

РОЛЬ НАРУШЕНИЙ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА В МЕХАНИЗМАХ ИММУННОЙ ДИСРЕГУЛЯЦИИ И ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ РАННИХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Давыдова Е.В.¹, Зурочка А.В.^{2,3}, Зурочка В.А.^{2,3}, Альтман Д.Ш.¹

¹ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», г. Челябинск, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

³ ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия

Резюме. Известно, что иммунологический компонент практически любой дисрегуляторной патологии проявляется формированием новых функциональных систем, обеспечивающих адаптационные реакции, а также наличием аллостаза, отражающего иные, отличные от нормы формы и варианты взаимоподдерживающих связей, возникающих на разных структурно-функциональных уровнях организма. Длительное пребывание на театре военных действий неизбежно оказывает свое негативное влияние на процессы реадaptации к мирной жизни и сопровождается появлением патологических функциональных связей, приводящих к нарушению регуляции основных функций и систем, в том числе нервной и иммунной. В связи с этим нами изучены особенности функционирования иммунных клеток у пациентов с ранними формами хронической ишемии мозга в условиях гиперлипидемии, проведена комплексная оценка факторов, характеризующих морфологическое и функциональное состояние эндотелия. Проведено комплексное обследование 87 пациентов, принимавших участие в Афганской кампании с ранними формами недостаточности мозгового кровообращения. Исследуемые имели объективные и субъективные признаки основного сосудистого заболевания, характерные для самых ранних проявлений хронической цереброваскулярной недостаточности, в виде головной боли, головокружения, шума в голове, нарушений памяти, снижения работоспособности. Всем пациентам проведено комплексное обследование: развернутая липидограмма, определение вазоактивных факторов в крови и культуральной жидкости, количество циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов, характеризующее морфологические признаки повреждения эндотелия, дополнительно проводилась ультразвуковая доплерография магистральных сосудов, транскраниальная доплерография и электроэнцефалография.

Известно, что клетки эндотелия самостоятельно способны модулировать тонус сосудов в зависимости от текущей ситуации, а также могут быть подвергнуты ремоделирующим перестройкам при вовлечении в патологический процесс, например атероматоз. В связи с этим ключевым фактором развития сосудистой патологии, затрагивающим системный уровень, является дисфункция эндотелия. По результатам исследования установлено, что основным механизмом прогрессирования ран-

Адрес для переписки:

Давыдова Евгения Валерьевна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет»
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (908) 060-92-06.
E-mail: dav-zhenya@yandex.ru

Address for correspondence:

Davydova Eugenia V.
South Ural State Medical University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (908) 060-92-06.
E-mail: dav-zhenya@yandex.ru

Образец цитирования:

Е. В. Давыдова, А. В. Зурочка, В. А. Зурочка, Д. Ш. Альтман «Роль нарушений липидного обмена в механизмах иммунной дисрегуляции и дисфункции эндотелия при ранних формах хронической цереброваскулярной недостаточности» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1043-1054.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1043-1054
© Давыдова Е. В. и соавт., 2019

For citation:

E. V. Davydova, A. V. Zurochka, V. A. Zurochka, D. S. Altman "Role of lipid metabolic disturbances for the mechanisms of immune dysregulation and endothelial dysfunction in early forms of chronic cerebrovascular insufficiency", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1043-1054.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1043-1054
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1043-1054

них форм ХЦВН является развитие эндотелиальной дисфункции, в мультифакторном генезе которой принимают непосредственное участие и иммунные механизмы. Гиперлипидемия, наличие которой установлено более чем в 90% случаев, является одним из важнейших метаболических пусковых факторов развития иммунных реакций, чему способствует также дисбаланс вазоформных и тромбогенных факторов, наличие маркеров оксидативного и нитрозативного клеточного стресса, в целом способствующих нарастанию явлений церебрального сосудистого ремоделинга и лежащих в основе формирования органической патологии ЦНС.

Ключевые слова: начальные проявления недостаточности кровоснабжения мозга, гиперлипидемия, моноциты, эндотелиальная дисфункция

ROLE OF LIPID METABOLIC DISTURBANCES FOR THE MECHANISMS OF IMMUNE DYSREGULATION AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN EARLY FORMS OF CHRONIC CEREBROVASCULAR INSUFFICIENCY

Davydova E.V.^a, Zurochka A.V.^{b,c}, Zurochka V.A.^{b,c}, Altman D.S.^a

^a South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

^b Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

^c South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. It is known that the immunological component of nearly any dysregulatory pathology is manifested by the development of new functional systems providing adaptation reactions, as well as by the presence of allostasis, reflecting other forms that are different from the normal parameters, and variants of mutually supporting relationships that occur at different structural and functional levels of the body. A long stay in the areas of military campaigns inevitably has a negative impact on the re-adaptation for civilian life, and it is accompanied by occurrence of pathological functional connections that lead to dysregulation of the basic functions, including those of nervous and immune systems. In this regard, we studied the features of immune cell functioning in the patients with early forms of chronic cerebral ischemia accompanied by hyperlipoproteinemia, and we have made a comprehensive assessment of the factors characterizing morphological and functional state of endothelium. A representative survey included 87 patients who participated in the Afghan campaign with early forms of cerebral circulatory failure. The subjects exhibited objective and subjective signs of underlying vascular disease, typical to the earliest manifestations of chronic cerebrovascular insufficiency (CVVN) manifesting as headache, dizziness, noise in the head, memory impairment, decreased performance. All the patients underwent a comprehensive examination, i.e., expanded lipidogram, determination of vasoactive factors in the blood and cultural fluid, the number of circulating desquamated endotheliocytes, thus reflecting morphological signs of endothelial damage, additional ultrasound Doppler sonography of the main vessels, transcranial Doppler and electroencephalography were carried out.

It is known that endothelial cells are independently capable of modulating vascular tone, depending on the current clinical condition, and it may be also subjected to remodeling rearrangements with involvement into the pathological process, e.g., in atheromatosis. In this regard, endothelial dysfunction is a key factor in developing vascular pathology, affecting the systemic level. According to results of the study, it has been established that the main progression mechanism for the early forms of CVVN is the development of endothelial dysfunction. The condition has multifactorial genesis in which immune mechanisms are directly involved. Hyperlipoproteinemia established in more than 90% of cases, is one of the most important metabolic triggering factors for development of immune reactions, which is also promoted by imbalance of vasoform and thrombogenic factors, by presence of oxidative and nitrosative cellular stress markers which generally contribute to increase in cerebral vascular remodeling and the basis for the formation of organic pathology of the central nervous system.

Keywords: brain blood supply, early insufficiency, hyperlipidemia, monocytes, endothelial dysfunction

Введение

Современные представления о патогенезе практически любой нозологической формы включают рассмотрение механизмов системной и локальной иммунной дисрегуляции. Формирование ранних форм недостаточности мозгового кровообращения также следует изучать с позиций нейроиммунного взаимодействия. Формирование новой адаптационной системы сопровождается формированием изменений конструкции функциональных связей и систем аллостатической направленности [9]. Военный стресс неизбежно оказывает свое негативное влияние на процессы реадаптации к мирной жизни и сопровождается появлением патологических функциональных связей, приводящих к нарушению регуляции основных функций и систем, в том числе нервной и иммунной. Клиническая манифестация ранних форм хронической ишемии мозга сопровождается нарушением процессов сосудистой вазорегуляции, гипоксией нейронов и глии, нарушением нормального функционирования эндотелия церебральных сосудов на уровне микроциркуляторного русла и атероматозом магистральных сосудов, изменением реологии крови, что приводит к повреждению и повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера, и свободным обменом органоспецифических мозговых пептидов с периферическим кровотоком с неизбежным разворачиванием аутоиммунных реакций на территории ЦНС и на периферии, что, в свою очередь, приводит к формированию аутоиммунного профиля реагирования иммунной системы и накоплению специфических аутоантител к антигенам мозговой ткани различной специфичности. Особая роль в реализации механизмов клеточного повреждения при церебральной ишемии принадлежит механизму глутаматной эксайтотоксичности.

Целью исследования явилась оценка влияния изменений липидного статуса крови на факторы иммунных реакций и эндотелия при ранних формах недостаточности мозгового кровообращения.

Материалы и методы

Для участия в исследовании методом простой рандомизации были отобраны 87 пациентов мужского пола (средний возраст $45,1 \pm 1,4$ года), участников военной кампании в Афганистане с ранними формами цереброваскулярной недостаточности (2 группа – основная), в контрольную группу 1 вошли 30 здоровых мужчин в возрасте 35-55 лет без субъективных и объективных проявлений цереброваскулярной патологии, имеющих показатели липидограммы в пределах

возрастной нормы. Диагноз пациентам основной группы выставлен в соответствии с классификацией сосудистых поражений головного мозга под редакцией Шмидта Е.В. (1985) [7], а также с учетом ряда клинических и инструментальных методов исследования. У всех пациентов имели место признаки основного сосудистого заболевания и набор жалоб, характерных для самых ранних проявлений хронической цереброваскулярной недостаточности, а именно: головная боль, головокружение, шум в голове, нарушение памяти, снижение работоспособности. Всем пациентам проводились дополнительные методы нейровизуализации, ультразвуковая доплерография магистральных сосудов, транскраниальная доплерография и электроэнцефалография. В качестве материала для исследования использовали венозную кровь, собранную натощак.

Оценка показателей развернутой липидограммы

В качестве базового документа для сравнения показателей липидного спектра использовали рекомендации Национальной образовательной программы по холестерину (National Cholesterol Education Program, NCEP, США, 2001) и российским рекомендациям [3]. Для определения концентрации общего холестерина, триглицеридов, холестерина в составе липопротеинов низкой и высокой плотности использовали анализатор биохимический ФП-901М фирмы Labsystems (Финляндия) с набором стандартных реагентов. Показатели выражали в ммоль/л. Используя формулы, вычисляли показатели ХС ЛПОНП и ХС ЛПНП:

$$\text{ХС ЛПОНП} = \text{ТГ} / 2,2 \text{ (ммоль/л);}$$

$$\text{ХС ЛПНП} = \text{Общий ХС} - \text{ХС ЛПВП} - \text{ХС ЛПОНП (ммоль/л).}$$

Измерение концентрации конечных дериватов оксида азота в крови и культуральной жидкости

Продукцию оксида азота в сыворотке и культуральной жидкости оценивали, применяя реакцию Гриса по методу Н.Л. Емченко и соавт. (1994) [4] в модификации [6]. Оценивали содержание терминальных метаболитов оксида азота нитритов (NO_2), нитратов (NO_3) и их суммарных продуктов (NO_x). В эксперименте *in vitro* моноциты в количестве 600 тысяч клеток инкубировали в питательной среде с экспозицией в течение 1 часа и последующим определением концентрации метаболитов оксида азота.

Определение уровня эндотелина-1, нитротирозина и васкулоэндотелиального фактора роста

Для детекции уровня эндотелина-1 применяли непрямой метод ИФА, используя высокочувствительную (0,02-10 фмоль/мл) тест-систему производства Biomedica (Австрия). Нитротирозин определяли с применением набора для иммуноферментного анализа NBT Nitrotyrosine ELISA

(ЗАО «БиоХимМак»), результат выражали в нМ; уровень васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) – в пг/мл, с помощью тест-системы (eBioscience, BenderMedSystems, ЗАО «БиоХимМак»). Измерения проводили на спектрофотометре Multiscan Plus (Финляндия) при соответствующей длине волны.

Оценка адгезивной способности мононуклеаров

Выделение популяции моноцитов с определением процентного и абсолютного содержания производили на гематологическом анализаторе Coulter LH 500 фирмы Beckman Coulter (США). Параллельно применялся стандартный и спектрофотометрический метод определения адгезии мононуклеаров на пластик. При стандартном методе клетки в концентрации 2×10^6 кл/мл подвергали инкубации в стандартных условиях с последующим подсчетом в камере Горяева. Выражали в процентах. При спектрофотометрической оценке теста в лунки плоскодонного 96-луночного планшета вносили по 200 мкл клеточной суспензии в концентрации 2×10^6 кл/мл, подвергали инкубации, отмывали, фиксировали и окрашивали краской по Романовскому–Гимзе. Результат учитывали на спектрофотометре Multiscan Plus.

Определение функциональной активности мононуклеаров (бактерицидные и пролиферативные свойства)

Бактерицидные свойства фагоцитов оценивали при помощи проведения спонтанного и индуцированного МТТ-теста спектрофотометрическим методом [8]. При проведении МТТ-теста бесцветная соль тетразолия подвергается ферментативному восстановлению внутриклеточными дегидрогеназами. Кристаллы формазана растворяются в ДМСО и измеряются на спектрофотометре при длине волны 560 нм.

Исследование способности клеток к пролиферации осуществляли в стерильных условиях, для этого выделенные клетки помещали в 96-луночные планшеты, внося параллельно в лунки питательную суспензию, содержащую среду RPMI 1640, 2мМ L-глутамин и 40 мкг/мл гентамицина сульфата. После 12-часовой инкубации в лунки вносили витальный краситель AlamarBlue® (Invitrogen, США). Флуоресценцию измеряли через 4 часа на флуориметре VersaFluor (Bio-Rad) при длине волны возбуждения 390 нм, эмиссии 620 нм и выражали в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ, Relative Fluorescent Units, RFU).

Оценка уровня циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов

Проводилась согласно стандартной методике [11] с последующим подсчетом клеток в камере Горяева и на микроскопе ЛОМО Микромед-1

(Россия). Результат измеряли в клетках/100 мкл (норма: 2-4 клеток/100 мкл).

Статистическая обработка материала

Для статистической обработки материала применяли пакет прикладных программ Statistica vers. 8.0 for Windows и IBM SPSS Statistics 19. Все показатели даны в виде среднего значения (M) и среднего арифметического (m), сравнение групп производили с помощью критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Эндотелиальная выстилка сосудов – метаболически активная функциональная система, регулирует обширный спектр физиологических процессов. Клетки эндотелия способны модулировать тонус сосудов в зависимости от актуальной ситуации, могут быть подвергнуты ремоделирующим перестройкам, участвуют в процессах гемостаза, воспалении, атероматозе. Согласно современным представлениям, дисфункция эндотелия есть ключевой фактор развития сосудистой патологии, затрагивающей системный уровень. При этом сам эндотелий может подвергаться негативным воздействиям и, напротив, выступать в роли медиатора патологического процесса. Нарушение в системе липидного гомеостаза с формированием гиперлипидемического профиля крови является мощнейшим повреждающим фактором сосудистого эндотелия. При этом наиболее атерогенными признаны липопротеины низкой плотности, содержащие аполипопротеин В-100, легко проникающие и накапливающиеся в стенках сосуда.

Количественные параметры липидограммы у пациентов с ранними формами хронической цереброваскулярной недостаточности (ХЦВН) даны в таблице 1.

Нами показано, что значения показателей липидного гомеостаза у больных с ранними формами хронической цереброваскулярной недостаточности практически по всем позициям имеют значения, достоверно превышающие таковые в контрольной группе, что является актуальной предпосылкой для развития атеросклероза сосудов. Показатель общего холестерина в группе пациентов с ранними формами ХЦВН соответствовал погранично высокому (5,2-6,2 ммоль/л), что отражает умеренный тип гиперхолестеринемии. Количество триглицеридов при ХЦВН также было повышенным в сравнении с контрольной группой, однако значения в целом соответствовали показателям международной «нормы» (менее 2,3 ммоль/л). Уровень ХС в составе ЛПНП, ЛПОНП и показатель атерогенности по Климову у больных с ХЦВН соответствовали по значению погранично высокому уровню. Высокие концен-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДОГРАММЫ У ПАЦИЕНТОВ С РАННИМИ ФОРМАМИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ (ХЦВН) (M±m)

TABLE 1. INDICATORS OF LIPID PROFILE IN PATIENTS WITH EARLY FORMS OF CHRONIC CEREBROVASCULAR INSUFFICIENCY (M±m)

Показатели Indicators	Группа 1 Контрольная с нормолипидемией Group 1 Control with normolipidemia n = 30	Группа 2 Ветераны с ранними формами ХЦВН с гиперлипидемией Group 2 Veterans with early forms of chronic cerebrovascular insufficiency with hyperlipidemia n = 87	p difference confidence indicator
ОХС, ммоль/л Total cholesterol, mmol/l	4,50±0,14	5,30±0,13	< 0,01
ТГ, ммоль/л TG, mmol/l	1,27±0,12	2,17±0,13	< 0,01
ХС-ЛПВП, ммоль/л HDL, mmol/l	1,04±0,08	1,09±0,06	
ХС-ЛПНП, ммоль/л LDL, mmol/l	2,18±0,12	3,80±0,12	< 0,01
ХС-ЛПОНП, ммоль/л LPONP, mmol/l	0,53±0,02	0,98±0,05	< 0,01
КА (коэффициент атерогенности по Климову) Coefficient of atherogenicity according to Klimov	3,02±0,16	4,35±0,10	< 0,01

Примечание. p – показатель значимости различий между группами по критерию Манна–Уитни.

Note. p, an indicator of the significance of differences between groups according to the criterion of Mann–Whitney.

трации триглицеридов в сыворотке крови отражают высокий атерогенный потенциал и ассоциируются с развитием и прогрессивным течением раннего атеросклероза. [10]. Следует отметить, что показанные нами изменения содержания отдельных фракций липопротеинов в сыворотке крови показывают наличие важнейшего модифицируемого фактора риска развития системного, в том числе церебрального, атеросклероза и непосредственно связанных с ним последствий в виде острых и хронических нарушений мозгового кровотока. Литературные данные свидетельствуют, что церебральные атеросклеротические поражения характеризуются стойким повышением отдельных классов липопротеидных частиц, а именно β-липопротеинов, характерных для липопротеинов промежуточной и низкой плотности, пре-β-липопротеинов, входящих в состав липопротеинов очень низкой плотности, а также триглицеридов и полиненасыщенных жирных кислот с формированием на этом фоне ПА, ПБ и IV типов гиперлипопротеинемий, согласно классификации Фредриксона.

Также общеизвестно, что атерогенный профиль липидного обмена заключается не только

в увеличении содержания атерогенных фракций липидов, но и в снижении содержания уровня холестерина в составе липопротеинов высокой плотности.

Нами проанализированы данные о распределении различных типов гиперлипопротеинемий среди пациентов с ранними формами хронической цереброваскулярной недостаточности. Так показано, что более 30% пациентов имели ПА тип ГЛП, для которого характерно изолированное повышение общего холестерина в крови, 29% пациентов имели ПБ тип ГЛП, отражающий повышение как ТГ, так и общего холестерина, часть пациентов (28%) имела как повышение уровня ТГ, так и холестерина в составе липопротеинов очень низкой плотности, остальные пациенты с ранними формами ХЦВН имели нормальный липидный профиль сыворотки крови.

Также контрольная группа соответствовала критериям нормолипидемии. В целом 90% обследуемой группы мужчин с ранними формами хронической цереброваскулярной недостаточности показывали различные изменения спектра липидов, что в сочетании с гипертоническим поражением сосудистого русла составляет морфо-

логический субстрат для формирования хронической церебральной сосудистой патологии.

Повышение в системном кровотоке избыточного количества молекул холестерина приводит к накоплению и оксидативной модификации белкового субстрата липопротеиновой молекулы, изменению реологических свойств крови, с повышением вязкости, адгезивной активности эндотелия в виде усиленной экспрессии молекул сосудистой адгезии и активации на этом фоне тромбоцитов. Циркулирующие моноциты, реагируя на ситуацию, в свою очередь, подвергаются также активации, за счет повышения активности молекул интегринов на своей поверхности, которые являются основными детерминирующими факторами селективной инвазии сосудистой стенки при формировании атеросклеротической бляшки. Все вышеперечисленные сведения дают основание предполагать непосредственное участие моноцитов в механизмах развития атеросклеротических поражений, и в связи с этим нами исследованы функциональные возможности моноцитов у пациентов с ранними формами хронической цереброваскулярной недостаточно-

сти в условиях как нормо-, так и гиперлипидемии (табл. 2).

Анализ таблицы 2 показал, что изменения липидного спектра сыворотки крови сопровождаются ростом абсолютного числа моноцитов, отражающего интенсивность моноцитопоза на уровне костного мозга, в сравнении с пациентами, имеющими нормальные показатели липидного спектра сыворотки крови. Функциональные возможности моноцитов в условиях гиперлипидемии также были изменены, в виде повышения адгезивной и пролиферативной активности клеток, отражающих активацию клетки ее выход из редокс-статуса. В варианте теста с микроскопической оценкой результатов исследования процент адгезии у лиц с ГЛП был выше на уровне статистической вероятности, а при спектрофотометрической оценке показатели оптической плотности были достоверно выше у пациентов с гиперлипидемией, что характерно для ее проявлений.

Исследование пролиферативной активности моноцитов, производимое с помощью AlamarBlue-теста, у пациентов с ранними фор-

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РАННИМИ ФОРМАМИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ (ХЦВН) ПРИ НАРУШЕНИЯХ ЛИПИДНОГО СПЕКТРА ($M \pm m$)

TABLE 2. CHARACTERISTICS OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES IN PATIENTS WITH EARLY FORMS OF CHRONIC CEREBROVASCULAR INSUFFICIENCY WITH LIPID SPECTRUM DISORDERS ($M \pm m$)

Показатели Indicators	Ветераны с ХЦВН с гиперлипидемией Veterans with chronic cerebrovascular insufficiency with hyperlipidemia n = 77	Ветераны с ХЦВН с нормолипидемией Veterans with chronic cerebrovascular insufficiency with normolipidemia n = 10	p difference confidence indicator
Моноциты, % Monocytes, %	10,8±2,1	8,56±1,40	
Моноциты, 10 ⁹ /л Monocytes, 10 ⁹ /l	0,94±0,02	0,76±0,04	< 0,01
% адгезии на пластик (визуальная оценка) % plastic adhesion (visual assessment)	67,30±2,79	64,4±3,5	
Адгезивная активность (RFU) Adhesive activity (RFU)	0,381±0,040	0,145±0,040	< 0,01
Пролиферативная активность моноцитов, AlamarBlue-тест (RFU) Monocyte proliferative activity, AlamarBlue test (RFU)	12560±479	11345±562	0,01
Спонтанная МТТ-активность, у. е. Spontaneous MTT activity, c. u.	0,12±0,02	0,11±0,02	
Индукцированная МТТ-активность, у. е. Induced MTT activity, c. u.	0,356±0,060	0,312±0,080	

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ ДЕРИВАТОВ ОКСИДА АЗОТА В КРОВИ И КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С РАННИМИ ФОРМАМИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ (ХЦВН) В УСЛОВИЯХ НОРМО- И ГИПЕРЛИПИДЕМИИ (M±m)

TABLE 3. CONTENT OF NITRIC OXIDE DERIVATIVES IN THE BLOOD AND CULTURE FLUID IN PATIENTS WITH EARLY FORMS OF CHRONIC CEREBROVASCULAR INSUFFICIENCY UNDER CONDITIONS OF NORMAL AND HYPERLIPIDEMIA (M±m)

Показатели Indicators		Группа 1 Контрольная с нормолипидемией Group 1 Control with normolipidemia n = 30	Группа 2 Ветераны с ранними формами ХЦВН с гиперлипидемией Group 2 Veterans with early forms of chronic cerebrovascular insufficiency with hyperlipidemia n = 87	p difference confidence indicator
NO ₂ , мкмоль/л Nitrates, μmol/l		2,9±0,2	3,30±0,18	
NO _x , мкмоль/л Total nitrate index, μmol/l		22,30±0,79	23,80±0,96	
NO ₃ , мкмоль/л Nitrates, μmol/l		19,3±0,7	20,6±0,9	
Спонтанная продукция, мкмоль/л Spontaneous production, μmol/l	NO ₂	9,50±0,44	13,10±0,52	< 0,01
	NO _x	38,6±0,8	41,0±0,7	< 0,01
	NO ₃	29,1±3,9	31,20±3,03	
Индукцированная продукция, мкмоль/л Induced products, μmol/l	NO ₂	10,10±0,45	9,80±0,61	
	NO _x	46,2±1,8	33,40±2,41	
	NO ₃	22,4±2,7	23,5±2,4	

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

мами ХЦВН в условиях повышения отдельных липидных фракций обнаружило значимый рост показателя, доказывая непосредственное участие моноцитов крови в реакциях атероматоза, что в итоге приводит к клинической манифестации и прогрессивному течению системной, в том числе церебральной, сосудистой патологии.

Роль оксидативного стресса и окислительной модификации липопротеинов общеизвестна в патогенезе атеросклероза, в связи с этим нами исследована роль моноцитов в инициации оксидативного клеточного стресса с помощью определения МТТ-активности клеток. Моноциты пациентов с ранними формами ХЦВН имеют значительную тенденцию роста показателя активности, как в спонтанной, так и индуцированной пробе, отражающую интенсификацию процессов бактерицидности, обусловленную продукцией АФК, что в условиях гиперлипидемии провоцирует развитие оксидативного клеточного стресса.

Сосудистый эндотелий является активно метаболизующей тканью, синтезируя продукты, диаметрально противоположные по своим функциональным характеристикам, к которым можно отнести ряд вазоактивных пептидов, медиаторы воспаления, ростковые факторы, про- и дезагреганты. Снижение продукции вазодилаторов, в частности оксида азота, в условиях нарушений липидного обмена может привести к усилению констрикторных влияний на сосудистую стенку и развитию локального воспаления в ней. Проведенная нами оценка количества констрикторов и дилаторов преимущественно эндотелиального происхождения (derivатов оксида азота и одной из изоформ эндотелина-1) (табл. 3) у пациентов с ранними формами ХЦВН в условиях гиперлипидемии продемонстрировала отсутствие значимых изменений в содержании терминальных метаболитов оксида азота у лиц с нормо- и гиперлипидемией.

Интактные клетки эндотелиальной выстилки сосудов находятся в состоянии базального уровня функционирования, при котором конститутивная eNOS находится в состоянии редокс, то есть неактивна. В условиях повышенной потребности или ее несостоятельности функцию эндогенного поставщика оксида азота берет на себя индуцибельная синтаза моноцитарного или эндотелиального происхождения *mac NOS*, которая, помимо своей бактерицидной функции, обладает свойствами эндогенного вазодилатора.

При исследовании культуральной жидкости, взятой от неактивированных моноцитов пациентов с ранними формами ХЦВН, имеющих нарушения липидного спектра, в условиях *in vitro* имело место значимое повышение суммарной продукции стабильных метаболитов оксида азота и нитритов в сравнении с контрольной группой. Количество нитратов имело стойкую тенденцию к повышению. При этом в культуральной жидкости, взятой от моноцитов здоровых лиц, суммарная продукция молекул оксида азота выросла в среднем в 1,3 раза при стимуляции ЛПС *S. typhi* в дозе 25 мкг/мл, а моноциты пациентов с ранними формами ХЦВН не отвечали подъемом показателя, что свидетельствует об истощении функциональных резервов клеток в результате возможной гиперактивации. Многоликая роль интермедиатов оксида азота связана с его реакционной способностью. Что позволило выделить группу «реакционно-активных форм азота», по аналогии с кислородом, к которым относится, в том числе, и монооксид азота, пероксинитрит и нитрит (диоксид азота). В свою очередь, пероксинитрит способен значительно модифицировать мембраносвязанные молекулы практически любых биологических мембран, инактивировать ферменты антиоксидантной защиты. Тем не менее двойственность механизмов действия на различные структуры клетки, с одной стороны, как стимуляторов метаболических процессов, с другой — как повреждающих факторов, зависит от концентрации и величины сигнала. В низких концентрациях активные формы азота работают как стимуляторы биологической активности клетки, ее адаптационного потенциала, за счет, например, включения генов фактора ядерной транскрипции (NF-κB). В условиях гиперлипидемии высоконасыщенные липидами мембраны клеток становятся доступной мишенью для мощных прооксидантов из числа реакционно-активных молекул азота, инициируя явление нитрозативного клеточного стресса.

Известно, что нитрозилированию, то есть введению нитрогруппы в молекулы органических соединений в условиях окислительного клеточного стресса, могут подвергаться не только ли-

пиды, но и белковые соединения, например аминокислота тирозин, с образованием конечного стабильного продукта окисления нитротирозина, при этом последний может претендовать на роль биомаркера выраженности окислительного нитрозативного стресса, наличия системного воспалительного ответа и принимать косвенное участие в формировании некоторых нейродегенеративных процессов ЦНС. Имеются отдельные сведения о роли нитротирозина в качестве триггера ремоделирования сосудистой стенки.

Исследование концентрации нитротирозина у пациентов с ранними формами ХЦВН показало его достоверное повышение при I, II и IV типах гиперлипидемий, характеризующихся высоким содержанием атерогенных фракций липидов, соответственно, $3,6 \pm 0,02$ нМ ($p = 0,02$); $4,2 \pm 0,02$ нМ ($p = 0,001$); $3,8 \pm 0,02$ нМ ($p = 0,03$) в сравнении с показателем контрольной группы с нормолипидемией ($0,97 \pm 0,003$) нМ. Так как формирование ранних форм хронической цереброваскулярной недостаточности происходит на фоне системного поражения сосудистого русла, можно считать повышение показателей нитротирозина маркером нитрозативного повреждения эндотелия токсичными соединениями оксида азота и фактором медиаторного повреждения стенки сосудов, усугубляющего дисфункцию эндотелия.

Концепция формирования эндотелиальной дисфункции постулирует наличие дисбаланса вазоактивных факторов, поэтому нами предпринято определение одного из наиболее мощных вазоконстрикторов — эндотелина-1 (ЭТ-1), который является секреторным продуктом эндотелиальных, гладкомышечных клеток, а также нейронов, астроцитов и некоторых других эпителиоцитов. В условиях спазма и ишемии сосудов синтез эндотелина-1 стимулируется тромбином, адреналином, провоспалительными цитокинами (IL-1, IL-6). Высокие концентрации эндотелина-1 могут полностью нивелировать действие вазодилаторов, в том числе оксида азота. Кроме эндотелина, в процессах ремоделирования сосудистой стенки активное участие принимает важнейший фактор ангиогенеза — сосудистый фактор роста эндотелия (VEGF), обладающий способностью к индукции хемотаксического передвижения моноцитов и клеток эндотелия, и играет важнейшую роль в процессах неоангиогенеза.

Кроме дисфункциональных изменений сосудов, представляет особый интерес морфологическая диагностическая оценка эндотелиопатии как наиболее объективный критерий повреждения сосудистой стенки. Нами произведена цитологическая оценка эндотелиальной дисфункции, основанная на подсчете циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов, клеток эндотелия,

которые слущиваются с поверхности сосудистой стенки в результате ее повреждения. В нормальных условиях количество данных клеток очень мало, и, попадая в кровоток, они поглощаются клетками моноцитарно-макрофагальной системы. Следовательно, их повышение в системном кровотоке является отражением массивного повреждения эндотелия (табл. 4).

Анализ данных таблицы 4 показал почти двукратное повышение уровня эндотелина-1 в сыворотке пациентов с ранними формами ХЦВН при гиперлипидемии в сравнении с группой контроля. Из этого следует, что повышение отдельных фракций липопротеидов в крови или их комбинации, окислительная модификация могут способствовать индукции синтеза ЭТ-1, который, в свою очередь, обладая рядом эффектов на сосудистую стенку, приводит к ее ремоделированию за счет митогенеза, стимуляции гладкомышечных клеток, фибробластов и тем самым к участию в процессах неоангиогенеза [2]. Подтверждением тому служит избыточная концентрация васкулоэндотелиального фактора роста в этих условиях, приводящая к изменению контрактильности сосудистой стенки, повышению проницаемости гемато-энцефалического барьера [5]. Расчет соотношения вазоактивных факторов показал самый высокий коэффициент в группе здоровых мужчин с нормальными параметрами липидного спектра крови, преимущественно за счет низко-

го уровня продукции ЭТ-1. В группе пациентов с ранними формами ХЦВН расчетный показатель оказался ниже практически в 2 раза, за счет снижения содержания нитритов в сыворотке и высокого значения показателя ЭТ-1. Кроме того, доказано, что повышенная секреция ЭТ-1 способствует синтезу простагландинов и тромбоксанов, обладающих констрикторным и проагрегантным действием.

Известно также свойство VEGF отвечать релаксирующей реакцией, взаимодействуя через PI3K/Akt- и MAPK-пути, а также посредством активации синтеза простациклина (PGI₂), одного из мощнейших вазодилататоров, следовательно, повышение васкулоэндотелиального фактора роста в данных условиях можно рассматривать как некий механизм компенсации NO-зависимой вазодилатации.

Количество ЦДЭ в контрольной группе, согласно нашим данным, не превышало нормы, данной в работе [11] (2-4 клетки/100 мкл). При ранних формах ХЦВН в условиях гиперлипидемии происходило значительное (в 2,8 раза) повышение концентрации десквамированных эндотелиоцитов в кровотоке, что является прямым следствием повреждения эндотелия и наличия системной эндотелиопатии.

Вазопрессорный профиль сыворотки крови неизбежно сказывается на изменении гемореологии и сопровождается нарушением адгезивных

ТАБЛИЦА 4. ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО И МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ РАННИХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ (ХЦВН) В УСЛОВИЯХ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ (M±m)

TABLE 4. INDICATORS OF THE FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL STATE OF THE ENDOTHELIUM IN EARLY FORMS OF CHRONIC CEREBROVASCULAR INSUFFICIENCY IN CONDITIONS OF HYPERLIPIDEMIA (M±m)

Показатели Indicators	Группа 1 Контрольная с нормолипидемией Group 1 Control with normolipidemia n = 30	Группа 2 Ветераны с ранними формами ХЦВН с гиперлипидемией Group 2 Veterans with early forms of chronic cerebrovascular insufficiency with hyperlipidemia n = 77	p difference confidence indicator
Эндотелин-1, фмоль/мл Endothelin 1, fmol/ml	1,7±0,1	4,9±0,1	0,002
NO ₂ /ЭТ-1 Nitrites/endothelin-1	3,60±0,15	1,31±0,50	< 0,01
VEGF, пг/мл VEGF, pg/ml	30,6±5,6	83,8±2,4	0,001
ЦДЭ, клеток/100 мкл CEA, cells/100 μl	2,4±0,4	6,9±0,5	0,001

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 5. ФАКТОРЫ ТРОМБОГЕННОГО РИСКА У ПАЦИЕНТОВ С РАННИМИ ФОРМАМИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ (ХЦВН) В УСЛОВИЯХ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ (M±m)

TABLE 5. THROMBOGENIC RISK FACTORS IN PATIENTS WITH EARLY FORMS OF CHRONIC CEREBROVASCULAR INSUFFICIENCY IN CONDITIONS OF HYPERLIPIDEMIA (M±m)

Показатели Indicators	Группа 1 Контрольная с нормолипидемией Group 1 Control with normolipidemia n = 30	Группа 2 Ветераны с ранними формами ХЦВН с гиперлипидемией Group 2 Veterans with early forms of chronic cerebrovascular insufficiency with hyperlipidemia n = 77	p difference confidence indicator
Фибриноген, г/л Fibrinogen, g/l	2,70±0,19	6,71±0,10	0,02
Антитромбин-III, % Antithrombin III, %	103,1±3,4	102,7±2,3	
Эуглобулиновый фибринолиз, мин Euglobulin fibrinolysis, min	226,70±11,08	289,8±4,9	< 0,01

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

и агрегационных свойств тромбоцитов, что играет значимую роль в прогрессировании ранних форм хронической цереброваскулярной недостаточности. В связи с этим нами проведено исследование факторов тромбогенного риска (уровня фибриногена, антитромбина-III, времени эуглобулинового фибринолиза (табл. 5)).

Согласно исследованиям, на фоне проатерогенных изменений липидного спектра сыворотки крови у пациентов с ранними формами ХЦВН отмечены более высокие параметры эуглобулинового фибринолиза, отражающие удлинение времени растворения сгустка, что характеризует повышение тромбогенного риска и повышение концентрации фибриногена, что отражается на изменении гемореологии крови в условиях формирования ранних нарушений церебральной гемодинамики.

Таким образом, формирование ранних форм хронической цереброваскулярной недостаточности важнейшее значение имеет прогрессирование системной сосудистой патологии, обусловленное рядом неблагоприятных факторов: количественным и качественным нарушением липидного гомеостаза, эндотелиопатией, дисбалансом вазоактивных молекул и изменением гемореологии. Выявленные нами четыре вида гиперлипидемий более чем у 90% ветеранов с ранними формами ХЦВН, среди которых наиболее атерогенным является ПБ тип, могут быть одним из важнейших триггерных факторов развития системного и церебрального атеросклероза, что на фоне ремоделирующих сосудистых перестроек и нарушения проницаемости ГЭБ лежит в основе патогенеза прогрессирования хронической цереброваскулярной патологии.

Список литературы / References

1. Альтман Д.Ш., Давыдова Е.В. К вопросу о роли аутоиммунных механизмов в прогрессии ранних форм хронической ишемии мозга // Российский иммунологический журнал, 2013. Т. 7 (16), № 2-3 (1). С. 18-20. [Altman D.Sh., Davydova E.V. On the role of autoimmune mechanisms in the progression of early forms of chronic brain ischemia. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2013, Vol. 7 (16), no. 2-3 (1), pp. 18-20. (In Russ.)]
2. Гринштейн А.Б., Шнайдер Н.А. Цереброваскулярные осложнения артериальной гипертензии. Красноярск: КГМА, 2002. 160 с. [Greenstein A.B., Schneider N.A. Cerebrovascular complications of arterial hypertension]. Krasnoyarsk: Krasnoyarsk State Medical Academy, 2002. 160 p.
3. Диагностика и лечение артериальной гипертензии. Российские рекомендации (четвертый пересмотр) // Системные гипертензии, 2010. № 3. С. 5-26. [Diagnosis and treatment of hypertension. Russian recommendations (fourth revision). *Sistemnyye gipertenzii = Systemic Hypertension*, 2010, no. 3, pp. 5-26. (In Russ.)]

4. Емченко Н.Л., Цыганенко О.И., Ковалевская Т.В. Универсальный метод определения нитратов в биосредах организма // Клиническая лабораторная диагностика, 1994. № 6. С. 19-20. [Yemchenko N.L., Tsyganenko O.I., Kovalevskaya T.V. Universal method for the determination of nitrates in the biological media of the body. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 1994, no. 6, pp. 19-20. (In Russ.)]
5. Коваль С.Н., Милославский Д.К., Снегурская И.А. Терапевтический ангиогенез при заболеваниях внутренних органов – возможности и перспективы // Вісник проблем біології і медицини, 2013. Т. 1 (104), вип. 4. С. 20-27. [Koval S.N., Miloslavsky D.K., Snegurskaya I.A. Therapeutic angiogenesis in diseases of internal organs – opportunities and prospects. *Visnik problem biologii i meditsini = Bulletin of Biological Problems and Medicine*, 2013, Vol. 1 (104), Iss. 4, pp. 20-27. (In Russ.)]
6. Коробейникова Э.Н. Показатели липидного обмена в сыворотке практически здорового населения, проживающего в Южно-Уральском регионе в условиях адаптации к климатическим и техногенным воздействиям: методические рекомендации. Челябинск, 2002. С. 40-43. [Korobeynikova E.N. Indicators of lipid metabolism in the serum of a practically healthy population living in the South Ural region in terms of adaptation to climatic and man-made influences: guidelines]. Chelyabinsk, 2002, pp. 40-43.
7. Шмидт Е.В. Классификация сосудистых поражений головного и спинного мозга // Журнал невропатологии и психиатрии, 1985. № 9. С. 1281-1288. [Schmidt E.V. Classification of vascular lesions of the brain and spinal cord. *Zhurnal nevropatologii i psikiatrii = Journal of Neuropathology and Psychiatry*, 1985, no. 9, pp. 1281-1288. (In Russ.)]
8. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 2005, Vol. 11, pp. 127-152.
9. Felten D., Maida M.E. Psychoneuroimmunology // in book: Encyclopedia of the human brain. Ed.-in-chief V.S. Ramachandran. Academic Press, 2002, Vol. 4, pp. 103-127.
10. Gorelick P.B. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of stroke. *Am. J. Cardiol.*, 2008, Vol. 101, no. 12A, pp. 34F-40F.
11. Hladovec J., Prerovsky I., Stanek V. Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris. *Klin. Wochenschr.*, 1978, Vol. 56, pp. 1033-1036.

Авторы:

Давыдова Е.В. – д.м.н., доцент, профессор кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», г. Челябинск, Россия

Зурочка А.В. – д.м.н., профессор, профессор кафедры пищевых и биотехнологий, заведующий лабораторией молекулярной генетики и биотехнологии ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск; ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Davydova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pathophysiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Zurochka A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Food Technology and Biotechnology, Head, Laboratory of Molecular Genetics and Biotechnology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk; Leading Research Associate, Laboratory of Immunology Inflammation, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Зурочка В.А. — д.м.н., профессор кафедры пищевых и биотехнологий, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск; старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Альтман Д.Ш. — д.м.н., профессор кафедры нервных болезней ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», г. Челябинск, Россия

Zurochka V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Food Technology and Biotechnology, Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Genetics and Biotechnology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk; Senior Research Associate, Laboratory of Immunology Inflammation, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Altman D.Sh., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Nervous Diseases, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 25.03.2019
Отправлена на доработку 05.04.2019
Принята к печати 09.04.2019

Received 25.03.2019
Revision received 05.04.2019
Accepted 09.04.2019