченням у плазмі крові пацієнтів обох дослідних груп протеолітично активних фрагментів плазміногену. Наявність у молекулі плазміногену кринглових структур, які обумовлюють селективність та спрямованість протеолітичної дії активного ферменту значно підвищує патогенетичний потенціал утворених похідних. Адже утворення низки продуктів деградації, що містять активний центр у різних комбінаціях з кринглами, та відсутність належного контролю з боку інгібіторів перетворює дані молекули на потенційні ефектори, здатні впливати на загальний гомеостаз організму.

В умовах системного запалення у відповідь на дію цитокінів, ендотоксинів, порушення структурно-функціональної цілісності ендотелію спостерігається порушення адгезійно-агрегаційної здатності тромбоцитів та вивільнення стимуляторів агрегації. Нами було виявлено, що поряд з активацією системи зсідання крові та пригніченням фібринолізу для пацієнтів, що перенесли ішемічний інсульт не залежно від наявності в анамнезі цукрового діабету, була характерна виражена тромбоцитарна дисфункція, яка виявлялася у зростанні швидкості та максимальної амплітуди АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів [310,311]. Подібні зміни у тромбоцитарній ланці є цілком прогнозованими, враховуючи тісний

взаємозв'язок між всіма компонентами системи гемостазу. Так, зростання рівня фібриногену, фактору фон Віллебранда у пацієнтів обох дослідних груп сприятиме утворенню тромоцитарних агрегатів; зростання рівня протромбінового пулу через накопичення деяких продуктів перетворення протромбіну може викликати вторинну активацію тромбоцитів сприяючи залученню нових клітин у формування тромбу.

Варто зазначити, що активовані тромбоцити також беруть участь в утворенні фібрину, прискорюючи роботу коагуляційного каскаду. Нитки фібрину стабілізують тромоцитарний агрегат, що призводить до формування повноцінного фібринового тромбу, що перебиває просвіт судини і у залежності від локалізації потенційно може обумовити розвиток інфаркту міокарду, ішемічного інсульту чи інших судинних патологій.

Деяко більш виражені зміни проаналізованих показників у групі пацієнтів з інсультом на фоні цукрового діабету можуть бути пов'язані з впливом дисліпідемії та гіперглікемії. За умови підвищених рівнів у сироватці крові триацилгліцеролів, холестерину, атерогенних ліпопротеїдів зростає чутливість тромбоцитів до дії індукторів агрегації, окрім того глікозилювання білків мембран тромбоцитів слугує додатковим фактором, що обумовлює схильність тромбоцитів до агрегації.

Тромбоцити, залучені у процес адгезії та агрегації, активно секретують гранули і біологічно активні речовини, у такий спосіб подальшому наростанню коагуляційного потенціалу крові. До таких речовин належить і серотонін, який володіє широким спектром біологічної активності та здатен впливати на функціонування системи гемостазу, зокрема, його судинно-тромбоцитарну ланку.

Зростання концентрації серотоніну у сироватці крові пацієнтів обох дослідних груп [312,313] повністю узгоджується із підвищеною схильністю тромбоцитів до активації, адже даний метаболіт не лише виділяється тромбоцитами у відповідь на їх активацію, а й сприяє підвищенню чутливості тромбоцитів до дії інших стимулів. У цілому прокоагулянтний вплив серотоніну реалізується із залученням різних механізмів, які на певних етапах взаємопосилють один одного сприяючи у такий спосіб більшій вираженості кінцевих ефектів.

Частина виявлених нами змін досліджуваних показників може бути безпосередньо пов'язана з дією серотоніну. Зокрема, зростання концентрації прозапальних цитокінів, порушення структурної цілісності ендотелію та зниження його антитромбогенних властивостей, підвищення вмісту ПАІ-1. Окрім того, серотонін за умов значного перевищення концентрацій може розглядатися як ендогенний токсин та поповнювати пул МСМ.

Тривале підвищення вмісту сироваткового серотоніну може спровокувати спазм судин. При цьому зміна напруги зсуву внаслідок опосередкованого серотоніном стенозу судин може слугувати додатковим фактором, що обумовлює активацію циркулюючих тромбоцитів та утворення локальних конгломератів. Виявлене нами зниження кількості тромбоцитів у пацієнтів обох дослідних груп на фоні посилення їх здатності до агрегації та підвищення у сироватці крові вмісту серотоніну може бути результатом утворення тромбоцитарних конгломератів, що у подальшому може стати причиною формування вогнищ ішемії та спровокувати виникнення повторних рецидивів інсульту.

Узагальнюючи, результати, отримані у ході проведеного експериментального дослідження, вказують на системний характер змін у системі гемостазу до яких залучені всі ланки даної системи та виражаються у домінуванні реакцій, спрямованих на підтримання високого протромбогенного потенціалу крові у пацієнтів з ішемічним інсультом окремо та інсультом на фоні цукрового діабету. Виявлені нами порушення у системі гемостазу відбуваються на фоні вираженого запального процесу, змін ліпідного профілю, синдрому ендогенної інтоксикації, порушень протеолітичного гомеостазу, які, у свою чергу, не лише слугують неспецифічним проявом метаболічних перебудов, супутніх проявам інсульту чи патогенезу цукрового діабету, а й на різних рівнях активно залучаються у регуляцію механізмів контролю вмісту та активності ключових компонентів системи гемостазу, сприяючи, у такий спосіб, замиканню своєрідного «порочного кола».

ВИСНОВКИ

Результати дисертаційної роботи поглиблюють існуючі теоретичні уявлення щодо молекулярно-біохімічних механізмів розвитку ішемічного інсульту у хворих на цукровий діабет 2 типу. Доведено значимість порушень функціонування ключових компонентів всіх ланок системи гемостазу у розвиток та прогресування ускладнень за ішемічного інсульту. Виявлено, що метаболічні порушення за ішемічного інсульту та при наявності в анамнезі цукрового діабету 2 типу значною мірою пов'язані з інтенсифікацією запальних процесів, підвищенням протеолітичного потенціалу у плазмі крові та дисбалансом у периферійній серотонінергічній системі.

1. Виявлено відхилення значень основних клініко-біохімічних показників у сироватці крові від значень фізіологічної норми, встановлено зміни ліпідного профілю крові, зокрема, зростання концентрації ЛПНЩ та фракції атерогенних ліпопротеїдів у пацієнтів з ішемічним інсультом та за наявності в анамнезі цукрового діабету 2 типу, а також встановлено підвищення концентрації іонів натрію та глюкози у сироватці крові пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу.

2. Виявлено значне підвищення активності коагуляційної ланки системи гемостазу, що характеризується появою у кровотоці пацієнтів з ішемічним інсультом та за наявності в анамнезі цукрового діабету 2 типу маркерів тромбонемії РФМК, підвищенням концентрації фібриногену та продуктів перетворення протромбіну на фоні зростання відносної активності фактору Ха та пригнічення активності протеїну С.

3. Встановлено порушення на рівні функціонування судинно-тромбоцитарної ланки системи гемостазу, більш виражені для пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу, а саме підвищення швидкості та максимальної амплітуди агрегації тромбоцитів у відповідь на дію індуктора АДФ. Виявлено значне зростання відносного рівня фактору фон Вілебранда у пацієнтів обох дослідних груп, що є свідченням розвитку ендотеліальної дисфункції.

4. Доведено зниження функціонального резерву системи фібринолізу у хворих з ішемічним інсультом та за наявності в анамнезі цукрового діабету 2 типу, оцінене на основі значного подовження показників часу лізису еуглобулінової фракції плазми крові та часу Хагеман-залежного фібринолізу. Дані порушення супроводжуються зниженням потенційної активності плазміногену та дисбалансом вмісту ТАП і ПАІ-1.

5. Встановлено, що гострий період ішемічного інсульту як у пацієнтів без цукрового діабету, так і за наявності в анамнезі цукрового діабету 2 типу, характеризується розвитком стану ендогенної інтоксикації (зростання відносного вмісту молекул середньої маси, олігопептидів, зниження концентрації загального білка та альбуміну), інтенсифікацією запальних процесів (зростання відносного вмісту ІЛ-6 та $\text{TNF}\alpha$) та порушеннями у функціонуванні периферійної серотонінергічної системи (зростання концентрації сироваткового триптофану та серотоніну).

6. Встановлено зростання вмісту та активності матриксних металопротеїназ-2 і -9 у сироватці крові пацієнтів з інсультом, накопичення протеолітично активних похідних плазміну та виявлено відмінності їх якісного складу для хворих з ішемічним інсультом та за наявності в анамнезі цукрового діабету 2 типу.

Список використаної літератури

1. Чепелевська ЛА, Любінець ОВ. Динаміка і структура смертності населення України від зовнішніх причин смерті. Вісник соціальної гігієни та організації охорони здоров'я. 2008; 2:4–9.
2. Thom T. Heart Disease and Stroke Statistics--2006 Update: A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2006;113(6):e85-e151.
3. Пашковська Н. В. Гострі порушення мозкового кровообігу у хворих на цукровий діабет. *Практична ангіологія*. 2011;5-6:5-14.
4. Angelo Avogaro, Mattia Albiero, Lisa Menegazzo, Saula de Kreutzenberg, and Gian Paolo Fadini. Endothelial Dysfunction in Diabetes The role of reparatory mechanisms. *Diabetes Care*. 2011 May; 34(Suppl 2): S285–S290. Published online 2011 Apr 22. doi: 10.2337/dc11-s239
5. Carr ME. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. *J Diabetes Complications*. 2001 Jan-Feb;15(1):44-54.
6. Francis J. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 1994; 5(5):855.
7. Пантелеев МА, Васильев СА, Синаурідзе ЕИ, Воробьев АИ, Атауллаханов ФИ. *Практическая коагулология*. М.: Практическая медицина. 2011; 192.
8. Баркаган ЗС. Гемостаз. *Руководство по гематологии: в 3 т. под ред. А.И. Воробьева*. 3-е изд., перераб. и доп. – М. : Ньюдиамед. 2005; Т. 3: 9–147.
9. Butenas S, Mann KG. Blood coagulation. *Biochemistry (Moscow)*. 2002; 1: 3-12.
10. Момот АП. *Современные методы распознавания состояния тромботической готовности*. Барнаул: Изд-во АГМУ. 2011; 138.
11. Кузник БИ. Система гемостаза. *Физиология человека*. М.: Медицина. 2000;1:313-325.

12. Атауллаханов ФИ. Сложные режимы распространения возбуждения и самоорганизация в модели свертывания крови. УФН: журнал. 2007;177(1):87-104.
13. Вайс Х. Функции крови. Остановка кровотечения и свёртывание крови. Физиология человека. М.: Мир. 1996;2:431-439.
14. Шитикова АС. Тромбоцитарный гемостаз. – СПб., 2000. – 225 с. Levi M. Platelets / Crit Care. Med. - 2005. – V. 33. – P. 523-5.
15. de Witt SM, Verdoold R, Cosemans JM, Heemskerk JW. Insights into platelet-based control of coagulation. Thromb Res. 2014;133(Suppl 2):S139–48.
16. Зубаиров Д.М., Зубаирова Л.М. Эндотелиальные микровезикулы – посредники межклеточных взаимодействий в сосудистом секторе. Тромбоз, гемостаз и реология. 2011; 2: 6–13.
17. Балуда ВП. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. Томск. 1980;4:24-37.
18. Bouchard BA, Catcher CS, Thrash BR, Adada C, Tracy PB. Effector cell protease receptor-1, a platelet activation-dependent membrane protein, regulates prothrombinase-catalyzed thrombin generation. J.Biol.Chem. 1997; 272 N 14: 9244-9251.
19. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. Blood Rev. 2011;25(4):155–67.
20. Гусина АА, Гусина НБ. Генетические дефекты про- и антикоагулянтных белков как факторы риска венозных тромбозов. Медицинские новости. 2006;9.
21. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. Biochemistry. 1991; 30 N 43: 10363-10366.
22. Струкова СМ. Современные представления о механизмах свёртывания крови. Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов. 2002; 2: 21–27.
23. Bagoly Z, Koncz Z, Hársfalvi J, Muszbek L. Factor XIII, clot structure, thrombosis. Thromb Res. 2012;129(3):382–387.
24. Волков ГЛ, Платонова ТН, Савчук АН, Горницкая ОВ, Чернышенко ТМ, Краснобрыжая ЕН. Современные представления о системе гемостаза. Киев. Наукова думка. 2005;295.

25. Howard N, Abell C, Blakemore W, Chessari G, Congreve M, Howard S et al. Application of Fragment Screening and Fragment Linking to the Discovery of Novel Thrombin Inhibitors†. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006;49(4):1346-1355.

26. Inoue K, Morita T. Identification of O-linked oligosaccharide chains in the activation peptides of blood coagulation factor X. The role of the carbohydrate moieties in the activation of factor X. *European Journal of Biochemistry*. 1993;218(1):153-163.

27. Chu AJ. Blood coagulation as an intrinsic pathway for proinflammation: a mini review. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2010;9(1):32-44.

28. Wheeler AP and Gailani D. The Intrinsic Pathway of Coagulation as a Target for Antithrombotic Therapy. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2016; 30(5): 1099–1114. doi: 10.1016/j.hoc.2016.05.007

29. Palta S, Saroa R, and Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth*. 2014; 58(5): 515–523. doi: 10.4103/0019-5049.144643

30. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(8):1687-1693.

31. Camerer E, Prydz H. Notes on cell biology of tissue factor. *Haemostasis*. 1996; 26: 25-30.

32. Muller YA, Utsch MH, Kelley RF, de Vos AM. Structures of the extracellular domain of human tissue factor: location of the factor VIIa binding site. *Biochemistry*. 1994; 33 N 36: 10864-10870.

33. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest*. 2003; 124: 26S-32S.

34. B. Dahlbäck, J. Stenflo. The protein C anticoagulant system. G. Stamatoyannopoulos, P.W. Majerus, R.M. Perlmutter, H. Varmus (Eds.), *The molecular basis of blood disease*, W.B. Saunders Company, Philadelphia (2000), pp. 614-656.

35. Desai UR. New antithrombin-based anticoagulants. *Med Res Rev*. 2004;24(2):151-181.

36. Струкова СМ, Ткачук ВА. Протеиназы системы свёртывания крови и фибринолиза как клеточные регуляторы. *Биохимия*. 2002; 1: 3–4.

37. Olson ST, Chuang YJ. Heparin activates antithrombin anticoagulant function by generating new interaction sites (exosites) for blood clotting proteinases. *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12(8):331-338.

38. Gray E, Hogwood J, Mulloy B. The anticoagulant and antithrombotic mechanisms of heparin. *Handb Exp Pharmacol.* 2012;(207):43-61. doi: 10.1007/978-3-642-23056-1_3.

39. Dobrovolsky AB, Titaeva EV. The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. *Biochemistry (Moscow).* – 2002; V. 67, № 1: 99–108.

40. Chapina JC and Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.* 2015; 29(1): 17–24. doi: 10.1016/j.blre.2014.09.003.

41. Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost.* 2009;7(1):4–13.

42. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol.* 2005;129(3):307–321.

43. Wiman B. Primary structure of the B-chain of human plasmin. *Eur.J.Biochem.* 1977; 76, N 1: 129-137.

44. Mulichack AM, Tulinsky A, Ravichandran KG. Crystal and molecular structure of human plasminogen kringle 4 refined at 1,9 Å resolution. *Biochemistry.* 1991; 30, N4: 10576-10588.

45. Чепелевська ЛА, Любінець ОВ. Динаміка і структура смертності населення України від зовнішніх причин смерті. *Вісник соціальної гігієни та організації охорони здоров'я.* 2008; 2:4–9.

46. Thom T. Heart Disease and Stroke Statistics--2006 Update: A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation.* 2006;113(6):e85-e151.

47. Prencipe M, Culasso F, Rasura M, Anzini A, Beccia M, Cao M et al. Long-term Prognosis After a Minor Stroke : 10-Year Mortality and Major Stroke Recurrence Rates in a Hospital-Based Cohort. *Stroke.* 1998;29(1):126-132.

48. Ярош АС, Пирогова ЛА, Филина НА. Современное состояние проблемы острах нарушений мозгового кровообращения. Журнал ГрГМУ. 2014; № 3 (47): 17-20.
49. Karaszewski B, Wardlaw JM, Marshall I, Cvoro V, Wartolowska K, Haga K, Armitage PA, Bastin ME, Dennis MS. Early brain temperature elevation and anaerobic metabolism in human acute ischaemic stroke. *Brain*. 2009; 132:955-964.
50. Ekshyyan O, Aw TY. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Curr. Neurovasc. Res.* 2004; 1: 355–371.
51. Khoshnam SE, Winlow W, Farzaneh M, Farbood Y, Moghaddam HF. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol Sci.* 2017;38(7):1167-1186. doi: 10.1007/s10072-017-2938-1.
52. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology.* 2008;55(3):310-318. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.01.005.
53. Танащян ММ, Суслина ЗА, Ионова ВГ, и др. Гемореология и гемостаз у больных с ишемическим инсультом при различной степени поражения магистральных артерий головы. *Неврол. жур.* 2001; 6: 17-21.
54. del Zoppo GJ. Virchow's triad: The vascular basis of cerebral injury. *Rev Neurol Dis.* 2008;5(Suppl 1):S12–S21.
55. Гусев ЕИ, Скворцова ВИ. Ишемия головного мозга. – М.: Медицина. 2001; 177.
56. Черний ВИ, Кабанько ТП, Кузнецова ИВ. Нарушения в системе гемостаза при критических состояниях. Киев: Здоровье. 2000; 23-30.
57. Nachman RL, Rafii S N. Platelets, petechiae, and preservation of the vascular wall. *Engl J Med.* 2008; 359(12):1261-1270.
48. Грицай НН, Мищенко ВП. Проблемы гемостаза в неврологии. Киев: Здоровье. 2000; 6-18.

59. Deb P, Sharma S, Hassan KM. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology*. 2010;17: 197–218.

60. Мчедlishvili ГИ. Микроциркуляция крови: общие закономерности регулирования и нарушений. Л.: Наука. 1989.

61. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*. 2008;359:938-949.

62. Lee SJ, Hong JM, Lee SE, Kang DR, Ovbiagele B, Demchuk AM, Lee JS. Association of fibrinogen level with early neurological deterioration among acute ischemic stroke patients with diabetes. *BMC Neurol*. 2017; 17: 101. 10.1186/s12883-017-0865-7.

63. Deb P, Sharma S, Hassan KM. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology*. 2010;17(3):197-218. doi: 10.1016/j.pathophys.2009.12.001.

64. Салова ЕА, Краснощекова ЛИ, Точенов МЮ. Состояние системы гемостаза в остром периоде ишемического инсульта с учетом его гетерогенности. *Лечебное дело*. 2012; 3:56-59.

65. Яворская ВА, Грицай НН, Мохамед АМ. Роль системы гемостаза при нарушении мозгового кровообращения. Киев: Книга. 2004: 190.

66. Nandigam RN, Viswanathan A, Delgado P, Skehan ME, Smith EE, Rosand J, Greenberg SM, Dickerson BC. MR imaging detection of cerebral microbleeds: effect of susceptibility-weighted imaging, section thickness, and field strength. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2009; 30(2):338-43.

67. Gonzalez, R; Hirsch, J et al. Acute ischemic stroke. Imaging and intervention. Springer. 2006.

68. Forster C, Clark HB, Ross ME, Iadecola C. Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts. *Acta Neuropathol*. 1999; 97: 215–220.

69. Шимохина НЮ. Современные представления о патогенезе и особенностях системы гемостаза у больных с осложненным течением

гипертонической болезни (ишемический инсульт) в сочетании с ишемической болезнью сердца. Сибирское медицинское обозрение. 2009; 3: 3-7.

70. Jansson JH, Nilsson TK, Johnson O. von Willebrand factor in plasma: a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death. *Br. Heart J.* 1991; 66 351–355.

71. Stoll EG, Kleinschnitz C, Nieswandt B. Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment. *Blood.* 2008; 112: 3555–3562.

72. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med.* 2008; 359:938-949.

73. De Candia E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history. *Thromb Res.* 2012;129:250-256.

74. Crack P, Taylor J. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radical Biology and Medicine.* 2005;38:1433–1444.

75. Doyle KP, Simon RP and Stenzel-Poore MP. Mechanisms of Ischemic Brain Damage. *Neuropharmacology.* 2008; 55(3): 310–318. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.01.005.

76. Chen R, Ovbiagele B and Feng W. Diabetes and Stroke: Epidemiology, Pathophysiology, Pharmaceuticals and Outcomes. *Am J Med Sci.* 2016; 351(4): 380–386. doi: 10.1016/j.amjms.2016.01.011.

77. Khoury JC, Kleindorfer D, Alwell K, Moomaw CJ, Woo D, Adeoye O, Flaherty ML, Khatri P, Ferioli S, Broderick JP, Kissela BM. Diabetes mellitus: a risk factor for ischemic stroke in a large biracial population. *Stroke.* 2013;44:1500–1504.

78. Cefalu WT. Insulin resistance: cellular and clinical concepts. *Exp. Biol. Med.* 2001; Vol. 226: 13–26.

79. Wannamethee SG, Lowe GD, Shaper AG, Rumley A, Lennon L, WhincupPH. The metabolic syndrome and insulin resistance: relationship to haemostatic and inflammatory markers in older non-diabetic men. *Atherosclerosis.* 2005;181(1):101–108.

80. Sakkinen PA, Wahl P, Cushman M, Lewis MR, Tracy RP. Clustering of procoagulation, inflammation, and fibrinolysis variables with metabolic factors in insulin resistance syndrome. *Am. J. Epidemiol.* 2000; 152:897–907.

81. Sakkinen PA, Wahl P, Cushman M, Lewis MR, Tracy RP. Clustering of procoagulation, inflammation, and fibrinolysis variables with metabolic factors in insulin resistance syndrome. *Am. J. Epidemiol.* 2000; 152:897–907.

82. Brown ET, Fuller GM. Detection of a complex that associates with the b-fibrinogen G-455-A polymorphism. *Blood.* 1998; 92: 3286-3293.

83. Agewall S, Bokemark L, Wikstrand J, Lindahl A, Fagerberg B. Insulin sensitivity and hemostatic factors in clinically healthy 58-year-old men. *Thromb. Haemost.* 2000; 84:571–575.

84. Alessi MC, Poggi M, Juhan-Vague I. Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol.* 2007 Jun;18(3):240-245.

85. Collet JP, Montalescot G, Vicaute E. Acute release of plasminogen activator inhibitor-1 in ST-segment elevation myocardial infarction predicts mortality. *Circulation.* 2003; Vol. 108: 391–394.

86. Smith A, Patterson C, Yarnell J, Rumley A, Ben-Shlomo Y, Lowe G. Which hemostatic markers add to the predictive value of conventional riskfactors for coronary heart disease and ischemic stroke? The Caerphilly Study. *Circulation.* 2005; 112: 3080–3087.

87. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 2000; 342: 1792–801.

88. Sobel BE, Taatjes DJ, Schneider DJ. Intramural plasminogen activator inhibitor type-1 and coronary atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23: 1979–1989.

89. Исакова ДН. Предикторы неблагоприятного прогноза у больных с высоким сердечно-сосудистым риском. Результаты проспективного наблюдения: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – Тюмень. 2014; 25.

90. Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001;24(8):1476-1485.

91. Балаболкин МИ, Клебанова ЕМ. Инсулинорезистентность в патогенезе сахарного диабета второго типа. *Сахарный диабет*. 2001; 1: 28–37.

92. Westerbacka J, Yki-Jarvinen H, Turpeinen A, Rissanen A, Vehkavaara S, Syrjala M, Lassila R. Inhibition of platelet-collagen interaction. An in vivo action of insulin abolished by insulin resistance in obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2002; 22: 167-172.

93. Furie K, Inzucchi SE. Diabetes mellitus, insulin resistance, hyperglycemia, and stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2008;8(1):12-9.

94. Дедов ИИ, Шестакова МВ. Сахарный диабет. М.: Универсум Паблишинг. 2003; 209-222.

95. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010;107(9):1058-1070. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223545.

96. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54(6):1615-1625.

97. Дедов ИИ, Шестакова МВ. Сахарный диабет в пожилом возрасте: диагностика, клиника, лечение. Практическое руководство для врачей. Москва. 2011; 310 с.

98. Vergès B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia*. 2015; 58(5): 886–899. doi: 10.1007/s00125-015-3525-8.

99. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states. Relationship to atherogenesis. *Diabetes Care*. 1991;14(9):839-855.

100. Кучеренко ОД. Атеросклероз как воспалительное заболевание. *Врачебная практика*. 1999; 3: 81–87.

101. Куликова АН. Роль воспаления в атерогенезе при сахарном диабете. *Цитокины и воспаление*. 2007; Т. 6. № 3: 14-19.

102. Sacks FM, Tonkin AM, Craven T, Pfeffer MA, Shepherd J, Keech A, Furberg CD, Braunwald E. Coronary heart disease in patients with low LDL-cholesterol: benefit of

pravastatin in diabetics and enhanced role for HDL-cholesterol and triglycerides as risk factors. *Circulation*. 2002; Vol. 105: 1424-1428.

103. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N. Engl. J. Med.* 1996; Vol. 335: 1001-1009.

104. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ. Res.* 2001: E14-E22.

105. Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation*. 2003; Vol. 108: 1527-1532.

106. Maggioni AP, Anand I, Gottlieb SO. Effects of valsartan on morbidity and mortality in patients with heart failure not receiving angiotensin converting enzyme inhibitors. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 40: 1414-1421.

107. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerosis plaques. *J. Clin. Invest.* 1994; 94 (6): 2493-2503.

108. Аметов АС, Лысенко МА. Сахарный диабет второго типа и сердечно-сосудистые заболевания: столкновение двух неинфекционных эпидемий. *Русский медицинский журнал*. 2011; 13: 802–810.

109. Горюшкина ОА, Васильева ЕМ. Антиоксидантная терапия в коррекции оксидативного стресса у больных ишемической болезнью сердца с сахарным диабетом 2-го типа. *Вестник новых медицинских технологий*. 2013; 2:156-158.

110. Токар А.В. Сучасні методи лабораторної діагностики внутрішньовенного мікрозсідання крові (методичні рекомендації) / А.В. Токар, Э.М. Макогоненко, Т.М. Платонова – К.: Макком, 1994. – 22 с.

111. Общие липиды / Диагностический набор // *Pliva-lachema diagnostika*. - 2008. - 10003157.
112. Пособие для врачей-лаборантов. Работа с отечественными коагулометрами и реагентами НПО «Ренам» / А. А. Козлов, А. Л. Берковский, Н. Д. Качалова [та ін.]. – М: Принт, 2013. – 44 с.
113. Raksha N, Burlova-Vasylieva M, Torgalo E, Savchuk O. The appearance of molecules of prothrombin origin in blood upon development of atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv Series: Biology*. 2014;68(3):57-60.
114. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(1):680-685.
115. Голдобин ВВ, Клочева ЕГ, Асадуллаева ПМ. Атеротромботический инсульт: клинические показатели и параметры тромбоцитарного гемостаза у пациентов в остром периоде. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2012;8(4):954 – 957.
116. Грицюк ОЙ, Амосова КМ, Грицюк Ю. Практична гемостазіологія. К: Здоров'я. 1994;256.
117. Козлов АА, Берковский АЛ, Качалова НД. Пособие для врачей-лаборантов. Работа с отечественными коагулометрами и реагентами НПО «Ренам». М: Принт. 2013;44.
118. Crowther J. *The ELISA guidebook*. Totowa, NJ: Humana Press; 2000., Fritz Kelly M. *Antibody Validation. Materials and Methods*. 2016;6.
119. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding / Bradford M. M. // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – V. 86. – P. 193–200.
120. Ostapchenko L, Savchuk O, Burlova-Vasiliieva N. Enzyme electrophoresis method in analysis of active componenets of hemostasis system // *Advances in Bioscience and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 2, № 1. – P. 20-26.

121. Gaitonde M.K. A fluorimetric method for the determination of tryptophan in animal tissues / M.K. Gaitonde // *Biochem. S.* – 1974. – Vol. 139. – P. 625-631.

122. Weissbach H. A simplified method for measuring serotonin in tissue; simultaneous assay of both serotonin and histamine / H. Weissbach, T. Philip Waalkes, S. Udenfriend / *J Biol Chem* // – 1957. – Vol. 230, № 2. – P. 865-71.

123. Брандт З. Статистические методы анализа наблюдений. – М.: Мир, 1975. – 312с.

124. Мохорт ТВ. Цереброваскулярная патология при сахарном диабете. *Медицинские новости.* 2011; 6: 25-33.

125. Geeganage CM. Relationship Between Therapeutic Changes in Blood Pressure and Outcomes in Acute Stroke: A Metaregression. *Hypertension.* 2009; Vol. 54: 775-781.

126. Гончар ИА., Недзведь ГК., Лихачев СА. Критерии диагностики и некоторые аспекты лечения основных патогенетических вариантов ишемического инсульта при артериальной гипертензии. *Медицинская панорама.* 2005; 11: 73-75.

127. Tei H et al. Deteriorating ischemic stroke in 4 clinical categories classified by the Ox-fordshire Community Stroke Project. *Stroke.* 2000; Vol. 31: 2049–2054.

9.ЛОПЛП

128. Vazquez G. Comparison of body mass index, waist circumference, and waist/hip ratio in predicting incident diabetes: a meta-analysis. *Epidemiologic Reviews.* 2007; Vol. 29: 115-128.

129. Ahmed N et al. Association of Admission Blood Glucose and Outcome in Patients Treated With Intravenous Thrombolysis: Results From the Safe Implementation of Treat-ments in Stroke International Stroke Thrombolysis Register (SITS-ISTR). *Arch. Neurol.* 2010; Vol. 67, № 9: 1123-1130.

130. Bruno A. Acute blood glucose level and outcome from ischemic stroke. *Neurology.* 1999; Vol. 52: 280–284.

131. Toni D et al. Progressing neurological deficit secondary to acute ischemic stroke. A study on predictability, pathogenesis, and prognosis. *Arch. Neurol.* 1995; Vol. 52: 670–675.

132. Candelise L et al. Stroke-unit care for acute stroke patients: an observational follow-up study. *Lancet.* 2007; Vol. 369: 299-305.

133. Щепанкевич ЛА., Вострикова ЕВ., Пилипенко ПИ. Липидный профиль и методы его коррекции у больных с ишемическим инсультом на фоне сахарного диабета 2 типа. *Медицина и образование.* 2013; 2: 13-17.

134. Tomkin GH and Owens D. Diabetes and dyslipidemia: characterizing lipoprotein metabolism. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2017; 10: 333–343. doi: 10.2147/DMSO.S115855

135. Kesaniemi Y, Grundy S. Increased low density lipoprotein production associated with obesity. *Arteriosclerosis.* 1983; 3: 170–177.

136. Bochkov VN, Mechtcheriakova D, Lucerna M et al. Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/EGR-1 and Ca²⁺/NFAT. *Blood.* 2002; 99(1): 199-206.

137. Ishii H, Tezuka T, Ishikawa H et al. Oxidized phospholipids in oxidized low-density lipoprotein down-regulate thrombomodulin transcription in vascular endothelial cells through a decrease in the binding of RARbeta-RXRalpha heterodimers and Sp1 and Sp3 to their binding sequences in the TM promoter. *Blood.* 2003;101(12): 4765-74.

138. Boyle JJ. Macrophage Activation in Atherosclerosis: Pathogenesis and Pharmacology of Plaque Rupture. *Current Vascular Pharmacology.* 2005; Vol. 3: 63-68.

139. Vidal F, Colome C, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *Eur J Biochem.* 1998; 252(3): 378-84.

140. Ganotakis ES, Gazi IF, Papadakis JA, Jagroop IA, Nair DR, Mikhailidis DP. The relationship between circulating fibrinogen and lipoprotein (a) levels in patients with primary dyslipidemia. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2007; 13: 35-42.

141. Aasheim ET, Hofs D, Hjelmsaeth J et al. Vitamin status in morbidly obese patients: a cross-sectional study. *American Society for Clinical Nutrition*. 2008; 87: 362-369.
142. Lim J, Lee D, Park J. A Strong Interaction between Serum Gamma-Glutamyltransferase and Obesity on the Risk of Prevalent Type 2 Diabetes: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Clinical Chemistry*. 2007; 53: 1092–1098.
143. Targher G, Zoppini G, Lippi G, et.al. Effect of Serum Gamma-Glutamyltransferase and Obesity on the Risk of Dyslipidemia and Poor Glycemic Control in Type 2 Diabetic Patients: Cross-Sectional Findings from the Verona Diabetes Study. *Clinical Chemistry*. 2007; Vol. 53 № 10: 1867-1869.
144. Pratibha S, Praveen-Kumar S, and Agadi J.B. Increased Serum Alkaline Phosphatase and Serum Phosphate as Predictors of Mortality after Stroke. *J Clin Diagn Res*. 2014; Vol.8(8).
145. Скворцов ВВ., Тумаренко АВ., Капланова ВВ. Инфекции мочевыводящих путей при сахарном диабете. *Медлайн-Экспресс*. 2008; 2: 18-23.
146. Ляшенко ЕА. Роль калия и магния в профилактике инсульта. *Русский медицинский журнал*. 2012; 19: 960.
147. Lever AF, Beretta-Piccoli C, Brown JJ, Davies DL, Fraser R, Robertson JJ. Sodium and potassium in essential hypertension. *Br Med J*. 1981; 283(6289): 463–468.
148. Bakiri Y, Hamilton NB, Karadottir R, Attwell D. Testing NMDA receptor block as a therapeutic strategy for reducing ischaemic damage to CNS white matter. *Glia*. 2008; 56: 233–240.
149. Pomero F, Di Minno MN, Fenoglio L, Gianni M, Ageno W, Dentali F. Is diabetes a hypercoagulable state? A critical appraisal. *Acta Diabetol*. 2015; 52(6): 1007-16. doi: 10.1007/s00592-015-0746-8.
150. Babić N, Dervisević A, Huskić J, Musić M. Coagulation factor VIII activity in diabetic patients. *Med Glas (Zenica)*. 2011; 8(1): 134-139.

151. Колодзейская МВ., Юсова ЕИ., Гриненко ТВ. Мезотромбин - производное протромбина - Na⁺-зависимый аллостерический фермент. Биотехнология. 2010; Т. 3, №5: 9-18.

152. Bradford HN, Krishnaswamy S. Meizothrombin is an unexpectedly zymogen-like variant of thrombin. J. Biol. Chem. 2012; Vol. 31, №287(36): 30414 - 30425.

152. Корольова ДС., Чернищенко ВО., Горницька ОВ., Платонова ТМ. Вплив продуктів розщеплення протромбіну на активацію та агрегацію тромбоцитів. Укр. біохім. журн. 2009; Т. 81, № 5: 58 - 65.

153. Bembde AS. A Study of Plasma Fibrinogen Level in Type-2 Diabetes Mellitus and its Relation to Glycemic Control. Indian J Hematol Blood Transfus. 2012; 28(2): 105–108.

154. Dunn EJ, Ariëns RA. Fibrinogen and fibrin clot structure in diabetes. Herz. 2004; 29(5): 470-479.

155. McCarty MF. Interleukin-6 as a central mediator of cardiovascular risk associated with chronic inflammation, smoking, diabetes, and visceral obesity: down-regulation with essential fatty acids, ethanol and pentoxifylline. Med Hypotheses. 1999; 52(5): 465-477.

156. Spada RS, Toscano G, Chiarenza S, Di Mauro S, Cosentino FI, Iero I, Lanuzza B, Tripodi M, Ferri R. Ischemic stroke and fibrinogen in the elderly. Arch Gerontol Geriatr Suppl. 2004; 9: 403-406.

157. Venkateshwarlu N, Gandiah P, Mukheem M, Bingi S and Karthikeya RR. Significance of plasma fibrinogen levels in ischemic stroke. International Journal of Current Research. 2016; Vol. 8: 28479-28483.

158. Hosaka A, Miyata T, Aramoto H, Shigematsu H, Nakazawa T, Okamoto H, Shigematsu K, Nagawa H. Clinical implication of plasma level of soluble fibrin monomer-fibrinogen complex in patients with abdominal aortic aneurysm. J Vasc Surg. 2005; 42(2): 200-205.

159. Nakahara K, Kazahaya Y, Shintani Y, Yamazumi K, Eguchi Y, Koga S, Wada H, Matsuda M. Measurement of soluble fibrin monomer-fibrinogen complex in

plasmas derived from patients with various underlying clinical situations. *Thromb Haemost.* 2003; 89(5): 832-836.

160. Fateh-Moghadam S, Htun P, Tomandl B, Sander D, Stellos K, Geisler T, Langer H, Walton K, Handschu R, Garlichs C, Daniel WG, Gawaz M. Hyperresponsiveness of platelets in ischemic stroke. *Neurology.* 1998; 51(3): 9-14.

161. Cevik O, Baykal AT and Sener A. Platelets Proteomic Profiles of Acute Ischemic Stroke Patients. *PLoS One.* 2016; 11(6): e0158287. doi: 10.1371/journal.pone.0158287.

162. Frankel DS, Meigs JB, Massaro JM, Wilson PW, O'Donnell CJ, D'Agostino RB, Tofler GH. Von Willebrand factor, type 2 diabetes mellitus, and risk of cardiovascular disease: the framingham offspring study. *Circulation.* 2008; 118(24): 2533-2539. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.792986.

163. Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, and Vita JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010; 11(1): 61–74. doi: 10.1007/s11154-010-9134-4

164. Hoffman RP. Hyperglycemic endothelial dysfunction: does it happen and does it matter? *J Thorac Dis.* 2015; 7(10): 1693–1695. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.10.24.

165. Muniyappa R, and Sowers JR. Role of Insulin Resistance in Endothelial Dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013; 14(1): 5–12. doi: 10.1007/s11154-012-9229-1.

166. Smith NM, Pathansali R and Bath PMW. Platelets and stroke. *Vascular Medicine.* 1999; 4: 165–172.

167. Schneider DJ. Factors Contributing to Increased Platelet Reactivity in People With Diabetes. *Diabetes Care.* 2009; 32(4): 525–527. doi: 10.2337/dc08-1865

168. Schmaier A. (2013). Laboratory evaluation of hemostatic and thrombotic disorders. *Hoffman Hematology: Basic Principles and Practice* 6th ed Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone Elsevier, 319.

169. Gasparyan AY, Ayvazyan L, Mikhailidis DP, Kitas GD. Mean platelet volume: a link between thrombosis and inflammation? *Curr Pharm Des.* 2011; 17(1):47-58.
170. Park Y, Schoene N, Harris W. Mean platelet volume as an indicator of platelet activation: methodological issues. *Platelets* 2002; 13: 301–306.
171. Bath P, Algert C, Chapman N, Neal B PROGRESS Collaborative Group. Association of mean platelet volume with risk of stroke among 3134 individuals with history of cerebrovascular disease. *Stroke.* 2004; 35:622–626.
172. Martin JF, Bath PM, Burr ML. Influence of platelet size on outcome after myocardial infarction. *Lancet.* 1991; 338(8780):1409-1411.
173. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramírez C, Sabaté M, Jimenez-Quevedo P, Hernández R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Bañuelos C, Costa MA, Bass TA, Macaya C. Platelet function profiles in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease on combined aspirin and clopidogrel treatment. *Diabetes.* 2005; 54: 2430– 2435.
174. Keating FK, Sobel BE, Schneider DJ. Effects of increased concentrations of glucose on platelet reactivity in healthy subjects and in patients with and without diabetes. *Am J Cardiol.* 2003; 92: 1362– 1365.
175. Pedreño J, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Badimón L, Masana L. Platelet function in patients with familial hypertriglyceridemia: evidence that platelet reactivity is modulated by apolipoprotein E content of very-low-density lipoprotein particles. *Metabolism.* 2000; 49: 942– 949.
176. Ferretti G, Rabini RA, Bacchetti T, Vignini A, Salvolini E, Ravaglia F, Curatola G, Mazzanti L. Glycated low density lipoproteins modify platelet properties: a compositional and functional study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(5): 2180-2184.
177. Sampietro T, Lenzi S, Cicchetti P: Nonenzymatic glycation of human platelet membrane proteins in vitro and in vivo. *Clin Chem.* 1986; 32:1328-1331.
178. Kohler HP. Insulin resistance syndrome: interaction with coagulation and fibrinolysis. *Swiss. Med. Wkly.* 2002; 132(19–20): 241–52.

179. Westerbacka J, Yki-Jarvinen H, Turpeinen A, Rissanen A, Vehkavaara S, Syrjala M, Lassila R. Inhibition of platelet-collagen interaction. An in vivo action of insulin abolished by insulin resistance in obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 167–72.

180. Савчук ОМ, Гамісонія МШ, Кізім ОІ, Платонова ТМ. Значимість деяких показників фібринолітичної системи в оцінці стану гемостазу. *Фізіолог. Журнал.* 2001; т. 47, N 3: 58-62.

181. Pieters M, van Zyl DG, Rheeder P, Jerling JC, du Loots T, van der Westhuizen FH, Gottsche LT, Weisel JW. Glycation of fibrinogen in uncontrolled diabetic patients and the effects of glycaemic control on fibrinogen glycation. *Thromb Res.* 2007; 120(3): 439–446.

185. Henschen-Edman AH. Fibrinogen non-inherited heterogeneity and its relationship to function in health and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 936: 580–593.

183. Svensson J, Bergman AC, Adamson U, Blomback M, Wallen H, Jorneskog G. Acetylation and glycation of fibrinogen in vitro occur at specific lysine residues in a concentration dependent manner: a mass spectrometric and isotope labeling study. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;421(2):335–42.

184. Dunn EJ, Philippou H, Ariens RA, Grant PJ. Molecular mechanisms involved in the resistance of fibrin to clot lysis by plasmin in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2006;49(5):1071–80.

185. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 2000; 342: 1792–1801.

186. Sobel BE, Taatjes DJ, Schneider DJ. Intramural plasminogen activator inhibitor type-1 and coronary atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23: 1979–89.

187. Meigs JB, Mittleman MA, Nathan D, Tofler GH, Singer DE, MurphySheehy PM, Lipinska I, D'Agostino RB, Wilson PW. Hyperinsulinemia hyperglycemia and impaired hemostasis. The Framingham Offspring Study. *JAMA* 2000; 283: 221–228.

188. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor Type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2000; 342: 1792–1801.

189. Nakamura T, Adachi H, Hirai Y, Satoh A, Ohuchida M, Imaizumi T. Association of plasminogen activator inhibitor-1 with insulin resistance in Japan where obesity is rare. *Metabolism.* 2003; 52(2):226-229.

190. Bastard JP, Piéroni L, Hainque B. Relationship between plasma plasminogen activator inhibitor 1 and insulin resistance. *Diabetes Metab Res Rev.* 2000;16(3):192-201.

191. Lopez-Aleman R, Redondo JM, Nagamine Y, Munoz-Canoves P. Plasminogen activator inhibitor type-1 inhibits insulin signaling by competing with avb3 integrin for vitronectin binding. *J. Eur. Biochem.* 2003; Vol. 270: 814–821.

192. Campbell IW. The role of metformin and pioglitazone in early combination treatment of type 2 diabetes mellitus. *Brit. J. of Diabetes & Vasc.Dis.* 2006; Vol. 6: 207–215.

193. Kruszynska YT, Yu JG, Olefsky JM, Sobel BE. Effects of troglitazone on blood concentrations of plasminogen activator inhibitor 1 in patients with type 2 diabetes and in lean and obese normal subjects. *Diabetes.* 2000;49:633– 639.

194. Zorio E, Gilabert-Estelles J, Espana F, Ramon LA, Cosin R, Estelles A. Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms. *Curr Med Chem.* 2008; 15:923–929.

195. Birgel M, Gottschling-Zeller H, Röhrig K, Hauner H. Role of cytokines in the regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in newly differentiated subcutaneous human adipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:1682–1687.

196. Fujita H, Kang M, Eren M, Gleaves LA, Vaughan DE, Kume T. Foxc2 is a common mediator of insulin and transforming growth factor beta signaling to regulate plasminogen activator inhibitor type I gene expression. *Circ Res.* 2006;98:626 – 634.

197. Платонова ТН, Савчук АН, Ровинская ИН, Чернышенко ТМ. Определение активности тканевого активатора плазминогена и содержания

растворимого фибрина в плазме больных с различной патологией. Лаб. диагностика. 2000; 2: 15-19.

198. Савчук ОМ, Гамісонія МШ, Кізім ОІ, Платонова ТМ. Значимість деяких показників фібринолітичної системи в оцінці стану гемостазу. Фізіолог. журнал. 2001; т. 47, N 3: 58-62.

199. Алферова ВВ, Узбеков МГ, Мисионжник ЭЮ, Лукъянюк ЕВ, Гехт АБ, Шкловский ВМ, Шихов СН. Серологические маркеры эндогенной интоксикации в комплексной оценке реабилитационного потенциала больных, перенесших ишемический инсульт. Социальная и клиническая психиатрия. 2011; Т. XXI №3: 54-57.

200. Узбеков МГ, Мисионжник ЭЮ. Неспецифический синдром эндогенной интоксикации как интегральный компонент патогенеза психических расстройств. Росс. психиатр. журн. 2000; 4: 56–65.

201. Чайковская ИВ, Яворская ЛВ. Синдром эндогенной интоксикации и его роль при патологических процессах. Питання експериментальної та клінічної медицини. 2012; Т. 1, № 16: 144–152.

202. Уманский МА, Пинчук ЛБ, Пинчук ВГ. Синдром эндогенной интоксикации. Киев: Наукова Думка. 1991; 211–213.

203. Громашевская ЛЛ. Средние молекулы как один из показателей «метаболической интоксикации» в организме. Лаб. диагностика. 1997; 1: 11–16.

204. Карякина ЕВ, Белова СВ. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений. Клини. лаб. диагностика. 2004; 3: 4–8.

205. Хавинсон ВХ, Рыжак ГА. Пептидная регуляция основных функций организма. Вестник Росздравнадзора. 2010; 6: 58 – 62

206. Хавинсон ВХ, Тарновская СИ, Линькова НС. Короткие пептиды, проникающие в клетку: модель взаимодействия с промоторными участками генов. Бюлл. эксп. биол. мед. 2012; 10: 391 – 396.

207. Хавинсон ВХ, Рыжак ГА. Пептидная регуляция основных функций организма. Вестник Росздравнадзора. 2010; 6: 58 – 62.

208. Никольская ВА, Данильченко ЮД, Меметова ЗН. Биохимический аспект рассмотрения роли молекул средней массы в организме. Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского Серия "Биология, химия. 2013; т. 26, № 1: 139–145.

209. Елеева М.А.-К. Состояние прооксидантной системы крови и уровень молекул средней массы у больных с инсультом. Вестник новых медицинских технологий. 2013; 1: 17-22.

210. Шкловский ВМ, Алферова ВВ, Мисионжник ЭЮ, Краснов ВН, Гусев ЕИ, Узбеков МГ, Гехт АБ, Лукьянюк ЕВ. Значение синдрома эндогенной интоксикации для восстановления нарушенных функций после ишемического инсульта. Неврология. 2011; 4 (63) 27-30.

211. Малахова МЯ. Эндогенная интоксикация как отражение компенсаторной перестройки обменных процессов в организме. Эфферентная терапия. 2000; Т. 6, № 4: 3–14.

212. Парфенкова ГА, Чернядьева НФ, Ситина ВК. Средние молекулы – маркер эндогенной интоксикации (обзор литературы). Врачебное дело. 1987;. 4: 72–77.

213. Яворская ВА, Белоус АМ, Мохаммед АН. Исследование уровня молекул средней массы и процессов перекисного окисления липидов в крови больных с разными формами инсульта. Журн.неврол. и психиатр. 2000; 1: 48–51.

214. Яровая ГА. Биорегулирующие функции и патогенетическая роль протеолиза. Лабораторная медицина. 2001; 5: 39 – 45 (Yarovaya GA. Bioregulatory function and pathogenetic role of proteolysis. Laboratornaya medicina. 2001; 5: 39 – 45).

215. Арчаков АИ, Мохосоев ИМ. Модификация белков активным кислородом и их распад. Биохимия. 1989; Т.54, №2: 179-185.

216. Грызунов ЮА, Добрецов ГЕ. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. М.: Ириус. 1994; Кн. 1. 226 с.

217. Rojas VC, Grenfell GA, Hicks JJ. Participation of oxygen free radicals in the oxido-reduction of proteins. Arch. Med. Res. 1996; V.27, №1: 1-6.

218. Tuttolomondo A, Di Raimondo D, di Sciacca R, Pinto A, Licata G. Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Curr Pharm Des.* 2008; 14(33):3574-3589.
219. Di Napoli M, Shah IM. Neuroinflammation and Cerebrovascular Disease in Old Age: A Translational Medicine Perspective. *J Aging Res.* 2011; doi: 10.4061/2011/857484.
220. Lau LT, Yu AC. Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury. *J. Neurotrauma.* 2001; Vol. 18: 351–359.
221. Казимирко ВК, Иваницкая ЛН, Кутовой ВВ, Дубкова АГ, Силантьева ТС. Атеросклероз как липидная дистрофия и воспаление. *Український ревматологічний журнал.* 2014; 56 (2): 1-7.
222. Doll DN, Barr TL and Simpkins JW Cytokines: Their Role in Stroke and Potential Use as Biomarkers and Therapeutic Targets. *Aging Dis.* 2014; 5(5): 294–306. doi: 10.14336/AD.2014.0500294.
223. Xiao J, Li J, Cai L, Chakrabarti S, Li X. Cytokines and Diabetes Research. *J Diabetes Res.* 2014; 2014: 920613. doi: 10.1155/2014/920613.
224. Rattazzi M, Puato M, Faggin E. C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits or passive bystanders? *J Hypertens.* 2003;21(10):1787–1803.
225. Straub RH, Hense HW, Andus T. Hormone replacement therapy and interrelation between serum interleukin-6 and body mass index in postmenopausal women: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(3): 1340–1344.
226. Rattazzi M, Puato M, Dayer JM, Choy E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology (Oxford).* 2010; 49(1):15–24.
227. Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res.* 2004; 45: 1169–1196.

228. Greenberg A, Nordan R, McIntosh J. Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Research*. 1992; Vol. 52, №15: 4113–4116.
229. Dessein PH, Joffe BI. Suppression of circulating interleukin-6 concentrations is associated with decreased endothelial activation in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2006; 24(2): 161–167.
230. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105: 1135-1143.
231. Picchi A, Gao X, Belmadani S. Tumor Necrosis Factor- α Induces Endothelial Dysfunction in the Prediabetic Metabolic Syndrome. *Circul. Res*. 2006; 99: 69-77.
232. Carey AL, Febbraio MA. Interleukin-6 and insulin sensitivity: friend or foe? *Diabetologia*. 2004; 47(7): 1135–1142.
233. Rotter V, Nagaev I, Smith U et al. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- α , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem*. 2003; 278(46): 45777–45784.
234. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest*. 1995; 95: 2111-2119.
235. Memon RA, Feingold KR, Moser AH, et al. Regulation of fatty acid transport protein and fatty acid translocase mRNA levels by endotoxin and cytokines. *Am. J. Physiol*. 1998; 274: E210-E217.
236. Kirwan JP. Insulin sensitivity in skeletal muscle: «use it or lose it, fast». *J Appl Physiol*. 2010;108(5):1023–1024.
237. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007; Vol. 8: 221–233.

238. Peng WJ, Yan JW, Wan YN, Wang BX, Tao JH, Yang GJ, Pan HF, Wang J. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in systemic sclerosis. *J Clin Immunol*. 2012; 32(6):1409-1414. doi: 10.1007/s10875-012-9735-7.

239. Лесниченко ИФ, Грицаев СВ, Капустин СИ. Матриксные металлопротеиназы: характеристика, роль в лейкозогенезе и прогностическое значение. *Вопросы онкологии*. 2011; 57,3: 286-294.

240. Maleski C. J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci*. 2006; Vol. 11: 1696-1701.

241. Cheng S, Pollock AS, Mahimkar R, Olson JL, Lovett DH. Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury. *The FASEB journal*. 2006; 20: 1898-1900.

242. Lewandowski KC, Banach E, Bieńkiewicz M, and Lewiński A. Matrix metalloproteinases in type 2 diabetes and non-diabetic controls: effects of short-term and chronic hyperglycaemia. *Arch Med Sci*. 2011; 7(2): 294–303.

243. Tsioufis C1, Bafakis I, Kasiakogias A, Stefanadis C. The role of matrix metalloproteinases in diabetes mellitus. *Curr Top Med Chem*. 2012; 12(10):1159-1165.

244. Ramos-Fernandez M1, Bellolio MF, Stead LG. Matrix metalloproteinase-9 as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *J Stroke Cerebrovasc Dis*.

245. Egashira Y, Zhao H, Hua Y et al. White Matter Injury After Subarachnoid Hemorrhage: Role of Blood-Brain Barrier Disruption and Matrix Metalloproteinase-9. *Stroke*. 2015; 46 (10): 2909–2915.

246. Cadenas I, Ribo M, Molina CA et al. Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke*. 2006; 37: 1399–1406.

247. Romanic AM, White RF, Arleth AJ et al. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: Inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke*. 1998; 5: 1020–1030.

248. Siwik DA, Colucci WS. Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Fail Rev*. 2004;9(1):43-51.

249. Zhao BQ, Ikeda Y, Urano IHT, Fan WY, Mikawa S, Suzuki Y, Kondo K, Sato K, Nagai N, and Umemura K. Essential role of endogenous tissue plasminogen activator through matrix metalloproteinase 9 induction and expression on heparin-produced cerebral hemorrhage after cerebral ischemia in mice. *Blood*. 2004; 103: 2610–2616.
250. Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A. Mmp-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type iv collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke*. 2008; 39: 1121–1126.
251. Lee SR, Kim HY, Rogowska J et al. Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke. *J Neurosci*. 2006; 26: 3491–3495.
252. Bouloumié A, Sengenès C, Portolan G, Galitzky J, Lafontan M. Adipocyte Produces Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Involvement in Adipose Differentiation *Diabetes*. 2001; 50(9): 2080-2086.
253. Derosa G, Ferrari I, D'Angelo A, Tinelli C, Salvadeo SA, Ciccarelli L, Piccinni MN, Gravina A, Ramondetti F, Maffioli P, Cicero AF. Matrix metalloproteinase-2 and -9 levels in obese patients. *Endothelium*. 2008;15(4):219-224.
254. Bourlier V, Zakaroff-Girard A, De Barros S, Pizzacalla C, de Saint Front VD, Lafontan M, Bouloumié A, Galitzky J. Protease inhibitor treatments reveal specific involvement of matrix metalloproteinase-9 in human adipocyte differentiation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312(3):1272-1279.
255. Zhao W, O'Malley Y, Wei S, Robbins ME. Irradiation of rat tubule epithelial cells alters the expression of gene products associated with the synthesis and degradation of extracellular matrix. *Int J Radiat Biol*. 2000; 76(3): 391-402.
256. Park AJ, Matrisian LM, Kells AF, Pearson R, Yuan ZY, Navre M. Mutational analysis of the transin (rat stromelysin) autoinhibitor region demonstrates a role for residues surrounding the "cysteine switch". *J Biol Chem*. 1991;266(3):1584-1590.

257. Svineng G, Ravuri C, Rikardsen O, Huseby NE, Winberg J O. The role of reactive oxygen species in integrin and matrix metalloproteinase expression and function. *Connect. Tissue Res.* 2008; 49: 197–202.

258. Wang X, Lee SR, Arai K, et al. Lipoprotein receptormediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med.* 2003; 9: 1313–1317.

259. Birkedal-Hansen H1, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4(2): 197-250.

260. Klys' YG, Zajtseva NV, Kizim AI, VerevkaSV. Proteolytic derivatives of plasminogen as a factor in malignancy development. *Oncology.* 2010; Vol. 12, №1: 17-21.

261. Wahl M, Kenan D, Gonzalez-Gronow M, Pizzo S. Angiostatin's molecular meghanism: aspects of specificity and regulations elucidated. *J. Cell. Biochem.* 2005; Vol. 96: 242-261.

262. Zhernossekov DD, Yusova EI, Grinenko TV. Role of plasminogen/plasmin in functional activity of blood cells. *Ukrainian biochemical journal.* 2012; V.84, №4: 5-19.

263. Linhart O, Obreja O, Kress M. The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin E2 and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. *Neuroscience.* 2003; Vol. 118, №1: 69–74.

264. Brenner B, Harney JT, Ahmed BA, Jeffus BC, Unal R, Mehta JL, Kilic F. Plasma serotonin level and the platelet serotonin transporter. *J. Neurochem.* 2007; 102: 206–216.

265. Manjarrez-Gutiérrez G, Herrera-Márquez R, Neri-Gómez T. Serotonin levels in plasma and platelets of adolescents with type 1 diabetes. *Journal of Medicine and Medical Science.* 2014; 3: 267–274.

266. Keszthelyi D, Troost F, Masclee A. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterology & Motility.* 2009; 21: 1239–1249.

267. Portela-Gomes G, Wilander E, Grimelius L. The Enterochromaffin Cells in the Mouse Gastrointestinal Tract after Streptozotocin Treatment. *Pathology - Research and Practice*. 1990; 186: 260–264.

268. Duerschmied D, Bode C. The role of serotonin in haemostasis. *Hamostaseologie*. 2009;29(4):356-359.

269. Benedict CR, Mathew B, Rex KA, Cartwright J, Sordahl LA. Correlation of plasma serotonin changes with platelet aggregation in an in vivo dog model of spontaneous occlusive coronary thrombus formation. *Circ Res*. 1986; 58: pp. 58-67.

270. Lopez-Vilchez I, Diaz-Ricart M, White JG. Serotonin enhances platelet procoagulant properties and their activation induced during platelet tissue factor uptake. *Cardiovasc. Res*. 2009; Vol. 84, N. 2: 309–316.

271. Giesen PA, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT et al. Bloodborne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:2311–2315.

272. Kawano H, Tsuji H, Nishimura H, et al. Serotonin induces the expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in cultured rat aortic endothelial cells. *Blood*. 2001; Vol. 97, N. 6: 1697–1702.

273. Rudnick G and Clark J. From synapse to vesicle: The re-uptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochim Biophys Acta Rev Bioenerg*. 1993; 1144:249-263.

274. Murphy DL, Uhl GR, Holmes A. Experimental gene interaction studies with SERT mutant mice as models for human polygenic and epistatic traits and disorders. *Genes, Brain and Behavior*. 2003; 2: 350–364.

275. Brenner B, Harney JT, Ahmed BA, Jeffus BC, Unal R, Mehta JL, and Kilic F. Plasma serotonin level and the platelet serotonin transporter. *J Neurochem*. 2007; 102: 206-216.

276. Ahmed BA, Jeffus B, Harney JT, Bukhari IS, Unal R, Lupashin VV, van der Sluijs P, and Kilic, F. Serotonin transamidates Rab4 and facilitates binding to the C-terminus of hSERT. *J Biol Chem*. 2008; 283:9388-9398.

277. Giannaccini G, Betti L, Palego L. The expression of platelet serotonin transporter (SERT) in human obesity. *BMC Neuroscience*. 2013; 14: 1–8.
278. Ito T, Ikeda U, Shimpo M et al. Serotonin increases interleukin-6 synthesis in human vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2000; Vol. 102, N. 20: 2522–2527.
279. Liu G, Chen S, Zhong J, Teng K, Yin Y. Crosstalk between Tryptophan Metabolism and Cardiovascular Disease, Mechanisms, and Therapeutic Implications. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017:1602074. doi: 10.1155/2017/1602074.
280. Chen T, Zheng X, Ma X, Bao Y, Ni Y, Hu C, Rajani C, Huang F, Zhao A, Jia W, Jia W. Tryptophan Predicts the Risk for Future Type 2 Diabetes. *PLoS One*. 2016; 11(9): e0162192.
281. Zhou Y, Qiu L, Xiao Q. Obesity and diabetes related plasma amino acid alterations. *Clinical Biochemistry*. 2013;46: 1447–1452.
282. Fleck C, Schweitzer F, Karge E. Serum concentrations of asymmetric (adma) and symmetric (sdma) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clinica Chimica Acta*. 2003; Vol.336: 1–12.
283. Павлов ВА, Сабадаш ЕВ. Перспективы применения аминокислот-адаптагенов в патогенетической терапии ряда патологических состояний организма. *Проблемы туберкулеза*. 2002; 1: 26-28.
284. Кулеш СД, Дорошенко ЕМ. Особенности метаболизма нейроактивных аминокислот в остром периоде ишемического инсульта. *Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2000; 5: 64-65.
285. Curzon G, Friedel J, Knott PJ. The effect of fatty acids on the binding of tryptophan to plasma protein. *Nature*. 1973; Vol. 242, no. 5394: 198–200.
286. Kaye WH, Gendall KA, Fernstrom MH, Fernstrom JD, McConaha CW, and Weltzin TE. Effects of acute tryptophan depletion on mood in bulimia nervosa. *Biological Psychiatry*. 2000; Vol. 47, no. 2: 151–157.
287. Batch BC, Shah SH, Newgard CB, Turer CB, Haynes C, Bain JR, et al. Branched chain amino acids are novel biomarkers for discrimination of metabolic

wellness. *Metabolism*. 2013; 62:961–969. doi: 10.1016/j.metabol.2013.01.007 PMID: 23375209

288. Piccolo BD, Graham JL, Stanhope KL, Fiehn O, Havel PJ, Adams SH. Plasma amino acid and metabolite signatures tracking diabetes progression in the UCD-T2DM rat model. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2016; 310(11): E958–969. doi: 10.1152/ajpendo.00052.2016 PMID: 27094034.

289. Newgard C, An J, Bain J. A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metabolism*. 2009; Vol.9, №4: P. 311–326.

290. Kaszaki J, Palásthy Z, Erczes D. Kynurenic acid inhibits intestinal hypermotility and xanthine oxidase activity during experimental colon obstruction in dogs. *Neurogastroenterology & Motility*. 2008; 20: 53–62.

291. Heitger A. Regulation of expression and function of IDO in human dendritic cells. *Current Medicinal Chemistry*. 2011; Vol. 18,no. 15: 2222–2233.

292. Darlington LG, Mackay GM, Forrest CM, Stoy N, George C, Stone TW. Altered kynurenine metabolism correlates with infarct volume in stroke. *Eur J Neurosci*. 2007; 26: 2211–2221.

293. Buczko P, Stokowska W, Gorska M et al. Tryptophan metabolites via kynurenine pathway in saliva of diabetic patients. *Dent. Med.Probl*. 2006; 43: 21–25.

294. Mackay GM, Forrest CM, Stoy N, Christofides J, Egerton M, Stone TW, Darlington LG. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with chronic brain injury. *Eur J Neurol*. 2006; 13(1):30-42.

295. Stoy N, Mackay GM, Forrest CM, Christofides J, Egerton M, Stone TW, Darlington LG. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *J Neurochem*. 2005; 93(3): 611-623.

296. Stone TW, Mackay GM, Forrest CM, Clark CJ, Darlington LG. Tryptophan metabolites and brain disorders. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41(7):852-859.

297. Brouns R, Verkerk R, Aerts T et al. The role of tryptophan catabolism along the kynurenine pathway in acute ischemic stroke. *Neurochemical Research*. 2010; Vol. 35, no. 9: 1315–1322.

298. Niinisalo P, Raitala A, Pertovaara M et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity associates with cardiovascular risk factors: the health 2000 study. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2008; Vol. 68, no. 8: 767–770.

299. Niinisalo P, Oksala N, Levula M et al. Activation of indoleamine 2,3-dioxygenase-induced tryptophan degradation in advanced atherosclerotic plaques: tampere Vascular Study. *Annals of Medicine*. 2010; Vol. 42, no. 1: 55–63.

300. Wirleitner B, Rudzite V, Neurauder G et al. Immune activation and degradation of tryptophan in coronary heart disease. *European Journal of Clinical Investigation*. 2003; Vol. 33, no. 7: 550–554.

301. Pertovaara M, Raitala A, Juonala M et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme activity correlates with risk factors for atherosclerosis: the cardiovascular risk in young finns study. *Clinical and Experimental Immunology*. 2007; Vol. 148, no. 1: 106–111.

302. Tsarenko T. Protein C and factor X activities from patients with ischemic stroke and type II diabetes mellitus / Tsarenko T, Kravchenko O, Savchuk O, Ostapchenko L. // ABSTRACTS of the 61st Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Hemostasis Research, 15-18 February 2017: матер. конфер. – Basel, Switzerland, 2017.

303. Tsarenko T. Fibrinogen and soluble fibrin monomer complex blood content in patients with ischemic stroke and diabetes mellitus / Tsarenko T, Savchuk O, Kravchenko O. // *Acta Biochimica Polonica.Supl.* 1. 2016. Abstracts of X Parnas Conference Young Scientist Forum "Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine", 10-12 July 2016: матер. конфер. - Wrocław, Poland, 2016. - P.18.

304. Царенко Т, Пажукова Є, Тимошенко М, Кравченко О. Клініко-біохімічні показники обміну білків та вміст електролітів у крові пацієнтів за умов ішемічного інсульту, ускладненого цукровим діабетом другого типу. *Вісник Київського*

національного університету імені Тараса Шевченка/ Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016; 1(20): 49-53.

305. Царенко Т. Активність трансаміназ та вміст сечовини у сироватці крові хворих на цукровий діабет 2 типу з ішемічним інсультом/ Царенко Т, Пажукова Є, Кравченко О. // XII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів Молодь і поступ біології, 19-21 квітня 2016 р.: матер. конфер. – Львів, 2016.

306. Tsarenko T, Kostiuk O, Kravchenko O, Savchuk O, Ostapchenko L. The markers of platelet functions and von Willebrand factor serum content from patients with type 2 diabetes mellitus and ischemic stroke. *Biomedical Research and Therapy*. 2016; 3: 542-547.

307. Tsarenko T. Serotonin and von Willebrand Factor Serum Content under Ischemic Stroke with or without Type 2 Diabetes Mellitus/ Tsarenko T, Kravchenko O, Savchuk O, Ostapchenko L. // 61st Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Hemostasis Research P.343.

308. Царенко Т, Гайда Л, Кравченко О. Показники ендотоксемії пацієнтів із ішемічним інсультом та цукровим діабетом другого типу. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016; 2(21): 57-61.

309. Царенко Т. Вміст електролітів та загального білка в сироватці крові хворих на цукровий діабет 2 типу з ішемічним інсультом/ Царенко Т, Сімеонова М, Кравченко О. // XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених Шевченківська весна, 6-8 квітня 2016р.: матер. конфер. - Київ, 2016. – С.181.

310. Царенко Т. Дисфункціонування тромбоцитів у хворих на цукровий діабет 2 типу з ішемічним інсультом / Царенко Т, Юрченко А, Савчук О. // XIII міжнародна наукова конференція молодих вчених «Шевченківська весна: Біологія-2015», 2015р.: матер. конфер. - Київ, 2015. - С. 100.

311. Царенко Т. Зміни функціонування системи метаболізму серотоніну в крові хворих на цукровий діабет 2 типу з ішемічним інсультом / Царенко Т,
195

Юрченко А, Савчук О, Остапченко Л. // XI Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології», - 20 - 25 квітня 2015 р.: матер. конфер. - Львів, 2015.

312. Tsarenko T. Functioning change of serotonin metabolism in blood of patients with type 2 diabetes mellitus and ischemic stroke / Tsarenko T, Yurchenko A, Savchuk O, Ostapchenko L. // Abstract of 40th FEBS Congress, 4-9 July 2015: матер. конфер. - Berlin, Germany, 2015. – P140.

313. Царенко Т. Зміни функціонування системи метаболізму серотоніну в крові хворих на цукровий діабет 2 типу з ішемічним інсультом / Царенко Т, Юрченко А, Савчук О, Остапченко Л. // XI Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології», 20 - 25 квітня 2015 р.: матер. конфер. - Львів, 2015.

Результати дисертації були представлені на вітчизняних та міжнародних конференціях: 40th FEBS Congress (Berlin, Germany, 2015); Asia Pacific Stroke Conference (Brisbane, Australia, 2016); X Parnas Conference (Wrocław, Poland, 2016); XIV Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна» (Київ, 2016); XII Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2016); 61st Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Hemostasis Research (Basel, Switzerland, 2017).

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Статті у фахових виданнях

1. Tsarenko T, Kostiuk O, Kravchenko O, Savchuk O, Ostapchenko L. The markers of platelet functions and von Willebrand factor serum content from patients with type 2 diabetes mellitus and ischemic stroke. Biomedical Research and Therapy. 2016; 3: 542-547 (здобувачем особисто проведено визначення рівня фактору фон Віллебранда у плазмі крові, підготовлено статтю до друку).
2. Царенко Т, Пажукова Є, Тимошенко М, Кравченко О. Клініко-біохімічні показники обміну білків та вміст електролітів у крові пацієнтів за умов ішемічного інсульту, ускладненого цукровим діабетом другого типу. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка/Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016; 1(20): 49-53 (здобувачем особисто проведено визначення вмісту електролітів, концентрації загального білка та альбумінів у сироватці крові, підготовлено статтю до друку).
3. Царенко Т, Кравченко О, Савчук О. Ліпопротеїновий профіль та активність маркерних ензимів печінки у крові пацієнтів з цукровим діабетом другого типу за умов розвитку ішемічного інсульту. Вісник Львівського університету Серія біологічна. 2016; 73: 329-335 (здобувачем особисто проведено визначення концентрації ліпопротеїдів у сироватці крові, підготовлено статтю до друку).

4. Царенко Т, Гайда Л, Кравченко О. Показники ендотоксемії пацієнтів із ішемічним інсультом та цукровим діабетом другого типу. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016; 2(21): 57-61 (здобувачем особисто проведено визначення вмісту молекул середньої маси у сироватці крові, підготовлено статтю до друку).
5. Царенко Т.М., Тимошенко М.О., Кравченко О.О. Вміст фібриногену та протромбіну за умов ішемічного інсульту ускладненого цукровим діабетом другого типу. Scientific journal «Science rise: biological science». 2017; 6(9): 23-26 (здобувачем особисто проведено визначення вмісту фібриногену та протромбіну у плазмі крові, підготовлено статтю до друку).
6. Царенко Т, Ракша Н, Кравченко О. Матриксні металопротеїнази у патогенезі ішемічного інсульту, ускладненого цукровим діабетом 2 типу. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2018; 2(21): 57-61 (здобувачем особисто проведено визначення вмісту матриксних металопротеїназ у сироватці крові, підготовлено статтю до друку).
7. Kravchenko O, Melnyk V, Tsarenko T , Kostiuk O, Halenova T, Raksha N, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. The blood coagulation tests from ischemic stroke patients with or without type 2 diabetes mellitus. Biomedical Research. 2018; 29(14): 2938-43 (здобувачем особисто проведено визначення часу зсідання плазми крові у хронометричних тестах, підготовлено статтю до друку).

Тези основних наукових доповідей

8. O. Kravchenko, T. Tsarenko, O. Savchuk, L. Ostapchenko. Serotonin and von Willebrand Factor Serum Content under Ischemic Stroke with or without Type 2 Diabetes Mellitus. 61st Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Hemostasis Research. 2017; 15-18 February, Basel, Switzerland, P.343.
9. Olha Kravchenko, Tetiana Tsarenko, Oleksiy Savchuk Fibrinogen and soluble fibrin monomer complexes blood content under ischemic stroke with diabetes mellitus. X

- Parnas Conference Young Scientist Forum „Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine”. 2016; 10–12 July, Wrocław, Poland, P.18.
10. Сімеонова М.С., Кравченко О.О., Царенко Т.М. Вміст електролітів та загального білка в сироватці крові хворих на цукровий діабет 2 типу з ішемічним інсультом. XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених “Шевченківська весна: Біологія”. 2016; 6-8 квітня, Київ, С.181.
11. Пажукова Є., Царенко Т., Кравченко О. Активність трансаміназ та вміст сечовини у сироватці крові хворих на цукровий діабет 2 типу з ішемічним інсультом. XII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології”. 2016; 19-21 квітня, Львів, С.16.
12. Kravchenko O., Tsarenko T., Savchuk O., Ostapchenko L. The Coagulation Tests from Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Ischemic Stroke Cerebrovasc Disease. Asia Pacific Stroke Conference. 2016; 15-17 July, Brisbane, Australia 2016, P.90.