

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

## МИКРОЭЛЕМЕНТЫ В СИСТЕМЕ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ: КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

**Л.Л. Клименко<sup>1</sup>, А.И. Деев<sup>1</sup>, И.С. Баскаков<sup>1</sup>, М.Н. Буданова<sup>1</sup>, А.Х. Забирова<sup>2</sup>,  
М.С. Уженцева<sup>3</sup>, А.Н. Мазилина<sup>5</sup>, М.С. Савостина<sup>5</sup>, О.В. Сенько<sup>5</sup>, А.В. Кузнецова<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

<sup>3</sup> Новосибирский государственный медицинский университет, г. Новосибирск

<sup>4</sup> КБ № 123 ФМБА России, г. Одинцово, Моск. обл.

<sup>5</sup> Вычислительный центр РАН, Москва

<sup>6</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

**РЕЗЮМЕ.** В основе механизма ишемизации мозговой ткани лежат гематологические нарушения. Известно, что на образование и структуру фибрина влияют двухвалентные ионы. В связи с этим фактом изменение макро- и микроэлементного баланса служит маркером нейротрофических нарушений в работе мозга задолго до их клинических проявлений. Дисбаланс металлолигандного гомеостаза является неблагоприятным фоном для дебюта ишемического инсульта. В многофакторной системе свертывания крови одно из ключевых мест занимают специфические белки – протеин С и D-димеры. Многие макро- и микроэлементы являются медиаторами гемостаза и тромбоза: нарушения элементного гомеостаза являются молекулярной основой ишемического процесса. В исследовании, проведенном в клинических условиях, с высокой степенью достоверности показана сочетанная динамика протеина С и D-димеров и комплекса макро- и микроэлементов. С помощью корреляционного анализа по Спирмену выявлены достоверные корреляционные связи между концентрациями протеина С, D-димеров и макро- и микроэлементов у пациентов с диагнозом «ишемический инсульт». В заключительной части математической обработки результатов использован множественный регрессионный анализ, с помощью которого показана достоверная связь между протеином С – компонентом системы свертывания крови, и концентрацией комплекса макро- и микроэлементов, вносящих вклад в центральный механизм этиопатогеза ишемического инсульта:  $R = 0,95938848$ ,  $R^2 = 0,92042626$ .

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** протеин С, D-димеры, макро- и микроэлементы, ишемический инсульт.

### ВВЕДЕНИЕ

Универсальным физиологическим механизмом, характеризующим деятельность центральной нервной системы, является интеграция, то есть объединение структур, находящихся на разных уровнях биологической организации, в единую функциональную структуру (Гусев, Крыжановский, 2009). В связи с высокой пластичностью нервной системы развитие патологических процессов, в том числе и ишемического инсульта, обеспечивается эндогенными механизмами. Эндогенез патологических процессов осуществляется в первую очередь на молекулярном

уровне, а затем в виде образования внутриклеточных и внутриорганных механизмов и патологических систем.

При исследовании патогенетических механизмов нарушения мозгового кровообращения особое значение приобретают вопросы, связанные с анализом многоступенчатых гомеостатических механизмов, обеспечивающих связь кровоснабжения мозга с его метаболизмом и функцией (Тул, 2007; Бакунц, 2011).

Метаболизм мозга определяется его высокой энергетической потребностью (в состоянии покоя мозг человека потребляет 20% всего кис-

\* Адрес для переписки:

**Клименко Людмила Леонидовна**

E-mail: klimenkoll@mail.ru

рода, необходимого для нормальной жизнедеятельности) и в полной мере зависит от нормального кровоснабжения и постоянной регионарной перфузии (Ещенко, 1999; Barros, et al., 2020). В связи с этим гематологические нарушения: изменение вязкости крови, тромбоцитоз, нарушение процесса свертывания – гиперкоагуляционные состояния, лежат в основе механизма ишемизации мозговой ткани. Особую роль в процессе ишемизации играют двухвалентные ионы, влияющие на образование и структуру фибрина. Изменение макро- и микроэлементного баланса служит маркером нейротрофических нарушений в работе мозга задолго до их клинических проявлений. Дисбаланс металлолигандного гомеостаза является неблагоприятным фоном для дебюта ишемического инсульта (Skalny, 2014; 2017; Klimentko et al., 2017; 2019).

Таким образом, механизм запуска ишемического инсульта имеет многоуровневый характер, а истоки этого механизма находятся на молекулярном и субмолекулярном уровнях.

В многофакторной системе свертывания крови важное место занимают специфические белки: протеин С (Rosén et al., 1997; Нернер et al., 2013; Tsushima et al., 2020) и D-димеры (Yamamoto et al., 2016; Misra et al., 2017; Riva et al., 2018; Ito et al., 2018; Wu et al., 2018).

Цель исследования – изучение влияния макро- и микроэлементов на систему свертывания крови при ишемическом инсульте.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в клинических условиях, в неврологическом отделении Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины ФМБА России, в Клинической больнице № 123 персональной медицины.

В неврологическом отделении КБ № 123 обследованы пациенты с диагнозом ишемический инсульт ( $n = 265$ ), в возрасте от 50 до 70 лет (средний возраст  $65 \pm 0,3$  лет); из них 53% мужчин и 47% женщин.

Группа сравнения представлена здоровыми добровольцами ( $n = 150$ ), в возрасте от 50 до 68 лет (средний возраст  $62 \pm 0,6$  лет), 68% мужчин, 32% женщин.

Определение концентрации биохимических, гематологических и иммунологических показателей выполняли в клинико-диагностической лаборатории.

Кроме стандартных клинических биохимических показателей, методом иммуноферментного анализа ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) выявляли концентрации в сыворотке крови нейроспецифических белков S100 (нг/мл), VEGF (пг/мл), антител к NR2 (нг/мл). Также определяли показатели свертываемости крови – протеин С (%) и D-димеры (нг/мл), и компоненты сывороточного комплемента C3–C5 (г/л).

Анализ проводили на автоматическом биохимическом анализаторе «Сапфир-400», автоматическом гематологическом анализаторе «Medonic MC-15», «МЕК 7222», автоматическом иммуноферментном анализаторе «Лазурит» фирмы «Вектор-бест» (Россия), с использованием реагентов фирм «Randox» (Великобритания), «CORMAY» (Польша), «Юнимед» (Россия), «Вектор-бест» (Россия). Пробы крови брали свободным истечением из локтевой вены утром натощак, через 12–14 ч после приема пищи.

Определение концентрации макроэлементов (Mg) и микроэлементов (Cu, Mn, Se, Zn и Fe) в сыворотке крови (мкг/мл) проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной аргонной плазмой на атомно-эмиссионном спектрометре Optima 2000 DV (Perkin Elmer, США).

**Пробоподготовка сыворотки крови для определения концентрации микроэлементов.** Образцы сыворотки разбавляли в пропорции 1:15 подкисленным дилуэнтном. Состав дилуэнта по объему: 1% 1-Butanol (#1.00988, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Германия), 0,1% Triton X-100 (Sigma #T9284 Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, США) и 0,07% HNO<sub>3</sub> (Fluka #02650 Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, США), растворенные в дистиллированной деионизованной воде с удельным сопротивлением 18,2 МОм·см, полученной с использованием деионизатора (9000602, Labconco Corp., Kansas City, США). Такой дилуэнт имеет pH, равным 2,0, он быстро и полностью растворяет клетки крови и протеины, позволяя получать чистые и стабильные растворы образцов. На этом пробоподготовка заканчивается и полученный раствор образца вводится для анализа в ИСП-МС систему Nexion 300D (Perkin Elmer Inc., Shelton, США). Данная технология пробоподготовки разработана в Центре биотической медицины профессором А.В. Скальным.

Математическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных про-

грамм Statistica 10 и метода оптимальных достоверных разбиений (ОДР), входящего в группу методов интеллектуального анализа данных Data Mining. Data Mining – это исследование и обнаружение «машиной» (алгоритмами, средствами искусственного интеллекта) в «сырых» данных скрытых знаний, которые ранее не были известны, нетривиальны, практически полезны, доступны для интерпретации человеком.

Данный способ математического анализа позволяет синхронно оценивать результаты 2000 показателей (Kim et al., 2000; Ernst 2004; Good 2005; Барсегян и др., 2007; Сенько и др. 2016; Senko et al., 2018).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования была определена концентрация протеина С, D-димеров, макро- и микроэлементов в сыворотке периферической крови у пациентов с ишемическим инсультом ( $n = 96$ ). Проведено сравнение со здоровыми добровольцами ( $n = 59$ ).

Высокая степень достоверности отличия исследованных показателей от нормы с полной очевидностью подтверждает основной тезис данного исследования: металлолигандный гомеостаз вносит весомый вклад в механизм этиопатогенеза ишемического инсульта.

Очевидный вклад белков протеина С и D-димеров – компонентов системы свертывания крови, закономерен, поскольку именно эти белки являются модуляторами каскада коагуляции, определяющими механизм патофизиологического процесса в центральной нервной системе (Bates et al, 2001; Dahlbäck et al., 2005; Slavik et al., 2009; Girolami et al., 2018; Namatani et al., 2018). Однако роль макро- и микроэлементов в данном процессе достаточно долгое время была неясной. Тем не менее исследования последних лет с достоверностью определяют вклад элементного гомеостаза в механизм формирования ишемического очага.

Итак, активированный протеин С является основным ферментом каскадного пути протеина С, который обеспечивает физиологическую антитромботическую активность крови. Протеин С проявляет антикоагулянтную активность, косвенно активирует фибринолиз, ограничивает размеры тромба. Дефицит протеина С связан с высоким риском развития тромбоза и является частой причиной ишемического инсульта

Нейроспецифические белки D-димеры являются маркером активации тромбоцитов. Избыток D-димера свидетельствует об активации фибринолиза, которой предшествует усиление коагуляционного каскада с избыточным образованием нерастворимого фибрина.

Нарушение обмена микроэлементов является важным звеном в патогенезе ишемического инсульта. Изменение макро- и микроэлементного баланса служит предвестником нарушения работы центральной нервной системы и является маркером нейротрофических дисфункций

**Цинк.** Этот элемент играет важнейшую роль в формировании структуры протеина и активности ферментов: цинк является важным медиатором гемостаза и тромбоза. Дефицит цинка связан с кровотечениями и нарушениями свертываемости крови, а также служит эффектором коагуляции, антикоагуляции и фибринолиза. Активированные тромбоциты секретируют цинк в локальном микроокружении, что приводит к тому, что концентрация цинка увеличивается в непосредственной близости от тромба. Важным фактом является способность  $Zn^{2+}$  усиливать связывание активированного протеина С (APC) с рецептором протеина С эндотелиальных клеток. Ионы  $Zn^{2+}$  эффективно ингибируют активированный протеин С, что указывает на его потенциальную регуляторную функцию процесса ингибирования. Цинк регулирует коагуляцию, агрегацию тромбоцитов, антикоагуляцию и фибринолиз и служит модулятором гемостаза и тромбоза (Zhao et al., 2014).

**Селен.** Одним из регуляторов функции мозга является селен. Микроэлемент-антиоксидант селен включен в состав селенопротеинов, принимающих активное участие в антиоксидантной защите при сосудистой патологии (глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза тиоредоксинредуктаза, селенопротеин Р). Известно, что одним из механизмов возникновения как ишемических, так и нейродегенеративных заболеваний мозга является окислительный стресс. В то же время глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы являются селен-зависимыми ферментами, участвующими в антиоксидантной защите и внутриклеточной редокс-регуляции и модуляции (Schweizer et al., 2013; Loscalzo, 2014; Клименко и др., 2015; Skalny et al., 2018). Истощение селена с последующим снижением активности селен-зависимых ферментов является одним из основных факторов

этиопатогенеза ишемического инсульта. Для данного исследования является важным факт связи между дефицитом селена в организме и системой свертывания крови: дефицит селена приводит к снижению концентрации фибриногена, активности антитромбина III и D-димера.

**Медь.** Ионы меди модулируют систему свертывания крови, как и антиоксидантную систему (Nara et al., 2018). Медь индуцирует коагулопатию: отравление медью приводит к нарушению коагуляции и кровотечениям. Повышенная концентрация меди является плохим прогнозом и предсказывает худшее клиническое состояние.

**Магний.** Низкая концентрация магния в периферической крови (меньше 0,76 ммоль/л), является фактором риска возникновения инсульта, то есть маркером-предвестником (Bhudia et al., 2006; Larsson et al., 2012). Таким образом, низкий уровень магния – признанный фактор риска «финального тромбообразования» у больных с инсультом.

**Железо и марганец.** Дефицит железа вызывает нарушение продукции нейромедиаторов, приводит к развитию энергетического кризиса и сочетается с повышенным риском инсульта. Свободные ионы  $Fe^{2+}$  вызывают активацию свободно-радикального окисления. Мутации в цепи ферритина приводят к резкому возрастанию уровня же-

леза и марганца в подкорковых ядрах, что является маркером нарастания нейтрофических дисфункций. Таким образом, повышенный уровень железа и марганца в сыворотке крови оценивается как фактор риска инсульта (Ogata et al., 2008),

Итак, современные исследования свидетельствуют о вкладе элементного гомеостаза в этиопатогенез ишемии мозга (Klimenko et al., 2017; Скальный, 2018; Клименко и др., 2019).

Приведенные в табл. 1 результаты исследования на большом массиве клинических данных ( $n = 96$ ) доказывают это положение, а также определяют степень достоверности различия концентрации протеина С, D-димеров и макро- и микроэлементов в норме ( $n = 51$ ) и при ишемическом инсульте.

Таким образом, можно утверждать, что нарушения элементного гомеостаза являются молекулярной основой ишемического процесса.

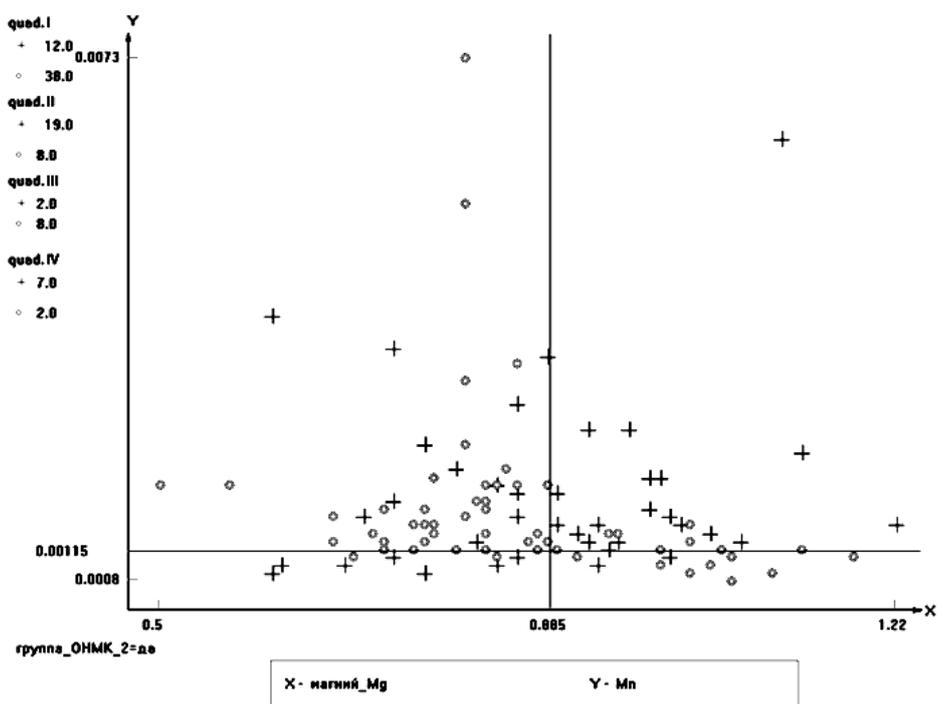
На втором этапе исследования проведен корреляционный анализ связей между концентрациями протеина С, D-димеров и макро- и микроэлементов. Корреляционные связи были определены различными методами: по Спирмену, по Вилкоксоу–Манн–Уитни, по Колмогорову–Смирнову. При всех методах получены сходные результаты. В табл. 2 приведены данные корреляционного анализа по Спирмену.

Таблица 1. Концентрация протеина С, D-димеров и макро- и микроэлементов в периферической крови у пациентов с диагнозом ишемический инсульт ( $n = 96$ )

Показатель	Норма	Mean	Mediane	Minimum	Maximum	<i>p</i>
Протеин С, %	70–130	136,77	116,0	25,0	289,0	0,02
D-димеры, нг/мл	0–200	520,48	207,5	0,000	3781,0	0,0001
Cu, мкг/мл	0,8–1,65	1,22	1,22	0,66	1,95	0,003
Fe, мкг/мл	0,62–2,0	1,18	1,11	0,39	3,26	0,004
Mg, мкг/мл	20,0–25,0	22,61	22,58	16,63	30,04	0,03
Mn, мкг/мл	0,0015–0,004	0,00	0,00	0,00	0,01	0,0001
Se, мкг/мл	0,07–0,12	0,11	0,11	0,05	0,17	0,035
Zn, мкг/мл	0,75–1,5	1,11	1,12	0,50	1,78	0,015

Таблица 2. Коэффициенты корреляции ( $r$ ) между концентрациями протеина С, D-димеров и макро- микроэлементов у пациентов-мужчин с диагнозом «ишемический инсульт» ( $n = 51$ )

Показатель	Cu	Fe	Mg	Mn	Se	Zn
Протеин С, %	0,55 $p = 0,02$	0,6 $p = 0,3$	0,65 $p = 0,04$	0,4 $p = 0,001$	0,8 $p = 0,003$	0,75 $p = 0,01$
D-димеры, нг/мл	0,7 $p = 0,05$	0,5 $p = 0,02$	0,6 $p = 0,03$	0,55 $p = 0,002$	0,7 $p = 0,004$	0,6 $p = 0,003$

Рис. 1. Диаграмма рассеяния, иллюстрирующая распределение концентраций Mg и Mn во всем массиве данных: при ишемическом инсульте ( $n = 96$ ) и при норме ( $n = 51$ )

Корреляционный анализ по Спирмену выявил достоверные корреляционные связи между концентрациями протеина С, D-димеров и макро- и микроэлементов у пациентов-мужчин ( $n = 51$ ).

Таким образом, показатели свертываемости крови оказываются достоверно связанными с показателями элементного гомеостаза: результаты анализа убедительно свидетельствуют о роли последнего в процессе свертывания крови и экспериментально подтверждают положения литературных источников. Поскольку процесс свертывания крови лежит в основе многоуровневого механизма ишемического инсульта, можно утверждать, что элементный гомеостаз является центральным компонентом молекулярного уровня этого механизма.

На третьем этапе исследования для углубленного анализа участия компонентов элементного гомеостаза в ишемическом процессе был использован метод математического анализа Data Mining.

Цель процесса Data Mining – обнаружить новые значимые корреляции и тенденции в результате просеивания большого объема хранимых данных с использованием методик распознавания образцов и применением статистических и математических методов (Senko et al., 2018).

На рис. 1. представлена диаграмма рассеяния, которая иллюстрирует распределение концентраций магния и марганца во всем массиве данных при ишемическом инсульте ( $n = 96$ ) и при норме ( $n = 51$ ).

На представленной диаграмме рассеяния видны достоверные различия между концентрацией магния при низких и высоких значениях концентрации марганца. Показано, что случаи с инсультом преобладают в левом верхнем квадранте, которому соответствует концентрация марганца выше 0,00115 мкг/мл, а магния – ниже 0,895 мкг/мл. В этом квадранте находятся 38 случаев с инсультом (кружки) и только 12 без инсульта (крестики). При превышении порога 0,895 мкг/мл по магнию, но с сохранением концентрации марганца выше 0,00115 мкг/мл, доля случаев с инсультом резко снижается: 19 случаям без инсульта соответствует только 8 случаев с инсультом. При содержании марганца ниже 0,00115 мкг/мл тенденция оказывается обратной. Содержанию магния выше 0,895 мкг/мл соответствует 8 случаев с инсультом и только 2 случая без инсульта, в то время как содержанию этого элемента менее 0,895 мкг/мл соответствует 7 случаев без инсульта и 2 случая с инсультом.

Статистическая значимость различий по магнию при инсульте и норме оценивается на уровне  $p = 0,00001$ , по марганцу – на уровне  $p = 0,0095$ .

Данный анализ подтверждает тезис об участии магния и марганца в этиопатогенезе ишемического инсульта: концентрация этих элементов в периферической крови пациентов с высокой степенью достоверности отличается от концентрации у здоровых обследуемых.

В заключительной части математической обработки результатов был использован множественный регрессионный анализ. Целью регрессионного анализа является измерение связи между зависимой переменной и несколькими независимыми переменными (предикторами). Широкое распространение регрессионного анализа в эмпирических исследованиях связано не только с тем, что это удобный инструмент тестирования гипотез. Регрессия, особенно множественная, является эффективным методом моделирования и прогнозирования. Принципиальная идея регрессионного анализа состоит в том, что, имея общую тенденцию для переменных, – в виде линии регрессии, можно предсказать значение зависимой переменной, имея значения независимой.

Одним из главных показателей регрессионной статистики является множественный коэф-

фициент корреляции  $R$  между исходными и предсказанными значениями зависимой переменной. Чтобы содержательно интерпретировать этот коэффициент, его необходимо преобразовать в коэффициент детерминации. Это делается возведением в квадрат. Коэффициент детерминации  $R$ -квадрат ( $R^2$ ) показывает долю вариации зависимой переменной, объясняемую независимыми переменными. Чем больше величина коэффициента детерминации, тем выше качество модели.

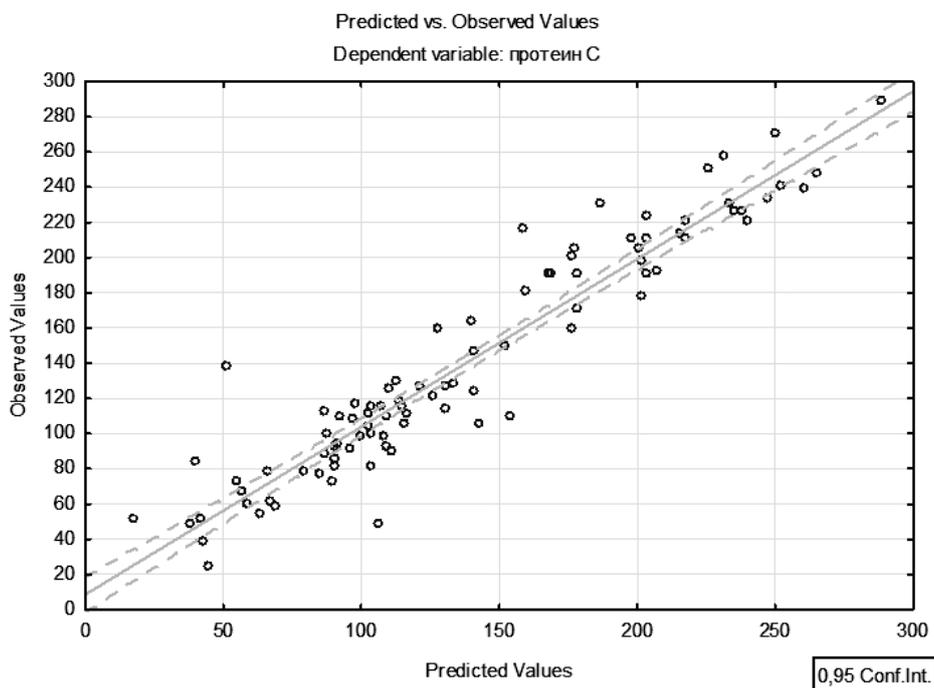
Другим показателем качества модели является стандартная ошибка оценки. Это показатель того, насколько сильно точки «разбросаны» вокруг линии регрессии. Мерой разброса для интервальных переменных является стандартное отклонение. Соответственно, стандартная ошибка оценки – это стандартное отклонение распределения остатков. Чем выше ее значение, тем сильнее разброс и тем хуже модель.

При работе с множественной регрессией, в отличие от парной, необходимо определять алгоритм анализа. Стандартный алгоритм включает в итоговую регрессионную модель все имеющиеся предикторы. Пошаговый алгоритм предполагает последовательное включение (исключение) независимых переменных, исходя из их объяснительного «веса». Пошаговый метод хорош, когда имеется много независимых переменных; он «очищает» модель от откровенно слабых предикторов, делая ее более компактной и лаконичной.

Дополнительным условием корректности множественной регрессии (наряду с интервальностью, нормальностью и линейностью) является отсутствие мультиколлинеарности – наличия сильных корреляционных связей между независимыми переменными (Kim et al., 2000; Ernst, 2004; Good, 2005; Senko et al., 2010).

С помощью регрессионного анализа исследована зависимость биохимического параметра оценки тяжести инсульта (протеина С) от других биохимических параметров, то есть концентраций микроэлементов (Cu, Fe, Mg, Mn, Se, Zn).

Проведенный регрессионный анализ показал высокодостоверную связь между протеином С – компонентом системы свертывания крови, и концентрацией макро- и микроэлементов, вносящих вклад в центральный механизм этиопатогенеза ишемического инсульта (рис. 2.)



**Рис 2.** График зависимости значений протеина С от концентраций макро- и микроэлементов (Cu, Fe, Mg, Mn, Se, Zn) (коэффициенты оценки достоверности результатов:  $R = 0,95938848$ ,  $R^2 = 0,92042626$ )

## ВЫВОДЫ

В проведенном в клинических условиях исследовании получены доказательства наличия многоступенчатого гомеостатического механизма, обеспечивающего связь кровоснабжения мозга с его метаболизмом и функцией.

Высокая энергетическая потребность мозга обеспечивается нормальным кровоснабжением. В связи с этим в основе механизма ишемизации мозговой ткани лежат гематологические нарушения: изменение вязкости крови, тромбоцитоз, нарушение процесса свертывания крови, гиперкоагуляционные состояния. В этой связи двухвалентные ионы, влияющие на образование и структуру фибрина, играют особую роль: дисбаланс металлолигандного гомеостаза является фоном для дебюта ишемического инсульта (Skalny, 2019; Klimenko et al., 2019).

Таким образом, механизм запуска ишемического инсульта имеет многоуровневый характер и истоки этого механизма находятся на молекулярном и субмолекулярном уровнях.

## ЛИТЕРАТУРА

Бакунц Г.О. Эндогенные факторы церебрального инсульта. М.: Гэотар-медиа. 2011. 357 с.

Барсегян А.А., Куприянов М.С., Степаненко В.В., Холлод И.И. Технологии анализа данных. Data Mining, Visual Mining, Text Mining, OLAP. СПб: БХВ-Петербург. 2007.

Гусев Е.И., Крыжановский Г.Н. (ред.). Дизрегуляторная патология нервной системы. М: Медицинское информационное агентство. 2009. 510 с.

Ещенко Н.Д. Энергетический обмен в головном мозге. Биохимия мозга. Ашмарин И.П. и др. (ред.). СПб. 1999. С. 124–168.

Клименко Л.Л., Скальный А.В., Деев А.И., Баскаков И.С., Буданова М.Н., Забирова А.Х., Мазилина А.Н., Савостина М.С. Концентрация нейроспецифических белков S100, магния и микроэлементов в сыворотке крови как диагностический маркер ишемического инсульта. Клиническое исследование. Микроэлементы в медицине. 2019. Т. 20. Вып. 3. С. 31–37.

Клименко Л.Л., Скальный А.В., Турна А.А., Кузнецова А.В., Сенько О.В., Баскаков И.С., Буданова М.Н., Савостина М.С., Мазилина А.Н. Роль селена в многофакторном этиопатогенезе ишемического инсульта. Микроэлементы в медицине. 2015. Т. 16. Вып. 4. С. 28–35.

Сенько О.В., Морозов А.М., Кузнецова А.В., Клименко Л.Л. Оценка эффекта множественного тестирования в методе оптимальных достоверных разбиений. Машинное обучение и анализ данных. 2016. Т. 2, № 1. С. 26–38.

Скальный А.В. Микроэлементы. 2018. Bioelement. 294 с.

Тул Д.Ф. Сосудистые заболевания головного мозга. М: Геотар-Медицина. 2007. 590 с.

Barros L.F., Ruminot I., San Martín A., Lerchundi R., Fernández-Moncada I., Baeza-Lehnert F. Aerobic Glycolysis in the Brain: Warburg and Crabtree Contra Pasteur. *Neurochem Res.* 2020. Jan 24. doi: 10.1007/s11064-020-02964-w.

Bates S.M., Grand'Maison A., Johnston M., Naguit I., Kovacs M.J., Ginsberg J.S.. A latex D-dimer reliably excludes venous thromboembolism. *Arch Intern Med.* 2001; 161: 447–453.

Bhudia S.K., Cosgrove D.M., Naugle R.I., Rajeswaran J., Lam B.K., Walton E., Petrich J., Palumbo R.C., Gillinov A.M., Apperson-Hansen C., Blackstone E.H. Magnesium as a neuroprotectant in cardiac surgery: a randomized clinical trial. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2006. 131(4): 853–861. Erratum in: *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007; 134(2): 25A

Dahlbäck B.I., Villoutreix B.O. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(7): 1311–1320.

Ernst, M. Permutation methods: A basis for exact inference. *Stat. Sci.* 2004; 19(4): 676–685.

Girolami A., Cosi E., Ferrari S., Girolami B. Heparin, coumarin, protein C, antithrombin, fibrinolysis and other clotting related resistances: old and new concepts in blood coagulation. *Thromb Thrombolysis.* 2018; 45(1): 135–141.

Good P.I. Permutation, parametric and bootstrap tests of hypotheses. Springer ser. in statistics – 3rd ed. Springer. 2005. 334 p.

Hamatani Y., Nagai T., Nakai M., Nishimura K., Honda Y., Nakano H., Honda S., Iwakami N., Sugano Y., Asaumi Y., Aiba T., Noguchi T., Kusano K., Toyoda K., Yasuda S., Yokoyama H., Ogawa H., Anzai T.; NaDEF Investigators. Elevated Plasma D-Dimer Level Is Associated With Short-Term Risk of Ischemic Stroke in Patients With Acute Heart Failure. *Stroke.* 2018; 49(7): 1737–1740.

Hara T., Tatsuishi H., Banno T., Fujie T., Yamamoto C., Naka H., Kaji T. Copper(II) Bis(diethylthiocarbamate) Induces the Expression of Syndecan-4, a Transmembrane Heparan Sulfate Proteoglycan, via p38 MAPK Activation in Vascular Endothelial Cells. *Int J Mol Sci.* 2018; 24(19(11)): E3302.

Hepner M., Karlaftis V. Protein C. *Methods Mol Biol.* 2013; 992: 365–372.

Ito S., Kikuchi K., Ueda A., Nagao R., Maeda T., Murate K., Shima S., Mizutani Y., Niimi Y., Mutoh T. Changes in Serial D-Dimer Levels Predict the Prognoses of Trousseau's Syndrome Patients. *Front Neurol.* 2018; 3(9): 528. doi: 10.3389/fneur.2018.00528. eCollection 2018.

Kim H.-J., Fay M.P., Feuer E., Midthune D.N. Permutation tests for joint point regression with applications to cancer rates. *Stat. Medicine.* 2000; 19(3): 335–351.

Klimenko L.L., Skalny A.V., Deev A.I., Baskakov I.S., Budanova M.N., Zabirowa A.Kh., Mazilina A.N., Savostina M.S. Neurospecific proteins of S100 family and metal-ligand homeostasis in etiopathogenesis of ischemic stroke: a literature review. *Trace elements in Medicine.* 2019; 20(4): 1–23.

Klimenko L.L., Skalny A.V., Deev A.I., Baskakov I.S., Budanova M.N., Zabirowa A.Kh., Mazilina A.N., Savostina M.S. The concentration of neurospecific proteins S100, magnesium and trace elements in blood serum as a diagnostic marker of ischemic stroke: a clinical study. *Trace elements in Medicine.* 2019; 20(3): 1–19.

Klimenko L.L., Skalny A.V., Tutna A.A., Budanova M.N., Baskakov I.S., Savostina M.S., Mazilina A.N., Deev A.I., Skal'naya M.G., Tinkov A.A. Serum electrolytes are associated with markers of neuronal damage in transient ischemic attack and ischemic stroke patients. *Trace Elements and Electrolytes.* 2017; 34(1): 29–33.

Larsson S.C., Orsini N., Wolk A. Dietary magnesium intake and risk of stroke: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr.* 2012; 95(2): 362–366.

Loscalzo J. Redox Dysregulation in Vascular Pathobiology. *Free Radic Biol Med.* 2014; 75(1): S2. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.597.

Misra S., Kumar A., Kumar P., Yadav A.K., Mohania D., Pandit A.K., Prasad K., Vibha D. Blood-based protein biomarkers for stroke differentiation: A systematic review. *Proteomics Clin. Appl.* 2017; 11: 9–10.

Ogata T., Kamouchi M., Kitazono T., Kuroda J., Ooboshi H., Shono T., Morioka T., Ibayashi S., Sasaki T., Iida M. Cerebral venous thrombosis associated with iron deficiency anemia. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2008; 17(6): 426–428.

Riva N., Vella K., Hickey K., Bertù L., Zammit D., Spiteri S., Kitchen S., Makris M., Ageno W., Gatt A. Biomarkers for the diagnosis of venous thromboembolism: D-dimer, thrombin generation, procoagulant phospholipid and soluble P-selectin. *J Clin Pathol.* 2018; 71(11): 1015–1022.

Rosén S.B., Sturk A. Activated protein C resistance--a major risk factor for thrombosis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1997; 35(7): 501–16.

Schweizer U., Bräuer A.U., Köhrle J., Nitsch R., Savaskan N.E. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004; 45(3): 164–178.

Senko O.V., Kodryan M.S., Kuznecova A.V., Klimenko L.L., Baskakov I.S., Mazilina A.N. Optimal Partitioning Method for Evaluating of Effect of Hemoglobin Oxygenation Levels of Vessel Endothelial Growth Factor. *Math. Biol. Bioinf.* 2018; 13(2): 563–590.

Skalny A.V. Bioelements and bioelementology in pharmacology and nutrition: fundamental and practical aspects. Pharmacology and nutritional intervention in the treatment of disease. Edited by Faik Atroshi. 2014: 225–241.

Skalny A.V., Klimenko L.L., Mazilina A.N., Skal'naya M.G., Tinkov A.A. Selenium in Ischemic Stroke. *Selenium. Chapter 11.* 2018: 1–24. Editors: Michalke, Bernhard (Ed.). Due: November, 23. 2018; 793 p.

Skalny A.V., Klimenko L.L., Turna A.A., Budanova M.N., Baskakov I.S., Savostina M.S., Mazilina A.N., Deyev A.I., Skal'naya M.G., Tinkov A.A. Serum trace elements are as

sociated with hemostasis, lipid spectrum and inflammatory markers in men suffering from acute ischemic stroke. *Metabolic Brain Disease*. 2017; 32(3): 779–788. doi: 10.1007/s11011-017-9967-6.

Slavik L., Krcova V., Hlusi A., Prochazkova J., Prochazka M., Ulehlova J., Indrak K. Molecular pathophysiology of thrombotic states and their impact to laboratory diagnostics. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2009; 153(1): 19–25.

Tsushima M., Metoki N., Hagii J., Saito S., Shioto H., Yasujima M., Kato T., Kudo N., Toyama Y., Yokono Y., Nozaka M., Kawamura Y., Nakata M., Tomita H. D-dimer and C-reactive Protein as Potential Biomarkers for Diagnosis of Trousseau's Syndrome in Patients with Cerebral Embolism. *J. Stroke*

*Cerebrovasc. Dis*. 2020; 29(2): 104534.

Wu Y., Chu C., Song P., Yang Y., Lin C., Xu Q. Plasma D-dimer is a Promising Indicator for the Treatment of Acute Gouty Attack. *Ann. Clin. Lab. Sci*. 2018; 48(4): 435–439.

Yamamoto R., Nakae Y., Tanaka F., Johkura K. D-Dimer versus International Normalized Ratio of Prothrombin Time in Ischemic Stroke Patients Treated with Sufficient Warfarin. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis*. 2016; 25(7): 1781–1785.

Zhao Y., Pan R., Li S., Luo Y., Yan F., Yin J., Qi Z., Yan Y., Ji X., Liu K.J. Chelating intracellularly accumulated zinc decreased ischemic brain injury through reducing neuronal apoptotic death. *Stroke*. 2014; 45(4): 1139–1147. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.004296.

## TRACE ELEMENTS IN THE BLOOD COAGULATION SYSTEM IN ISCHEMIC STROKE: A CLINICAL STUDY

**L.L. Klimenko<sup>1</sup>, A.I. Deev<sup>1</sup>, I.S. Baskakov<sup>1</sup>, M.N. Budanova<sup>1</sup>, A.H. Zabirowa<sup>2</sup>, M.S. Uzhenceva<sup>3</sup>, A.N. Mazilina<sup>4</sup>, M.S. Savostina<sup>4</sup>, O.V. Senko<sup>5</sup>, A.V. Kuznecova<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> Institution of the Russian Academy of Sciences Institute of Chemical Physics named after N.N. Semenov RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Moscow State University named after M.V. Lomonosov Moscow, Russia

<sup>3</sup> Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> KH № 123 FMBA of Russia, Odintsovo, Moscow region, Russia

<sup>5</sup> Computing Center RAS, Moscow, Russia

<sup>6</sup> Institute of Biochemical Physics. N.M. Emanuel RAS, Moscow, Russia

**ABSTRACT.** The basis of the mechanism of ischemic brain tissue are hematological disorders. It is known that divalent ions influence the formation and structure of fibrin. In connection with this fact, a change in macro- and microelement balance serves as a marker of neurotrophic disturbances in the brain long before their clinical manifestations. The imbalance of metal-ligand homeostasis is an unfavorable background for the debut of ischemic stroke.

In a multifactorial coagulation system, specific proteins – Protein C and D-dimers – occupy a key place. Many macro- and microelements are mediators of homeostasis and thrombosis: violations of elemental homeostasis are the molecular basis of the ischemic process. In a study conducted in a clinical setting, the combined dynamics of protein C and D-dimers and a complex of macro- and microelements are shown with a high degree of certainty.

Using Spearman correlation analysis, reliable correlations were revealed between the concentrations of protein C, D-dimers and macro- and microelements in patients diagnosed with ischemic insult. In the final part of the mathematical processing of the results, multiple regression analysis was used, with the help of which a reliable relationship between protein C, a component of the blood coagulation system, and the concentration of a complex of macro- and microelements contributing to the central mechanism of etiopathogenesis of ischemic stroke is shown:  $R = 0.95938848$ ,  $R^2 = 0.92042626$ .

**KEYWORDS:** protein C, D-dimers, macro- and microelements.

### REFERENCES

Bakunts G.O. *Endogennye aktyory tsebral'nogo insulta*. M.: Goer-media. 2011. 357 s. (in Russ.).

Barsegyan A.A., Kupriyanov M.S., Stepanenko V.V., Kholod I.I. *Nekhnologii analiza dannykh. Data Mining, Visual Mining, Text Mining, OLAP*. SPb: BKhV-Peterburg. 2007 (in Russ.).

Gusev E.I., Kruzhanovsky G.N. (red.). *Dizregulyatsionnaya patologiya nervnoi sistemy*. M.: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo. 2009. 510 s. (in Russ.).

Eshchenko N.D. *Energeticheskii obmen v golovnom mozge. Biokhimiya mozga*. Ashmarin I.P. i dr. (red.). SPb. 1999. S. 124–168 (in Russ.).

- Klimenko L.L., Skalny A.V., Deev A.I., Baskakov I.S., Budanova M.N., Zabirowa A.Kh., Mazilina A.N., Savostina M.S. Kонтсентрати́я нейроспецифических белков S100, магния и микроэлементов в сыворотке крови как диагностический маркер ишемического инсульта. *Клиническое исследование. Микроэлементы в медицине*. 2019. Т. 20. Вып. 3. С. 31–37 (in Russ.).
- Klimenko L.L., Skalny A.V., Turna A.A., Kuznetsova A.V., Sen'ko O.V., Baskakov I.S., Budanova M.N., Savostina M.S., Mazilina A.N. Роль селена в многофакторном этиопатогенезе ишемического инсульта. *Микроэлементы в медицине*. 2015. Т. 16. Вып. 4. С. 28–35 (in Russ.).
- Senko O.V., Morozov A.M., Kuznetsova A.V., Klimenko L.L. Оценка эффекта множественного тестирования в методе оптимальных достоверных разбиений. *Машинное обучение и анализ данных*. 2016. Т. 2. № 1. С. 26–38 (in Russ.).
- Skalny A.V. *Микроэлементы*. 2018. Биоэлемент. 294 с. (in Russ.).
- Tul D.F. *Сосудистые заболевания головного мозга*. М.: Геотар-Медицина. 2007. 590 с. (in Russ.).
- Barros L.F., Ruminot I, San Martín A, Lerchundi R, Fernández-Moncada I, Baeza-Lehnert F. Aerobic Glycolysis in the Brain: Warburg and Crabtree Contra Pasteur. *Neurochem Res*. 2020. Jan 24. doi: 10.1007/s11064-020-02964-w.
- Bates S.M., Grand'Maison A., Johnston M, Naguit I, Kovacs MJ, Ginsberg JS.. A latex D-dimer reliably excludes venous thromboembolism. *Arch Intern Med*. 2001; 161: 447–453.
- Bhudia S.K., Cosgrove D.M., Naugle R.I., Rajeswaran J., Lam B.K., Walton E., Petrich J., Palumbo R.C., Gillinov A.M., Aperson-Hansen C., Blackstone E.H. Magnesium as a neuroprotectant in cardiac surgery: a randomized clinical trial. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 2006. 131(4): 853–861. Erratum in: *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007; 134(2): 25A
- Dahlbäck B1, Villoutreix BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(7): 1311–1320.
- Ernst, M. Permutation methods: A basis for exact inference. *Stat. Sci*. 2004; 19(4): 676–685.
- Girolami A., Cosi E., Ferrari S., Girolami B. Heparin, coumarin, protein C, antithrombin, fibrinolysis and other clotting related resistances: old and new concepts in blood coagulation. *Thromb Thrombolysis*. 2018; 45(1): 135–141.
- Good P.I. *Permutation, parametric and bootstrap tests of hypotheses*. Springer ser. in statistics – 3rd ed. Springer. 2005. 334 p.
- Hamatani Y., Nagai T., Nakai M., Nishimura K., Honda Y., Nakano H., Honda S., Iwakami N., Sugano Y., Asaumi Y., Aiba T., Noguchi T., Kusano K., Toyoda K., Yasuda S., Yokoyama H., Ogawa H., Anzai T.; NaDEF Investigators. Elevated Plasma D-Dimer Level Is Associated With Short-Term Risk of Ischemic Stroke in Patients With Acute Heart Failure. *Stroke*. 2018; 49(7): 1737–1740.
- Hara T., Tatsuishi H., Banno T., Fujie T., Yamamoto C., Naka H., Kaji T. Copper(II) Bis(diethyldithiocarbamate) Induces the Expression of Syndecan-4, a Transmembrane Heparan Sulfate Proteoglycan, via p38 MAPK Activation in Vascular Endothelial Cells. *Int J Mol Sci*. 2018; 24(19(11)): E3302.
- Hepner M., Karlaftis V. Protein C. *Methods Mol Biol*. 2013; 992: 365–372.
- Ito S., Kikuchi K., Ueda A., Nagao R., Maeda T., Murate K., Shima S., Mizutani Y., Niimi Y., Mutoh T. Changes in Serial D-Dimer Levels Predict the Prognoses of Trousseau's Syndrome Patients. *Front Neurol*. 2018; 3(9): 528. doi: 10.3389/fneur.2018.00528. eCollection 2018.
- Kim H.-J., Fay M.P., Feuer E., Midthune D.N. Permutation tests for joint point regression with applications to cancer rates. *Stat. Medicine*. 2000; 19(3): 335–351.
- Klimenko L.L., Skalny A.V., Deev A.I., Baskakov I.S., Budanova M.N., Zabirowa A.Kh., Mazilina A.N., Savostina M.S. Neurospecific proteins of S100 family and metal-ligand homeostasis in etiopathogenesis of ischemic stroke: a literature review. *Trace elements in Medicine*. 2019; 20(4): 1–23.
- Klimenko L.L., Skalny A.V., Deev A.I., Baskakov I.S., Budanova M.N., Zabirowa A.Kh., Mazilina A.N., Savostina M.S. The concentration of neurospecific proteins S100, magnesium and trace elements in blood serum as a diagnostic marker of ischemic stroke: a clinical study. *Trace elements in Medicine*. 2019; 20(3): 1–19.
- Klimenko L.L., Skalny A.V., Tutna A.A., Budanova M.N., Baskakov I.S., Savostina M.S., Mazilina A.N., Deev A.I., Skal'naya M.G., Tinkov A.A. Serum electrolytes are associated with markers of neuronal damage in transient ischemic attack and ischemic stroke patients. *Trace Elements and Electrolytes*. 2017; 34(1): 29–33.
- Larsson S.C., Orsini N., Wolk A. Dietary magnesium intake and risk of stroke: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr*. 2012; 95(2): 362–366.
- Loscalzo J. Redox Dysregulation in Vascular Pathobiology. *Free Radic Biol Med*. 2014; 75(1): S2. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.597.
- Misra S., Kumar A., Kumar P., Yadav A.K., Mohania D., Pandit A.K., Prasad K., Vibha D. Blood-based protein biomarkers for stroke differentiation: A systematic review. *Proteomics Clin. Appl*. 2017; 11: 9–10.
- Ogata T., Kamouchi M., Kitazono T., Kuroda J., Ooboshi H., Shono T., Morioka T., Ibayashi S., Sasaki T., Iida M. Cerebral venous thrombosis associated with iron deficiency anemia. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2008; 17(6): 426–428.
- Riva N., Vella K., Hickey K., Bertù L., Zammit D., Spiteri S., Kitchen S. Makris M., Ageno W., Gatt A. Biomarkers for the diagnosis of venous thromboembolism: D-dimer, thrombin generation, procoagulant phospholipid and soluble P-selectin. *J Clin Pathol*. 2018; 71(11): 1015–1022.
- Rosén S.B., Sturk A. Activated protein C resistance—a major risk factor for thrombosis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1997; 35(7): 501–16.

Schweizer U., Bräuer A.U., Köhrle J., Nitsch R., Savaskan N.E. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004; 45(3): 164–178.

Senko O.V., Kodryan M.S., Kuznecova A.V., Klimenko L.L., Baskakov I.S., Mazilina A.N. Optimal Partitioning Method for Evaluating of Effect of Hemoglobin Oxygenation Levels of Vessel Endothelial Growth Factor. *Math. Biol. Bioinf.* 2018; 13(2): 563–590.

Skalny A.V. Bioelements and bioelementology in pharmacology and nutrition: fundamental and practical aspects. *Pharmacology and nutritional intervention in the treatment of disease.* Edited by Faik Atroshi. 2014: 225–241.

Skalny A.V., Klimenko L.L., Mazilina A.N., Skalnaya M.G., Tinkov A.A. Selenium in Ischemic Stroke. *Selenium.* Chapter 11. 2018: 1–24. Editors: Michalke, Bernhard (Ed.). Due: November, 23. 2018; 793 p.

Skalny A.V., Klimenko L.L., Turna A.A., Budanova M.N., Baskakov I.S., Savostina M.S., Mazilina A.N., Deyev A.I., Skalnaya M.G., Tinkov A.A. Serum trace elements are associated with hemostasis, lipid spectrum and inflammatory markers in men suffering from acute ischemic stroke. *Metabolic Brain Disease.* 2017; 32(3): 779–788. doi: 10.1007/s11011-017-9967-6.

Slavik L., Krcova V., Hlusi A., Prochazkova J., Prochazka M., Ulehlova J., Indrak K. Molecular pathophysiology of thrombotic states and their impact to laboratory diagnostics. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009; 153(1): 19–25.

Tsushima M., Metoki N., Hagii J., Saito S., Shiroto H., Yasujima M., Kato T., Kudo N., Toyama Y., Yokono Y., Nozaka M., Kawamura Y., Nakata M., Tomita H. D-dimer and C-reactive Protein as Potential Biomarkers for Diagnosis of Trousseau's Syndrome in Patients with Cerebral Embolism. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2020; 29(2): 104534.

Wu Y., Chu C., Song P., Yang Y., Lin C., Xu Q. Plasma D-dimer is a Promising Indicator for the Treatment of Acute Gouty Attack. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2018; 48(4): 435–439.

Yamamoto R., Nakae Y., Tanaka F., Johkura K. D-Dimer versus International Normalized Ratio of Prothrombin Time in Ischemic Stroke Patients Treated with Sufficient Warfarin. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2016; 25(7): 1781–1785.

Zhao Y., Pan R., Li S., Luo Y., Yan F., Yin J., Qi Z., Yan Y., Ji X., Liu K.J. Chelating intracellularly accumulated zinc decreased ischemic brain injury through reducing neuronal apoptotic death. *Stroke.* 2014; 45(4): 1139–1147. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.004296.