

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР НЕВРОЛОГИИ»

На правах рукописи

РАСКУРАЖЕВ АНТОН АЛЕКСЕЕВИЧ

АСИМПТОМНЫЕ СТЕНОЗЫ ВНУТРЕННИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ:
БИОМАРКЕРЫ АТЕРОГЕНЕЗА

14.01.11 - нервные болезни

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Танащян М.М.

Москва - 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Атеросклероз как основная причина цереброваскулярных заболеваний.....	12
1.2. «Симптомные» и «асимптомные» стенозы брахиоцефальных артерий.....	16
1.3. Дисфункция эндотелия и прогрессирование атеросклероза.....	22
1.3.1 Оксид азота и атерогенез	24
1.3.2 Асимметричный диметиларгинин и атерогенез.....	26
1.4 Роль адипонектина в атерогенезе	29
1.5 Тканевой активатор плазминогена (t-PA) и ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1) и атерогенез	32
1.6 Генетические альтерации, модулирующие течение атеросклероза брахиоцефальных артерий.....	34
1.6.1 Однонуклеотидные полиморфизмы гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR).....	34
1.6.2 Однонуклеотидный полиморфизм в гене параоксоназы-1 (PON-1)..	35
1.6.3 Однонуклеотидный полиморфизм в гене Р-селектина.....	37
1.6.4 Однонуклеотидные полиморфизмы в генах PAI-1, альфа-1-антитрипсина (SERPINA-1) и аквапорина-9 (AQP-9).....	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
2.1. Общая характеристика больных	41
2.2. Характеристика методов исследования.....	44
2.2.1 Исследование биомаркеров методом иммуноферментного анализа (ИФА).....	45
2.2.2 Молекулярно-генетическое тестирование образцов крови.....	47

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	51
3.1. Оценка клинического состояния обследованных больных.....	51
3.1.1. Общесоматический статус больных.....	51
3.1.2. Оценка неврологического статуса обследованных больных.....	53
3.2. Степень поражения брахиоцефальных артерий по данным ультразвукового исследования	55
3.3. Состояние биомаркеров атерогенеза.....	57
3.3.1 Оценка метаболизма системы оксида азота (NO).....	57
3.3.2 Оценка показателей фибринолитического звена системы гемостаза.....	61
3.3.3 Оценка содержания адипонектина в исследуемых группах.....	64
3.4 Генетические альтерации в генах, ответственных за различные звенья атерогенеза	66
3.4.1 Однонуклеотидные полиморфизмы в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR).....	66
3.4.2 Однонуклеотидный полиморфизм в гене параоксоназы-1.....	68
3.4.3 Однонуклеотидный полиморфизм в гене Р-селектина.....	69
3.4.4 Однонуклеотидные полиморфизмы в генах PAI-1, альфа-1- антитрипсина (SERPINA-1) и аквапорина-9 (AQP-9).....	71
3.4.5 Ассоциации генетических альтераций в исследованных генах.....	76
3.5 Ассоциации биомаркеров атерогенеза.....	82
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	95
ВЫВОДЫ	111
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	114

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

AQP9	аквапорин-9
eNOS	эндотелиальная синтаза оксида азота
MTHFR	метилентетрагидрофолатредуктаза
NO	оксид азота
PAI-1	ингибитор активатора плазминогена-1
PON-1	параоксоназа-1
SELP	растворимый P-селектин
SERPINA1	альфа-1-антитрипсин
SNP	однонуклеотидный полиморфизм
t-PA	тканевой активатор плазминогена
АГ	артериальная гипертензия
АДМА	асимметричный диметиларгинин
АСБ	атеросклеротическая бляшка
БЦА	брахиоцефальные артерии
ВСА	внутренняя сонная артерия
ГМК	гладкомышечные клетки
ДС МАГ	дуплексное сканирование магистральных артерий головы
ИБС	ишемическая болезнь сердца
ИМТ	индекс массы тела
ИФА	иммуно-ферментный анализ
КИМ	комплекс интима-медиа
КЭЭ	каротидная эндартерэктомия
ЛПВП	липопротеиды высокой плотности
ЛПНП	липопротеиды низкой плотности
МАГ	магистральные артерии головы
MoCA	Монреальская шкала когнитивной оценки
MPT	магнитно-резонансная томография
МС	метаболический синдром

НМК	нарушение мозгового кровообращения
ПЦР	полимеразная цепная реакция
СД	сахарный диабет
ТИА	транзиторная ишемическая атака
ХС	холестерин
ЦВЗ	цереброваскулярные заболевания
ЭХО-КГ	эхокардиография

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Атеросклероз – мультифакториальный и распространенный процесс, лежащий в основе развития сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний. Атеросклеротическое поражение сосудов головного мозга – это длительный процесс, проходящий в своем развитии, в том числе, и «асимптомную» стадию. Учитывая доминирующее место атеросклеротического поражения сонных артерий в генезе острых цереброваскулярных нарушений, наибольший интерес представляет когорта изначально «асимптомных» пациентов с каротидным атеросклерозом – как модели атеросклероза брахиоцефальных артерий (БЦА) в целом. Необходимо уточнить, что под «асимптомным» понимается стеноз сонной артерии, в бассейне кровоснабжения которой отсутствовали преходящие или стойкие очаговые неврологические симптомы (Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study, 1995). В мировой литературе существуют и другие определения понятия «асимптомности» стеноза, отражающие, в основном, хронологический фактор. Так, в исследовании ACAS «асимптомной» считалась патология сонной артерии, в бассейне кровоснабжения которой в течение последних 6 месяцев не возникали преходящие или стойкие очаговые симптомы (Richardson J. et al., 1989), а в исследовании CASANOVA признаком «асимптомности» считалось отсутствие какой-либо очаговой неврологической симптоматики в зоне кровоснабжения обеих сонных артерий (The CASANOVA Study Group, 1990).

К традиционным факторам риска возникновения атеросклероза относятся возраст, артериальная гипертония, курение, сахарный диабет, повышение уровня общего холестерина, снижение холестерина липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) (Grundy et al., 2004). Несмотря на это, в 20% случаев сосудистых катастроф не выявляются вышеуказанные факторы, а в половине случаев – отсутствуют изменения со стороны липидного профиля. В

этой связи медицинским сообществом признается целесообразным поиск новых биомаркеров атеросклеротического процесса, причем наибольший интерес представляют потенциально модифицируемые факторы.

Согласно отчету Рабочей группы по биомаркерам (*Biomarkers Definitions Working Group*), «биологический маркер (биомаркер) – это объективно измеряемый показатель, являющийся индикатором нормального биологического процесса, патологической реакции или фармакологического ответа на терапевтическое воздействие» (*Biomarkers and surrogate endpoints*, 2001). Это широкое понятие охватывает огромный спектр разнообразных, многокомпонентных характеристик, важной составляющей которых является определение биохимических показателей. Так, установлена предикторная роль ряда последних в генезе атеросклероза – липопротеид-ассоциированная фосфолипаза A_2 (Lp-PLA₂) (Garg P. et al., 2015) и асимметричный диметиларгинин (АДМА) (Furuki K., Adachi H., 2008) являются маркерами прогрессирования этого патологического процесса. При этом была выявлена корреляция между уровнем АДМА и наличием немых инфарктов в головном мозге, что позволяет предполагать участие АДМА в развитии когнитивных нарушений на фоне цереброваскулярной патологии (Pikula A. et al., 2009).

Возможными предвестниками цереброваскулярной патологии являются гормоны жировой ткани, в частности, адипонектин. В физиологических концентрациях эта молекула подавляет вызванную фактором некроза опухоли альфа (ФНО-α) экспрессию эндотелием молекул адгезии, а также предотвращает превращение макрофагов в пенистые клетки (Matsuda M. et al., 2002). При этом гипoadипонектинемия ассоциирована с увеличением толщины комплекса интима-медиа (КИМ) в сонных артериях (Gardener H. et al., 2012).

В настоящее время недооценена роль генетических факторов в развитии атеросклероза брахиоцефальных артерий (БЦА). Ряд однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) в генах параоксисаназы-1 (*PON-1*), ингибитора активатора плазминогена – 1 (*PAI-1*), метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) и некоторых других, также с большей вероятностью сопровождаются

развитием ишемического инсульта на фоне атеросклероза, что позволяет отнести их к биомаркерам данной патологии.

Согласно имеющейся литературе, нет четкого описания клинических проявлений у пациентов с «асимптомными» стенозами БЦА. Зачастую в клинической картине могут иметь место различные неврологические жалобы (цефалгический, астенический синдромы, т.п.) (Джибладзе Д.Н., 2005). Влиянию сужения сонных артерий на церебральную гемодинамику посвятили свое исследование Spencer и Reid (1979), выяснив, что при стенозах легкой и умеренной степени выраженности перфузия головного мозга сохраняется стабильной, отклонения от нормы появляются при сужениях более высокой степени. В 20% случаев при исследовании КТ-перфузии у пациентов с «асимптомными» стенозами выявляются зоны гипоперфузии в ипсилатеральном полушарии без клинических признаков ишемии (Танамян М.М., 2009). В ряде предшествующих работ (Mathiesen E. et al., 2004; Turk A. et al., 2008) было показано, что у пациентов с асимптомными стенозами наблюдались легкие когнитивные нарушения, что можно рассматривать в качестве проявления как общего процесса старения, так и хронической гипоперфузии головного мозга.

Целью исследования является оценка клинических, биохимических и молекулярно-генетических биомаркеров атеросклеротического процесса у пациентов с «асимптомными» стенозами сонных артерий.

Задачи исследования

1. Изучить клиническую картину (в частности, когнитивные изменения) у больных с «асимптомными» стенозами сонных артерий;
2. Провести анализ содержания биохимических и гемостазиологических маркеров атеросклеротического процесса в крови больных;
3. Выявить распространенность однонуклеотидных полиморфизмов в генах-кандидатах атеросклеротического процесса;

4. Оценить корреляцию между клиническими проявлениями у пациентов с «асимптомным» каротидным стенозом и выявленными изменениями со стороны биохимических и генетических маркеров.

Научная новизна

Впервые на основе комплексного исследования молекулярно-генетических маркеров атеросклероза проанализирована их взаимосвязь со степенью прогрессирования атеросклеротического процесса в системе внутренней сонной артерии. Уточнена предикторная роль ряда проатерогенных (ингибитор активатора плазминогена–1 [РАI-1], NO_3^- , NO_2^- , асимметричный диметиларгинин [АДМА]) и антиатерогенных (адипонектин, оксид азота [NO], тканевой активатор плазминогена [t-PA]) биомаркеров, а также определены основные этиопатогенетические корреляции между ними.

Впервые у лиц с «асимптомным» течением атеросклероза проведена оценка полиморфизма генетических альтераций в генах-кандидатах атеросклеротического процесса. Определены основные проатерогенные (ген MTHFR) и антиатерогенные (ген SELP) мутации, а также их ассоциации (гены PAI-1 и MTHFR), активно влияющие на течение атеросклеротического процесса.

У пациентов с «асимптомным» течением каротидного атеросклероза определен атеросклероз-зависимый биомаркерный статус (биохимические, гемостазиологические и генетические факторы). Определены референтные значения для каждого из изученных биомаркеров. Предложена шкала оценки биомаркеров атерогенеза для прогнозирования риска прогрессирования сосудистого поражения.

Практическая значимость

Выявлен комплекс биохимических, гемостазиологических и молекулярно-генетических маркеров, ассоциированный с наибольшей

степенью прогрессирования атеросклеротического процесса в системе внутренних сонных артерий.

Для ранней диагностики каротидного атеросклероза и с целью прогноза риска развития ассоциированных состояний предложена панель наиболее актуальных атеросклероз-чувствительных биомаркеров (включающих как проатерогенные, так и антиатерогенные).

В рамках превентивных мероприятий по сохранению перфузии головного мозга при атеросклерозе БЦА обоснована необходимость клинической оценки когнитивной функции даже у «асимптомных» пациентов. Полученные результаты могут лечь в основу скрининговых исследований в различных популяциях.

Основные положения, выносимые на защиту

1. «Асимптомное» течение атеросклероза в системе внутренних сонных артерий даже в отсутствие очаговых изменений вещества головного мозга может сопровождаться той или иной неврологической симптоматикой (в частности, когнитивными изменениями).

2. Атеросклеротическому поражению брахиоцефальных артерий в большинстве случаев сопутствуют изменения системы гемостаза, дисфункция эндотелия, патология жирового обмена.

3. Совокупность проатерогенных изменений, выраженная протромбогенным сдвигом следующих биомаркеров – оксида азота и его метаболитов, асимметричного диметиларгинина, тканевого активатора плазминогена, ингибитора активатора плазминогена-1, адипонектина – отражает нарушения всех звеньев атерогенеза и может являться диагностически значимой для выявления пациентов в группе высокого риска по развитию и прогрессированию атеросклероза.

4. Однонуклеотидные полиморфизмы ряда генов (MTHFR, PAI) ассоциированы с атеросклеротическим поражением внутренних сонных артерий.

Апробация работы

Диссертационная работа апробирована и рекомендована к защите на совместном собрании научных сотрудников 1, 2, 3, 5, 6 неврологических отделений, отделения реанимации и интенсивной терапии, научно-консультативного отделения, отделения лучевой диагностики, лаборатории ультразвуковых исследований, лабораторий нейрохимии, гемореологии и нейроиммунологии, молекулярно-генетических исследований, патологической анатомии, эпидемиологии и профилактики заболеваний нервной системы, отделения нейрохирургии с группой сосудистой и эндоваскулярной хирургии ФГБНУ «Научный центр неврологии» 1 июля 2015 года. Материалы диссертации были представлены и обсуждены на XXII Европейском конгрессе по инсульту (European Stroke Conference) (Лондон, Великобритания, 2013 г), XXIII Европейском конгрессе по инсульту (Ницца, Франция, 2014), XXIV Европейском конгрессе по инсульту (Вена, Австрия, 2015), на III Российском Международном конгрессе «Цереброваскулярная патология и инсульт» (г. Казань, 2014 г).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Атеросклероз как основная причина цереброваскулярных заболеваний

Ишемические цереброваскулярные заболевания – одна из основных причин инвалидизации и смертности в современном мире. Сердечно-сосудистая патология, лежащая в их основе, сложна и многогранна, однако результатом патологических процессов в сосудах головного мозга в подавляющем большинстве случаев становятся необратимые изменения. Одним из ведущих этиологических факторов острых и хронических нарушений мозгового кровообращения (НМК) является атеросклероз.

Атеросклероз представляет собой прогрессирующий воспалительный процесс, поражающий преимущественно сосуды крупного калибра, характеризующийся накоплением в их стенке липидов и белков внеклеточного матрикса (Lusis A., 2000).

Многокомпонентность атеросклероза как общесоматической и, по большому счету, системной патологии определила развитие в разные периоды иногда принципиально различающихся концепций патогенеза этого состояния. Так, среди всего многообразия этиологических парадигм можно выделить такие теории атерогенеза, как: аутоиммунная (А. Н. Климов, 1975), вирусная, моноклональная (Benditt E., Benditt J., 1973), гормональная, мембранная, инфекционная (в том числе, хламидиозная).

Экспериментальные работы Н.Н. Аничкова и С.С. Халатова (1913) продемонстрировали ведущую роль нарушений обмена холестерина и липидов в атерогенезе. Эта гипотеза, получившая название липидно-инфильтрационной (а впоследствии – инфилтративно-комбинаторной) теории, признавала пусковым механизмом в формировании атеросклеротической бляшки инфильтрацию субэндотелия и интимы липидами и липид-содержащими протеиновыми комплексами. Это

представление способствовало изучению атеросклероза и, в особенности, всех видов липидного обмена как в условиях нормального организма, так и на различных стадиях заболевания, особенно в период его манифестирующих проявлений. Однако указанная этиологическая концепция не может объяснить всего многообразия клинической картины атеросклеротического поражения сосудистого русла, и в 70-х гг прошлого столетия особое внимание обращается исследователями данной патологии на изучение гладкомышечных клеток (ГМК), располагающихся в артериальной стенке. Так, «мембранная» теория атеросклероза, предложенная R. Jackson и A. Gotto (1976), в качестве основного фактора, стимулирующего пролиферацию ГМК, называет изменение их мембранного и внутриклеточного метаболизма под влиянием холестерина. С других позиций роль размножения ГМК рассматривается R. Ross (1973), который считает, что пролиферация их является ответной реакцией на повреждение эндотелия артерий. В ряде экспериментов R. Ross и сотрудники показали, что в местах нарушения целостности эндотелия, вызванного механическим или любым другим путем, происходит оседание тромбоцитов, из которых при их гибели выделяется фактор роста (platelet derived growth factor). Под влиянием этого фактора, согласно этой теории, осуществляется пролиферация ГМК меди и проникновение их в интиму, что de facto определяет начало формирования атеросклеротической бляшки (Чазов Е.И., 1982).

Несмотря на неспецифичность факторов риска атеросклероза, в числе которых гиперхолестеринемия, гипергликемия, ожирение и курение, атеросклеротические бляшки формируются преимущественно в области изгибов сосудов, бифуркаций и мест ветвления – то есть в тех зонах, где ток крови наиболее турбулентен (Nahn S. et al., 2009). Изменения напряжения сдвига в местах турбулентного тока крови улавливаются механосенсорами на поверхности эндотелиоцитов, запуская сигнальные пути, модифицирующие экспрессию генов и белков, что в итоге ведет к

проатерогенным эффектам. Одними из основных медиаторов так называемой «механотрансдукции» выступают реактивные формы кислорода и азота (в частности, оксид азота [NO]), а соответствующие эффекты зависят в большой степени от баланса между ними (Hsieh H. et al., 2014). Активация эндотелиальных интегринов, секреция и накопление фибронектина, а также экспрессия различных медиаторов воспаления приводит к повышению проницаемости эндотелия (Feaver R. et al., 2010). Начинается процесс отложения липопротеиновых частиц (в частности, липопротеинов низкой плотности [ЛПНП]) в субэндотелиальном матриксе, где после взаимодействия с гликозаминогликанами и протеинами происходит их модификация (в основном - окисление). Измененные таким образом ЛПНП выступают теперь в роли антигенов, запуская многокомпонентный воспалительный процесс, одной из составляющих которого является экспрессия эндотелиальными клетками поверхностных молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1, E- и P-селектинов) и секреция ими MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), что ведет к адгезии моноцитов к люменальной поверхности эндотелия (Simionescu M., 2009). На следующем этапе происходит миграция моноцитов через монослой эндотелиальных клеток во внутреннюю оболочку, где эти клетки размножаются и дифференцируются в макрофаги, которые поглощают частицы ЛПНП, образуя так называемые пенные клетки (Woolard K. et al., 2010). Вырабатываемые макрофагами хемокины и другие факторы (липопротеид-липазы, матриксные металлопротеиназы, катепсины) вызывают миграцию гладкомышечных клеток (ГМК) в область повреждения, что является основой для формирования фиброзной «покрышки», под которой располагается содержащее липиды ядро бляшки (Koenen R. et al., 2011).

Важнейшей и клинически значимой локализацией атеросклеротических бляшек является область бифуркации общих сонных (каротидных) артерий.

Распространенность каротидного атеросклероза составляет 25,4% у мужчин и 26,4% у женщин (в возрасте от 18 до 99 лет) (Prati P. et al., 1992).

Процесс формирования атеротромботического поражения сосуда сложен, многокомпонентен и зачастую очень длителен. Атеротромбоз в артериях головного мозга, также как и в других сосудистых бассейнах, начинается с дестабилизации атеросклеротической бляшки, которая за счет пристеночного тромбообразования может увеличиваться в объеме, приводя к полной закупорке просвета артерии. Кроме того, свежие тромботические массы при условии сохранности фибринолитического потенциала сосудистой стенки и крови способны подвергаться фрагментации. В последнем случае формируется тромбоембол, устремляющийся с током крови в более мелкие дистальные артерии.

Развитие ишемических нарушений мозгового кровообращения (НМК) у больных со стенозирующим поражением артерий, кровоснабжающих головной мозг, может реализовываться по всем известным механизмам. Так, в общей структуре всех верифицированных подтипов ишемического инсульта атеротромботический подтип инсульта (по механизму артерио-артериальной эмболии из нестабильной АСБ) встречается в 34% случаев, а гемодинамический инсульт (в результате снижения перфузионного давления на фоне стеноокклюзирующего процесса) – в 15% случаев НМК (Суслина З.А., 2007). В то же время процесс атеросклеротического поражения артерий является доминирующим сосудистым процессом при всех гетерогенных подтипах НМК. Достаточно частой причиной лакунарных малых глубинных инфарктов в последнее время признается изолированное атеросклеротическое поражение интракраниальных артерий. Ишемическая болезнь сердца (ИБС), чаще всего атеросклеротического происхождения, нередко приводит к нарушениям ритма сердца, а нарушения холестеринового обмена могут спровоцировать атеросклеротические разрастания на клапанном аппарате. Оба эти фактора являются первопричиной кардиоэмболического по механизму, но

атеротромботического по происхождению, ишемического инсульта. Нередко гемореологические и гемостатические изменения, сопутствующие течению любого из патогенетических подтипов инсульта, могут спровоцировать и усугубить атеротромботический процесс в сосудах мозга. В свою очередь, атеротромбоз способствует прогрессированию вышеуказанных универсальных по направленности изменений в системе гемореологии, системе гемостаза и атромбогенной активности сосудистой стенки, приводя к ухудшению кровоснабжения и нарастанию ишемии мозга. Таким образом, атеротромботическая составляющая играет весомую роль в пуске и реализации различных ишемических НМК.

1.2 «Симптомные» и «асимптомные» стенозы брахиоцефальных артерий

Течение атеросклероза брахиоцефальных артерий (БЦА) – это длительный процесс, который может идти десятилетиями, в том числе, проходя доклиническую, асимптомную стадию. Исходя из факта наличия или отсутствия в анамнезе данных за ишемический инсульт в заинтересованной зоне кровоснабжения, стенозы ВСА подразделяют на «симптомные» и «асимптомные».

Истинное асимптомное поражение встречается намного чаще статистических цифр, однако практическую значимость имеют асимптомные стенозы со степенью сужения просвета сонной артерии $\geq 50\%$ при отсутствии в анамнезе в течение предшествующих 6 месяцев эпизодов ишемии сетчатки (amaurosis fugax) и/или головного мозга.

Асимптомный стеноз ВСА выявляется обычно при проведении ультразвукового исследования – дуплексного сканирования магистральных артерий головы (ДС МАГ). В общей популяции распространенность асимптомных стенозов ВСА составляет: от 0% до 7,5% для стенозов умеренной степени (т.е., 50-70%) и 0 - 3,1% - для выраженных стенозов

($\geq 70\%$) (de Weerd M. et al., 2010; den Hartog A. et al., 2013). Встречаемость стенозов ВСА высоких градаций у пациентов без соответствующей неврологической симптоматики сравнительно невелика: так, по данным Moneta et al. (1987), из 6000 проведенных ДС МАГ сужение просвета ВСА на 80-99% выявлялось у 2% пациентов. Несмотря на это, высокая научно-практическая значимость проблемы стала залогом того, что немало работ за прошедшие 25 лет были посвящены проспективному наблюдению за пациентами с клинически асимптомными каротидными стенозами и окклюзиями. M. Hennerici et al. (1987) в течение 7 лет наблюдали за группой из 339 пациентов с клинически бессимптомным течением каротидного атеросклероза. За истекший период общая смертность в этой когорте больных составила 7% в год, однако показатель летальности от инсульта – лишь 0,6%. Интересно отметить, что причиной основного числа фатальных исходов стал инфаркт миокарда. Другое исследование (L.Y. Lo et al., 1992) было посвящено проспективному наблюдению (медиана – 30 месяцев) за 88 пациентами с атеросклерозом в системе ВСА (стеноз более 50%). Результатом данной работы стало выявление различий в прогрессировании патологии БЦА в зависимости от исходной выраженности. Так, у 2/3 пациентов с сужением просвета ВСА на более чем 75% выявлялось прогрессирование степени стеноза, в то время как у больных с менее выраженной патологией (стеноз 50-75%) этот показатель был в два раза ниже.

Исследование, проведенное Autrest et al. (1987), продемонстрировало различия в частоте НМК в зависимости от степени стеноза: так, из 242 пациентов за время наблюдения (медиана – 29,4 месяца) годовой риск ТИА/инсульта составил 0,23% при степени сужения менее 50%, 2,48% - у пациентов со стенозом ВСА 50-75% и 1,71% при стенозе 75-99%.

Marquardt et al. было проведено исследование риска ОНМК у пациентов с асимптомным стенозом ВСА и наличием в анамнезе ОНМК или ТИА в другом сосудистом бассейне. В среднем частота развития любого

ипсилатерального ОНМК составила 0,34% (95% ДИ, 0,01-1,87), инвалидизирующего ипсилатерального ОНМК – 0% (95%, 0,00-0,99) и иписилатеральной ТИА – 1,78% (95% ДИ, 0,58-4,16%).

Таким образом, на первый план выходит поиск и валидация в различных когортах факторов риска прогрессирования («озлокачествления») атеросклероза, т.е. предикторов дестабилизации атеросклеротической бляшки. В этой связи обратимся к результатам проспективного исследования ACSRS (Asymptomatic Carotid Stenosis and Risk of Stroke), результаты которого были опубликованы в 2010 году (Nicolaidis A. et al., 2010). Целью исследования было оценить потенциал стратификации риска острой цереброваскулярной патологии комбинации клинических, биохимических и ультразвуковых параметров, и сравнить ожидаемые риски с реально наблюдаемыми в группе пациентов. За период с 1998 по 2002 год был включен 1121 пациент в возрасте от 39 до 89 лет (средний возраст 70,0 лет; 61% мужчины) с асимптомными стенозами ВСА от 50% до 99%, причем период наблюдения составил от 6 до 96 месяцев (средний период – 48 месяцев). Первичными конечными точками были эпизоды церебральной ишемии и/или ишемии сетчатки в бассейне пораженной артерии. За время наблюдения зарегистрировано 130 таких эпизодов, из них 59 ОНМК (12 – с летальным исходом), 49 ТИА и 22 эпизода *amaurosis fugax* (*преходящей слепоты*). На основании ультразвуковых характеристик атеросклеротической бляшки (степени стеноза, наличие/отсутствие отдельных белых зон [discrete white areas – DWAs], площадь бляшки, оценка по шкале серого цвета [GSM]), клинических данных (курение, наличие/отсутствие в анамнезе симптомов со стороны противоположной ВСА, повышение уровня креатинина в сыворотке) авторами были предложены ожидаемые риски для различных групп пациентов (сопоставление с полученными данными представлено ниже).

**Сопоставление ожидаемых рисков острых церебральных катастроф
с наблюдаемыми в популяции
(по материалам Nicolaidis A. et al, 2010)**

	Ожидаемый риск (5-ти летний)	Наблюдавшаяся частота [95% ДИ]	Число пациентов
<i>Очень низкий риск</i>	<5%	1% [0.2-2]	654
<i>Низкий риск</i>	5%-9,9%	8% [5-13]	225
<i>Умеренный риск</i>	10%-19,9%	12% [7-18%]	156
<i>Высокий риск</i>	≥20%	29% [14-33]	86

Также необходимо отметить высокую смертность вследствие инфаркта миокарда у пациентов с асимптомным стенозом ВСА (110 летальных исходов), что согласуется с данными предыдущих исследований (Chimowitz M. et al., 1994).

В отношении выявления групп риска по развитию цереброваскулярных событий представляет интерес еще одно проспективное обсервационное исследование – ACES (Asymptomatic carotid emboli study) (Markus H. et al., 2010). Целью исследования стала оценка риска развития нарушений мозгового кровообращения в зависимости от наличия или отсутствия эмболических сигналов по данным транскраниальной доплерографии. В исследование были включены 467 пациентов с асимптомными стенозами ВСА ≥70%, которым четыре раза (0, 6, 12 и 18 месяцев) проводилось транскраниальное доплерографическое исследование; период наблюдения составил 2 года. Абсолютный риск развития ипсилатерального ОНМК/ТИА составил 7,13% в год у пациентов с зарегистрированными эмболическими сигналами и 3,04% - у пациентов без них, а риск развития только ипсилатерального инсульта – 3,62% и 0,70% в год соответственно.

В патоморфологических исследованиях было показано, что в основе тромботических осложнений при атеросклеротическом поражении как

сонных, так и коронарных артерий чаще всего лежит один и тот же механизм – изъязвление или разрыв фиброзной покрышки атеросклеротической бляшки с «обнажением» богатого липидами тромбогенного «ядра» (Virmani R et al., 2006).

Риск разрыва покрышки, по-видимому, зависит от нескольких факторов. Так, в исследовании (Redgrave J. et al., 2008) было установлено, что с повышением риска разрыва ассоциирована толщина покрышки *менее* 200 мкм. Предикторной ролью в отношении разрыва фиброзной покрышки обладают также больший размер некротического «ядра», наличие кровоизлияния в бляшку, а также воспалительная клеточная инфильтрация покрышки. Новообразование сосудов в бляшке (т.н. неоваскуляризация) позволяет отличить «асимптомные» бляшки от «симптомных» (Mofidi R. et al., 2001; McCarthy M. et al, 1999).

С внедрением в клинику новых методов ангио- и нейровизуализации стало возможным не только более тщательное исследование атеросклеротической бляшки *in vivo* при помощи магнитно-резонансной томографии (МРТ), но и определение предикторной роли определенных свойств и характеристик бляшки в отношении развития тромботических осложнений. В наиболее крупном исследовании, посвященном МРТ сонных артерий, проведенном Такава et al., к таким факторам относились разрыв фиброзной покрышки, кровоизлияние в бляшку, большая площадь некротического «ядра» и уменьшение толщины покрышки.

Морфология атеросклеротической бляшки влияет на риск развития нарушений мозгового кровообращения и/или ишемии сетчатки в гораздо большей степени, чем степень стеноза ВСА. В одном из крупнейших исследований (Howard DPJ, van Lammeren GW et al., 2013) гистологической картины биоптатов удаленных при КАЭ атеросклеротических бляшек были выявлены значительные отличия в морфологии АСБ в зависимости от клинической картины, наблюдающейся у пациентов. Так, при наличии в анамнезе исключительно эпизодов ишемии сетчатки в АСБ преобладали

фиброз и кальциноз, тогда как у пациентов с преимущественными эпизодами церебральной ишемии в анамнезе гистологическая картина была более разнообразной и соответствовала так называемой «уязвимой» (vulnerable), или «нестабильной», АСБ: очаги атероматоза, признаки активного воспаления, наличие тромба, истончение фиброзной покрышки, кровоизлияния в бляшку, инфильтрация макрофагами (Howard D. et al., 2013).

В Научном центре неврологии было проведено сопоставление результатов ультразвукового исследования ВСА с морфологической картиной биоптатов АСБ, полученных в ходе КЭА. Установлено, что в «симптомных» атеросклеротических бляшках по сравнению с «асимптомными» примерно в 2 раза чаще обнаруживаются изъязвление покрышки бляшки (24% и 13% соответственно), истончение её в области очагов атероматоза (15% и 8%), инфильтрация покрышки липофагами (23% и 13%), а также тромбы на люменальной поверхности бляшки (16% и 8%) (Танашян М.М., 2013б). Показано также, что среди пациентов, страдающих сахарным диабетом 2-го типа, а также МС, чаще наблюдается развитие критических степеней атеростеноза и более активное течение атеросклеротического процесса в сонных артериях (Карчевская В.А., 2010).

При МР-исследовании области бифуркации общей сонной артерии (в режимах TOF, T1, T2, PDw) у пациентов с «асимптомными» стенозами ВСА (50-79%), проводимом каждые 18 месяцев (в общей сложности, в течение 54 месяцев), была выделена группа больных, у которых в течение этого периода было выявлено кровоизлияние в бляшку, и рассчитана скорость прогрессирования атеросклеротического процесса (как увеличение объема стенки ВСА по МРТ) до и после кровоизлияния (Sun J, et al. 2012). Оказалось, что до развития кровоизлияния она составила $-20,5 \pm 13,1$ мм³/год ($p=0,129$), а после – $18,3 \pm 6,5$ мм³/год ($p=0,008$); у пациентов, у которых не развилось кровоизлияние в бляшку, этот параметр составил $5,3 \pm 7,2$ мм³/год ($p=0,466$).

Таким образом, наличие кровоизлияния в бляшку по данным МР-исследования можно считать субоптимальным предиктором нарастания степени прогрессирования атеросклеротического процесса в каротидном бассейне. На основании патофизиологии кровоизлияния в бляшку некоторыми авторами предлагается использование в качестве ко-маркера содержание холестерина в мембране эритроцитов (cholesterol contents of erythrocyte membranes – CEM) (Koskinas K. et al., 2012), поскольку в ряде предшествующих работ показано, что этот показатель выступает в роли предиктора нестабильности атеросклеротической бляшки в коронарных артериях (Giannoglou G. et al., 2010; Tziakas D. et al., 2007).

Говоря о более широком внедрении модели стратификации риска нарушений мозгового кровообращения, необходимо отметить, что в рутинной практике использование вышеуказанных сравнительно дорогостоящих методик не всегда оправдано, поэтому для уточнения группы пациентов «высокого риска» в последнее десятилетие интенсивно ведется поиск биохимических и молекулярно-генетических биомаркеров, определяющих предрасположенность к дестабилизации атеросклеротической бляшки. Особое место в этих исследованиях занимают маркеры эндотелиальной дисфункции, характеризующие активность течения атеросклеротического процесса.

1.3 Дисфункция эндотелия и прогрессирование атеросклероза

Эндотелий – однослойный пласт плоских клеток мезенхимного происхождения, выстилающий внутреннюю поверхность кровеносных и лимфатических сосудов, сердечных полостей. Он играет ведущую роль в поддержании адекватного тока крови по сосудистому руслу. К настоящему времени накоплены многочисленные экспериментальные данные, которые позволяют говорить об одной из ведущих ролей эндотелия в поддержании гомеостаза путем сохранения динамического равновесия ряда

разнонаправленных процессов (Федин А.И. с соавт., 2015). К последним относятся регуляция тонуса сосудов (вазоконстрикция/вазодилатация путем высвобождения соответствующих факторов, модулирование активности ГМК), локального воспаления (выработка про- и противовоспалительных биомолекул, регуляция процессов адгезии клеточных элементов), обеспечение адекватных гемостаза и фибринолитической активности (путем выработки различных факторов агрегации, про- и антикоагулянтов), а также влияние на ремоделирование сосудов и ангиогенез (Esper R. et al., 2006). Стоит отметить, что эндотелий-зависимая вазодилатация обычно развивается в ответ на напряжение сдвига путем выработки оксида азота (NO), синтезируемого из аминокислоты L-аргинина (Janssens S. et al., 1992). Эндотелиальная дисфункция характеризуется формированием тенденции к снижению способности к вазодилатации в результате снижения биодоступности NO, провоспалительному состоянию, повышению протромботической активности (Widmer R. et al., 2014). Наиболее часто она развивается при сердечно-сосудистых заболеваниях, таких как: артериальная гипертония, ишемическая болезнь сердца, хроническая сердечная недостаточность, патология периферических сосудов, хроническая почечная недостаточность (Landmesser U. et al., 2004; Соболева Г.Н. с соавт., 2001). Тесно связана эндотелиальная дисфункция и с цереброваскулярной патологией: ее признаки выявляются у больных как с острыми, так и с хроническими проявлениями ишемических заболеваний головного мозга (Домашенко М.А. с соавт., 2006). Считается, что именно дисфункция эндотелия лежит в основе инициации и прогрессирования атеросклероза. (Yang Z. et al., 2006). Интересной представляется и ассоциация эндотелиальной дисфункции с состояниями, характеризующимися развитием инсулино-резистентности: ожирением, метаболическим синдромом, сахарным диабетом 2-го типа (Muris D. et al., 2012).

Одним из наиболее обсуждаемых и принятых на сегодняшний день механизмов развития эндотелиальной дисфункции является оксидативный стресс (Chhabra N. et al., 2009). Главную роль в этом процессе играют реактивные формы кислорода, образование которых усилено при большинстве сердечно-сосудистых заболеваний (Förstermann U. et al., 2006). В числе отрицательных эффектов оксидативного стресса следует отметить следующие: усиление пролиферации ГМК (приводящее к утолщению стенок артерий), апоптоз клеток эндотелия, а также повышение экспрессии и активацию матриксных металлопротеиназ, участвующих в формировании атеросклеротической бляшки (Puranik R. et al., 2003).

Еще одним важным патогенетическими аспектом развития и нарастания степени эндотелиальной дисфункции считается воспаление (Libby P. et al., 2002). Большое значение придается также взаимовлиянию оксидативного стресса и процессов хронического сосудистого воспаления, которые вместе образуют порочный круг, приводящий к формированию протромбогенного и проатерогенного состояния крови (Osto E. et al., 2010). Основной «точкой приложения» всех патогенетических механизмов эндотелиальной дисфункции является нарушения в системе NO (Strijdom H. et al., 2009).

1.3.1 Оксид азота и атерогенез

Свободные радикалы могут нарушать обмен оксида азота (NO), повреждать эндотелий, значительно увеличивая его проницаемость для различных токсинов и других агентов (Rubanyi G. et al., 1986). В большинстве случаев в организме человека присутствует достаточная концентрация антиоксидантных молекул, которые позволяют нейтрализовать свободные радикалы, однако при недостатке их развивается повреждение эндотелия, сопровождающееся дисбалансом в системе оксида азота. При ингибировании действия NO функция эндотелия нарушается, что

в условиях значительной площади слоя эндотелиоцитов (по некоторым данным, эндотелий выстилает порядка 60 000 километров сосудов) ведет к системному заболеванию (Evora P. et al., 2009). Оксид азота (NO), образующийся в эндотелии при участии фермента эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS), представляет собой мощный сосудорасширяющий агент, имеющий огромное значение в возникновении такого феномена, как поток-зависимая вазодилатация. Помимо этого, NO уменьшает агрегацию тромбоцитов, замедляет адгезию моноцитов и лейкоцитов к эндотелию, ингибирует пролиферацию гладкомышечных клеток, а также препятствует окислению холестерина липопротеидов низкой плотности (Loscalzo J. et al., 2001). Антитромботическое влияние NO может также быть связано с отрицательным воздействием на экспрессию ингибитора активатора плазминогена – 1 (PAI-1) – протромботического белка (Bouch J. et al., 1998). Известно также, что eNOS находится в тромбоцитах, что определяет возможность продуцирования ими оксида азота (Freedman J. et al., 1999; Tsaο P. et al., 1994). Показано, что под воздействием NO подавляется экспрессия и активность молекул адгезии и хемокинов, следствием чего является противовоспалительный эффект. Стоит отметить, что в экспериментах на мышах, у которых нефункционирующая форма eNOS, выявлено усиление взаимодействий между эндотелием и циркулирующими клетками крови (Lefer D. et al., 1999). На молекулярном уровне ингибирование eNOS приводило к усилению экспрессии молекул лейкоцитарной адгезии и цитокинов, в частности, белка-хемоаттрактанта моноцитов-1 (Zeiher A. et al., 1995; Tomita H. et al., 1998), ответственного за миграцию моноцитов в интиму в местах атеросклеротического поражения сосудов (Libby P. et al., 2002; Gu L. et al., 1998; Boring L. et al., 1998). При этом терапия, направленная на восстановление функции гена NO-синтазы, приводила у кроликов (диета с повышенным содержанием холестерина) к быстрому снижению степени экспрессии молекул лейкоцитарной адгезии (напр., VCAM-1), вызванной гиперхолестеринемией, а также уменьшала

степень моноцитарной инфильтрации стенки артерий (Qian H. et al., 1999). В эксперименте у мышей, у которых отсутствовал рецептор к липопротеинам низкой плотности (ЛПНП) (животная модель семейной гиперхолестеринемии), ингибирование эндотелиального синтеза NO приводило к ускорению формирования атеросклеротических изменений, а терапия L-аргинином, наоборот, вызывала замедление этой патологии (Aji W. et al., 1997). Более того, было показано, что у мышей, склонных к развитию атеросклероза (в частности, с «выключенным» геном аполипопротеина E), специфическое удаление eNOS приводило к выраженному прогрессированию атеросклеротического поражения аорты и коронарному атеросклерозу (Kuhlencordt P. et al., 2001). Данный эффект не может быть приписан умеренной артериальной гипертонии у таких животных (с нефункционирующими генами apoE/eNOS), поскольку в одном из последующих исследований было показано, что степень прогрессирования атеросклероза оставалась на прежнем уровне и после нормализации артериального давления (гидралазин) (Chen J. et al., 2001). Учитывая современные представления о возникновении и развитии атеросклероза, а также влияние NO на практически каждое из патогенетических звеньев этого процесса, некоторыми авторами оксид азота рассматривается как эндогенная «анти-атеросклеротическая» молекула, а снижение концентрации NO – как одна из основных причин эндотелиальной дисфункции (Landmesser U. et al., 2004).

1.3.2 Асимметричный диметиларгинин и атерогенез

В 1992 году Vallace et al. обнаружили, что в организме человека синтезируется эндогенный ингибитор синтазы оксида азота – асимметричный диметиларгинин (АДМА). Асимметричный диметиларгинин (АДМА) и NG-монометиларгинин (NMMA) представляют собой эндогенные аналоги L-аргинина, в которых метиловые группы

добавлены со стороны остатка гуанидина. Эти вещества *in vivo* ингибируют синтез оксида азота (NO), являясь по сути «конкурентами» левовращающего изомера аргинина в области активного центра фермента NO-синтазы. В дополнение к этому NMMA и ADMA могут разъединять синтазу NO, что приводит к образованию супероксида (Antoniades C. et al., 2009; Olken N. et al., 1993). ADMA образуется при протеолизе белков, содержащих метилированный аргинин (Fickling S. et al., 1993). Данная реакция катализируется семейством ферментов, носящим общее название «протеин-аргинин-метилтрансферазы» (ПАМТ) (Bedford M. et al., 2009). В клетках млекопитающих имеется две разновидности ПАМТ – типа I и II, причем первую реакцию образования NMMA катализируют оба фермента, в то время как во второй при участии ПАМТ 1 образуется АДМА, а ПАМТ-2 – симметричный диметиларгинин. АДМА в большой степени метаболизируется внутри клетки, при участии фермента диметиларгинин-диметиламино-гидролазы с образованием цитруллина и диметиламина, хотя некоторое количество АДМА выводится с почками (Palm F. et al., 2007).

Увеличение концентрации АДМА с последующим снижением образования NO предлагалось некоторыми исследователями в качестве одной из ведущих причин развития артериальной гипертензии, прогрессирования атеросклероза и иммунных нарушений, которые сопровождают почечную патологию (Zoccali et al., 2006). Исследования краткосрочного назначения таким пациентам L-аргинина с целью обратить конкурентное ингибирование ADMA синтазы NO привели к неоднозначным результатам. Необходимо упомянуть, что в статье Zoccali et al. (2013) уровень АДМА в качестве предиктора летального исхода и сердечно-сосудистых катастроф у пациентов с хронической почечной недостаточностью стоит на втором месте после возраста. При хронической патологии почек повышение концентрации АДМА можно объяснить снижением его экскреции, однако указанные изменения наблюдались и при

других патологиях. В данных случаях одной из причин повышения уровня АДМА может быть нарушение его метаболизма при помощи DDAH.

Отдельно стоит упомянуть об обратной стороне проблемы: было показано, в частности, что у пациентов с болезнью Альцгеймера отмечалось снижение концентрации АДМА в цереброспинальной жидкости на 50% по сравнению с группой контроля (Abe T. et al., 2001). Считается, что изменения уровня NO и усиление оксидативного стресса играют важную роль в процессах старения мозга и патогенезе болезни Альцгеймера (Dorheim MA et al., 1994). Учитывая вышесказанное, можно предположить, что снижение уровня АДМА (наблюдаемое при болезни Альцгеймера) может в какой-то степени явиться причиной увеличения содержания NO при данной патологии (Arlt S. et al., 2009).

Дальнейшими исследованиями было продемонстрировано сочетание высоких концентраций АДМА с другими факторами риска прогрессирования атеросклероза: гиперхолестеринемией, артериальной гипертонией, гипертриглицеридемией, сахарным диабетом, инсулинорезистентностью, гипергомоцистеинемией (Boger R. et al., 1998; Miyazaki H. et al., 1999; Abbasi F. et al., 2001). В рандомизированном, двойном слепом, плацебо-контролируемом исследовании проводилось сравнение показателей функции эндотелия (поток-зависимая дилатация плечевой артерии), АДМА и L-аргинина сыворотки крови у 49 пациентов с гиперхолестеринемией и группы обследуемых с нормальным уровнем холестерина. Было показано, что у пациентов с гиперхолестеринемией наблюдались признаки эндотелиальной дисфункции, повышение уровня АДМА и снижение соотношения L-аргинин/АДМА. Уровень АДМА находился в обратно пропорциональной зависимости от показателей поток-зависимой дилатации. Более того, внутривенное введение L-аргинина приводило не только к нормализации соотношения L-аргинин/АДМА, но и к улучшению параметров функции эндотелия (Boger R. et al., 1998).

В исследовании Miyazaki et al, методом пошагового регрессионного анализа была показана статистически значимая корреляция уровня АДМА и толщины КИМ, являющейся важным суррогатным маркером для определения риска развития сердечно-сосудистых событий. Схожие результаты получены в исследовании, где были проанализированы данные, полученные при измерении толщины КИМ у 712 добровольцев, наряду с определением концентрации АДМА (Furuki K. et al, 2007). Впоследствии было продемонстрировано, что увеличение толщины КИМ за 6-тилетний период наблюдения также взаимосвязано с уровнем АДМА в плазме крови (Furuki K. et al., 2008). В исследовании PREVENCIÓN, где анализировались данные 922 взрослых пациентов, уровень АДМА статистически значимо был связан с толщиной КИМ (Chirinos J. et al., 2008).

1.4 Роль адипонектина в атерогенезе

Несмотря на угасание интереса к липидному генезу атеросклероза, исследования по изучению вклада жировой ткани и продуцируемых ею веществ в атерогенез продолжают. Жировая ткань продуцирует и секретирует определенное количество биоактивных молекул (под общим названием адипоцитокины), которые могут вносить определенный вклад в развитие заболеваний, связанных с ожирением (Spiegelman B. Et al., 1993). Одним из таких факторов является адипонектин (Maeda K. et al., 1996), который ингибирует разнообразные механизмы, лежащие также и в основе атерогенеза: экспрессию молекул адгезии в эндотелиальных клетках (Ouchi N. et al., 2000; Ouchi N. et al., 1999), пролиферацию ГМК (Arita Y. et al., 2002), *in vitro* образование пенистых клеток (Ouchi N. et al., 2001). В физиологических концентрациях адипонектин препятствует адгезии моноцитов к эндотелию, превращению макрофагов в пенистые клетки и секреции последними фактора некроза опухоли (Okamoto Y. et al., 2000). Антиатерогенные (ангиопротективные) свойства адипонектина были

показаны на животных моделях (Okamoto Y. et al., 2002), а гипoadипонектинемия выявлялась у пациентов с ожирением, сахарным диабетом 2-го типа и ишемической болезнью сердца (Kumada M. et al., 2003; Hotta K. et al., 2000). Показано, что снижение веса повышает плазменную концентрацию адипонектина (Yang W. et al., 2001). Снижение последней до уровня менее 4 мкг/мл сопровождается двукратным повышением риска коронарной патологии, вне зависимости от установленных факторов риска.

Адиipoциты у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа становятся менее чувствительными к инсулину (Hunter S. et al., 1998) – возможно, именно этот факт определяет развитие гипoadипонектинемии при инсулинорезистентности. Снижение экспрессии адипонектина может также отражать синдром дисфункционального адипоцита (Bays H. et al., 2004). Указанные нарушения подразумевают наличие определенной ассоциации между дисфункциональными взаимоотношениями адипоцитокинов, возникающими при ожирении, и развитием атеросклероза. В исследовании SAPHIR, в частности, была показана статистически значимая корреляционная обратная взаимосвязь между уровнем адипонектина и толщиной комплекса интима-медиа внутренних сонных артерий (Iglseider B. Et al., 2005).

Показано, что недостаток адипонектина (гипoadипонектинемия) сопровождается активацией взаимодействия лейкоцитов с эндотелием, ассоциированного с повышением экспрессии межклеточных молекул адгезии (Ouedraogo R. et al., 2007). Адипонектин препятствует образованию супероксида и реактивных форм кислорода; при этом в присутствии адипонектина активируется эндотелиальная синтаза оксида азота в эндотелиоцитах (Motoshima H. et al., 2004). В исследовании (Yoon J-H. et al., 2013) было продемонстрировано, что гипoadипонектинемия является независимым фактором риска развития атеросклероза в системе сонных артерий. Следует отметить, что указанные корреляционные взаимосвязи

сохранялись и при стратификации по полу и возрасту, а также общепринятым факторами риска (курение, окружность талии, холестерин ЛПНП, ЛПВП, артериальное давление, индекс инсулинорезистентности).

Определенная взаимозависимость была отмечена между различными адипокинами (в их числе и адипонектина) у пациентов с атеросклерозом сонных артерий на фоне длительного (от 4-х до 15 лет) течения ревматоидного артрита (Kang et al., 2013). В частности, была подчеркнута роль адипонектина в качестве противовоспалительного фактора, а также его возможная инсулино-подобная активность.

К формированию нестабильной атеросклеротической бляшки предрасполагает, по данным исследования (Takeuchi S. et al., 2013), низкая экспрессия рецепторов к адипонектину 1-го типа (ADR-1), что вкупе с изначально имеющейся у пациентов высокого риска гипoadипонектинемией может приводить к «озлокачествлению» атеросклероза с развитием цереброваскулярных катастроф. Неоднократно было показано, что в физиологических концентрациях адипонектин подавляет индуцированную ФНО-альфа экспрессию эндотелиальных молекул адгезии, трансформацию макрофагов в пенистые клетки, а также экспрессию ФНО-альфа в последних (Matsuda M. et al., 2002; Ouchi N. et al., 2000; Ouchi N. et al., 2001).

Указанные данные позволяют с достаточно большой долей убедительности рассматривать адипонектин в качестве одного из противовоспалительных факторов, играющих ключевую роль в развитии и прогрессировании атеросклероза в системе внутренних сонных артерий. Учитывая высокую распространенность избыточного веса у пациентов с острыми и хроническими нарушениями мозгового кровообращения, а также наличие компонентов метаболического синдрома (из которых наиболее важной представляется в данном случае инсулинорезистентность), нарушения обмена жировой ткани и секретируемых ею гормоноподобных

субстратов выступают на первый план в дестабилизации атеросклеротической бляшки.

1.5 Тканевой активатор плазминогена (t-РА) и ингибитор активатора плазминогена–1 (РАI-1) и атерогенез

Лизис фибрина в кровяном сгустке (тромбе) и околоцеллюлярный протеолиз являются результатом активации тканевого и урокиназного плазминогена - t-РА и u-РА соответственно. В системе регуляции фибринолиза активность плазмина может напрямую ингибироваться альфа2-антиплазмином или ингибитором фибринолиза, активируемым тромбином (ТАFI); в свою очередь ингибиторы активатора плазминогена могут препятствовать превращению плазминогена в плазмин (Rijken D. et al., 2009). РАI-1 – это наиболее важный физиологический ингибитор t-РА и u-РА, а также одна из важнейших регуляторных молекул фибринолитической системы крови (Yasar Yildiz S. et al., 2014).

РАI-1 синтезируется в разных тканях и типах клеток: печень, селезенка, адипоциты, гепатоциты, тромбоциты, мегакариоциты, макрофаги, ГМК, эндотелиальные клетки (Tsantes A. et al., 2008). РАI-1 образует ковалентную связь с t-РА и останавливает деградацию активированного фибрина, предотвращая образование плазмина из плазминогена (Vaughan D., 2005; Agirbasli M., 2005). РАI-1 играет важную роль в развитии атеросклероза и острых тромботических явлений (как, например, тромбозы глубоких вен голени и инфаркт миокарда) (Agirbasli et al., 2011). Тканевой активатор плазминогена и РАI-1 напрямую влияют на процессы формирования и деградации тромба и, следовательно, во многом определяют риск развития артериального тромбоза. РАI-1 – это провоспалительная, прокоагулянтная и профибротическая молекула. Часто РАI-1 экспрессируется в пораженных тканях (включая миокард и головной мозг), а соотношение РАI/t-РА является индикатором состояния системы

фибринолиза у пациента и, таким образом, риска тромбоза и ишемических НМК. При этом необходимо отметить, что важнейшее значение имеет именно дисбаланс в указанных системах, поскольку имеются свидетельства эндотелиальной активации при церебральных ангиопатиях, ассоциированных с низкими уровнями PAI-1, а также сочетания высокой активности t-PA с поражением белого вещества головного мозга (Knottnerus I. et al, 2010).

Серьезную роль играют описываемые молекулы и в атерогенезе. Одним из главных событий, лежащих в основе атеросклероза, является ингибирование фибринолиза в связи с увеличением концентрации и активности PAI-1, являющегося, по своей сути, индикатором неэффективного фибринолиза (Libby P. et al., 2009). Указанные нарушения ведут к образованию тромба (Pandolfi A. et al., 2001) и дестабилизации атеросклеротической бляшки. Показано также сочетание гипергликемии и повышения концентрации PAI-1 в плазме крови при многих состояниях, включая метаболический синдром (Alessi M. et al., 2006), сахарный диабет и ожирение. Данные недавних исследований с достаточной долей убедительности продемонстрировали роль PAI-1 в прогрессировании роста жировой ткани и регуляции инсулин-зависимых процессов в адипоцитах. PAI-1 стимулирует миграцию лимфоцитов и нейтрофилов в участки воспалительной реакции (Arndt P. et al., 2005).

Показаны корреляционные взаимосвязи между сывороточными уровнями PAI-1 и риском сердечно-сосудистых заболеваний - так, повышение плазменной концентрации PAI-1 ассоциировано с риском инфаркта миокарда (Thögersen A. et al., 1998) (а также рецидива последнего [Hamsten A. et al., 1987]), стенокардии напряжения (Juhan-Vague I. et al., 1989) и атеросклероза (Schneiderman J. et al., 1992). В дополнение к регулирующей функции в системе фибринолиза, PAI-1 также представляет собой агент, влияющий на ремоделирование матриксных структур. Экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о том, что

PAI-1 не только биомаркер, но и один из основных медиаторов таких системных заболеваний, как сосудистая патология (Cesari M. et al.), астма, рак (Durand M. et al., 2004), инсулино-резистентность, ожирение (Lijnen H. et al., 2005).

1.6 Генетические альтерации, модулирующие течение атеросклероза брахиоцефальных артерий

1.6.1 Однонуклеотидные полиморфизмы гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR)

Уже в течение достаточно длительного времени известно, что высокие уровни гомоцистеина в плазме крови могут повреждать эндотелиальную выстилку артерий и, таким образом, становиться причиной развития макроангиопатий (Buysschaert M. et al., 2000) и, в частности, атеросклероза (Selhub J. et al., 1995). Фермент метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR) осуществляет метилирование гомоцистеина с образованием метионина (Goyette P. et al., 1994); дисфункция этого ферментативного комплекса может приводить к гипергомоцистеинемии. Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в локусе rs1801133 фермента MTHFR (677C→T) приводит к замене аминокислоты аланин на валин в 222-м положении в N-концевом каталитическом центре этого фермента. Указанная мутация ведет к снижению активности фермента таким образом, что у лиц с генотипами СТ и ТТ она составляет 65% и 35% соответственно, от уровня таковой у людей с «диким» генотипом СС (Frosst P. et al., 1995; Weisberg I. et al., 1998). Неоднократно показано, в том числе работами Научного центра неврологии, что у пациентов с генотипом ТТ определяются достоверно более высокие уровни гомоцистеина, чем у пациентов с другими вариантами этого SNP (Brattstrom L. et al., 1998; Зорилова И.В., 2006). Более недавние исследования, посвященные полногеномному поиску ассоциаций,

подтвердили наличие взаимосвязи между генотипом локуса rs1801133 и уровнем гомоцистеина у здоровых лиц (Pare G. et al., 2009; Lange L. et al., 2010).

Еще одним однонуклеотидным полиморфизмом в гене MTHFR является 1298A→C, который приводит к замене аминокислоты глутамин на аланин в 429-м положении фермента. В нескольких исследованиях было продемонстрировано снижение активности MTHFR под влиянием указанной мутации (Weissberg I., 2001), что явилось основанием считать наличие последней также фактором риска развития гипергомоцистеинемии. Однако возможно, в связи с тем, что замена 1298A→C вызывает мутацию в С-концевом регуляторном домене фермента, снижение активности MTHFR под влиянием данного однонуклеотидного полиморфизма не настолько выражено (van der Put N. et al., 1998).

1.6.2 Однонуклеотидный полиморфизм в гене параоксоназы-1 (PON-1)

Параоксоназа-1 (PON1) представляет собой белковую молекулу, состоящую из 354 аминокислот молекулярной массой в 43 кДа (Primo-Parma S. et al., 1996; Mackness M. et al., 1996). В плазме крови этот фермент связан исключительно с ЛПВП. Следует отметить, что из всех протеинов, связанных с ЛПВП, PON-1 в наибольшей степени ответственен за разрушение липидных перекисей до того, как они аккумулируются ЛПНП (Mackness M. et al., 1991; Mackness M. et al., 1993). Очищенная форма PON-1 обладает высокой способностью предотвращать перекисное окисление липидов (Watson A. et al., 1995; Aviram M. et al., 1998; Arrol S. et al., 1996; Mackness B. et al., 1998).

Ген PON1 расположен на длинном плече 7-й хромосомы между регионами q21.3 и q22.1, вместе с другими генами его надсемейства (Hegele R., 1999; Clendenning J. et al., 1996). Недалеко от региона, где располагается ген PON-1, находится ген, кодирующий синтез киназы пируват-

дегидрогеназы (Rowles J. et al., 1996); указанный факт может в ряде случаев объяснить наличие корреляций между вариантами генотипа по гену PON-1 и частотой развития диабетических нарушений, описанных в некоторых исследованиях (Hegele R. et al., 1997; Mackness B. et al., 2000). Наличие у параоксаназ антиоксидантной активности, а также долговременные представления о том, что окисленные ЛПНП являются одними из ключевых медиаторов атеросклероза, стали причиной того, что ген PON-1 стал рассматриваться как ген-кандидат коронарного и каротидного атеросклероза (Robertson K. et al., 2003; Wheeler J. et al., 2004). В исследованиях на мышах показано, что отсутствие гена PON-1 делает животных более восприимчивыми к развитию атеросклероза, а ЛПВП, изолированные из их плазмы, не способны *in vitro* препятствовать перекисному окислению ЛПНП (Shih D. et al., 1998). В клинических исследованиях показано, что активность PON-1 снижена у пациентов с острым инфарктом миокарда (Ayub A. et al., 1999), а также при состояниях злокачественного атерогенеза, в частности, на фоне семейной гиперхолестеринемии и сахарного диабета (Mackness B. et al., 1998).

Описаны два наиболее распространенных полиморфизма, кодирующего регион гена PON-1, которые приводят к замене глутамина (Q) на аргинин (R) в положении 192 и лейцина (L) на метионин (M) в положении 55 соответственно (Humbert R. et al., 1993). Указанные SNP ведут к изменению активности параоксаназы-1 (Garin M. et al., 1997). *In vitro* показано, что PON-1 «дикого» (Gln192) типа значительно эффективнее в защите ЛПНП от окисления, чем мутантный вариант (Arg192) (Mackness B. et al., 1998; Aviram M. et al., 1998). Существующие клинические исследования, посвященные определению связи генотипа PON-1 и риска развития коронарного атеросклероза, продемонстрировали неоднозначные результаты. Некоторыми исследователями показана более высокая частота развития атеросклероза у носителей 192R аллеля, причем риск (в зависимости от работы) варьировал от 1,7 до 8,8 (Mackness B. et al., 2001).

Также проводились исследования влияния генотипа PON1 у пациентов с цереброваскулярной патологией. В частности, показан существенно более высокий риск ишемического инсульта у пациентов с мутантной формой гена PON-1 (Gln192Arg) (Ranade K. et al., 2005).

1.6.3 Однонуклеотидный полиморфизм в гене Р-селектина (SELP)

Р-селектин принадлежит к семейству селектинов – молекул клеточной адгезии, которые играют важную роль в прикреплении лейкоцитов к эндотелию и тромбоцитам (Carter A. et al., 2003). Активированные тромбоциты быстро и в большом количестве выделяют Р-селектин, при этом продолжая функционировать (Michelson A. et al., 1996). В экспериментах на мышах наличие в плазме крови циркулирующих тромбоцитов, содержащих гранулы с Р-селектином, приводило к более распространенному атеросклеротическому поражению стенок артерий (Burger P. et al., 2003). Р-селектин также способствует высвобождению и синтезу провоспалительных медиаторов в эндотелии (Нюо Y. et al., 2003; Schober A. et al., 2002). Повышенный уровень Р-селектина у здоровых добровольцев может являться предиктором развития в будущем сердечно-сосудистых осложнений (Ridker P. et al., 2001), а высокая активность этой молекулы ассоциирована с утолщением комплекса интима-медиа сонных артерий (Кояма Н. et al., 2003). Показано, что Р-селектин интенсивно экспрессируется эндотелием, покрывающим атеросклеротическую бляшку (Johnson-Tidey R. et al., 1994).

Описаны несколько полиморфизмов гена Р-селектина (-1817 Т/С, -1969 G/A, -2123 С/G), однако наибольшее клиническое значение придается в настоящее время замене аминокислоты треонина на пролин в 715-м положении конечного продукта гена (Thr715Pro) (Carter A. et al., 2003). У носителей «мутантного» аллеля Pro715 (в гетеро- или гомозиготном варианте) выявлены более низкие уровни растворимого Р-селектина, чем у

носителей «дикого» генотипа (Volcik K. et al., 2006). Этим, вероятно, можно объяснить тот факт, что у носителей «мутантного» аллеля меньший риск сердечно-сосудистых заболеваний (в частности, инфаркта миокарда) (Herrmann S. et al., 1998). Данный полиморфизм рассматривается в настоящее время как обладающий «протективными» в отношении атеросклероза и связанных с ним осложнений свойствами.

1.6.4 Однонуклеотидные полиморфизмы в генах PAI-1, альфа-1-антитрипсина (SERPINA-1) и аквапорина-9 (AQP-9)

Ген PAI-1 расположен у человека на 7-й хромосоме (7q21.3-22), причем несколько полиморфизмов данного региона ассоциированы с плазменным уровнем ингибитора активатора плазминогена-1 (Strandberg L. et al., 1998). Достаточно распространенный SNP, расположенный в области промотора данного гена (положение -675), представляет собой инсерцию/делецию одного остатка гуанидина (при этом варианты соответствуют 5G или 4G). В результате данной мутации образуются две разновидности аллелей, которые содержат либо 4, либо 5 последовательных остатков гуанозина, что приводит к дисбалансу в структуре формирования фибрина.

В общей популяции выявлена закономерность между данным полиморфизмом и плазменным уровнем PAI-1, причем у людей, гомозиготных по аллелю, содержащему делецию (4G), выявлены более высокие уровни PAI-1 (Dawson S. et al., 1991). Экспрессия PAI-1 увеличена в области атеросклеротической бляшки (Schneidermann J. et al., 1992). Носительство аллеля 4G повышает риск развития тромбозов любой локализации (Balta G. et al., 2002). Исследования случай-контроль, проводившиеся в разных когортах больных, продемонстрировали неоднозначные результаты касательно корреляции генотипического варианта гена PAI-1 с основными сердечно-сосудистыми заболеваниями. Так, по данным одного мета-анализа, включавшего 9 исследований, было

выявлено повышение риска инфаркта миокарда на 20% у носителей гомозиготной делеции 4G/4G (Boekholdt S. et al., 2001). Также была выявлена связь носительства данного SNP с атеротромботическими нарушениями мозгового кровообращения (Bang C. et al., 2001). Наличие указанной мутации коррелирует с атеросклеротическим поражением коронарных артерий, верифицированным при коронарной ангиографии (Lima L. et al., 2011). С другой стороны, была показана протективная роль аллеля 4G в отношении развития ишемического инсульта у пожилых (Hoekstra L. et al., 2003). Интерес представляют и работы, посвященные антиатерогенному влиянию данного полиморизма. В частности, установлено ингибирующее воздействие PAI-1 на миграцию и пролиферацию гладко-мышечных клеток в области атеросклеротических изменений (Onalan O. et al., 2008). А в эксперименте *in vitro* показано влияние экспрессии PAI-1 на васкулярное ремоделирование, а также поток-зависимую пролиферацию интимального слоя (Redmond E. et al., 2001), что может играть одну из ключевых ролей в атерогенезе.

В проведенном в 2012 году исследовании поиска полногеномных ассоциаций с построением метаболических сетей при атеросклерозе было выявлено, что в атеросклеротических бляшках повышена экспрессия некоторых ранее не изученных генов, в частности гена альфа-1-антитрипсина (SERPINA1) и аквапорина-9 (AQP9). В данной работе постулируется, что SNP в этих генах (rs1303 и rs16939881 соответственно), учитывая статистически достоверные различия, могут играть определенную роль в развитии и прогрессировании атеросклеротического процесса (Inouye M. et al., 2012).

Таким образом, имеющийся на сегодняшний день объем научной информации о факторах инициации, развития и прогрессирования атеросклеротического процесса свидетельствует о чрезвычайной сложности и неоднозначности выявляемых клинических и молекулярно-генетических

взаимодействий. В связи с этим нами было предпринято исследование для изучения возможных маркерных компонентов, позволяющих выявить ранние стадии цереброваскулярной патологии атеросклеротического генеза.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объем и методы исследования

Основой настоящей работы стали исследования биохимических маркеров эндотелиальной дисфункции, свертывающей и противосвертывающей системы крови, генетических альтераций в генах-кандидатах атеросклеротического процесса, а также комплексная оценка неврологической (включая степень когнитивной дисфункции) и соматической симптоматики. Изучена медицинская документация 698 пациентов с цереброваскулярной патологией, из которых согласно критериям выделена группа из 117 пациентов со стенозирующим атеросклерозом в системе внутренних сонных артерий умеренной и высокой степеней, у которых в анамнезе нет указаний на перенесенные острые нарушения мозгового кровообращения (так называемые «асимптомные» пациенты). Диагностические мероприятия были проведены с привлечением высокоинформативных и современных методов исследования, включая магнитно-резонансную томографию, ультразвуковое дуплексное сканирование магистральных артерий головы. Всем пациентам проводилось исследование биохимических маркеров различных модальностей (системы гемостаза, липидного обмена, эндотелиальной дисфункции) с использованием иммуноферментного анализа. Молекулярно-генетическое тестирование было выполнено с привлечением методики полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» ('real-time' ПЦР).

2.1. Общая характеристика больных

В исследование было включено 117 пациентов с «асимптомными» стенозами одной из внутренних сонных артерий (не менее 50%) и 105 добровольцев без признаков атеросклероза в системе сонных артерий

(верифицированным при дуплексном сканировании магистральных артерий головы и шеи). Критерием «асимптомности» стеноза, в соответствие с текущими рекомендациями, являлось отсутствие ишемического инсульта в бассейне пораженной внутренней сонной артерии в течение 6 месяцев от времени выявления стеноза. Однако в настоящем исследовании было принято решение о сужении критериев включения пациентов в группу исследования – были отобраны лишь пациенты, у которых в анамнезе отсутствовали указания на перенесенное нарушение мозгового кровообращения (как ипси-, так и контралатерально по отношению к стенозированной артерии) любой этиологии (как ишемического, так и геморрагического генеза). Средний возраст обследованных составил $65,7 \pm 9,3$ лет; несколько преобладали мужчины (59%) (Таблица 2).

Таблица 2

Распределение обследованных по полу

Пол	Группа пациентов с «асимптомными» стенозами ВСА		Пациенты контрольной группы	
	N	%	N	%
Мужчины	69	59	41	39
Женщины	48	41	64	61
Итого	117	100	105	100

Критериями исключения из исследования (помимо указаний на перенесенное НМК) являлось наличие тяжелой сопутствующей соматической патологии (хроническая сердечная недостаточность II, нестабильная стенокардия, онкологические заболевания, хроническая легочная, печеночная и почечная недостаточность, язвенные заболевания желудочно-кишечного тракта в стадии обострения и т.д.).

Обследование пациентов проводилось однократно и включало в себя

(после подписания пациентом информированного согласия и ознакомления с информационным листком): сбор жалоб и анамнеза, детальный клинико-неврологический осмотр, взятие образцов крови для лабораторного и молекулярно-генетического тестирования.

С целью объективизации неврологической симптоматики пациентов в настоящую работу была включена балльная рейтинговая шкала со стандартизированными критериями оценки и степени выраженности субъективной и объективной симптоматики (Суслина З.А., Смирнова И.Н., 2003): 0 – симптом отсутствует, 1 – легкие проявления, 2 – умеренная выраженность, 3 – выраженные проявления, 4 – грубые проявления (Таблица 3). Результаты суммируются, максимальное количество, отражающее наиболее тяжелую степень выраженности симптомов по всем категориям при оценке субъективных симптомов, составляет 24 балла, объективной симптоматики – 39 баллов.

Группу контроля составили 105 пациентов, обратившихся в клинические отделения ФГБНУ НЦН, у которых при проведении дуплексного сканирования БЦА не было выявлено признаков атеросклероза в системе внутренних сонных и позвоночных артерий. Средний возраст указанной когорты пациентов составил $53,4 \pm 11,6$ лет; несколько преобладали женщины (61%).

Согласно критериям ВНОК (2009) у пациентов как группы исследования, так и контрольной группы проводился анализ на предмет наличия метаболического синдрома (МС). С этой целью проводились, в том числе, антропометрические измерения – рост, вес, окружность живота. Индекс массы тела (ИМТ) был рассчитан по формуле: $\text{ИМТ} = \text{вес (кг)} / \text{рост (м)}^2$. Таким образом, в зависимости от наличия МС в обеих группах пациенты были распределены следующим образом: в исследуемой группе МС выявлялся у 30% ($n = 35$) пациентов, в то время как в группе контроля – в 11% ($n = 12$) случаев.

Шкала балльной оценки неврологической симптоматики

Оценка субъективных симптомов		Оценка объективных симптомов	
Головная боль	0-4 балла	Нистагм	0-3 балла
Шум в голове	0-4 балла	Двигательные нарушения	0-4 балла
Нарушение сна	0-4 балла	Тремор	0-4 балла
Утомляемость	0-4 балла	Нарушения статики и походки	0-4 балла
Нарушение памяти	0-4 балла	Нарушение координации	0-4 балла
		Акинетико-ригидный синдром	0-4 балла
		Псевдобульбарный синдром	0-4 балла
		Нарушения чувствительности	0-4 балла
		Другие (речь, зрение)	0-4 балла
		Эмоциональная лабильность	0-4 балла
Итого: суммарное максимальное количество баллов	24 балла		39 баллов

В группе исследования и группе контроля был сопоставимый показатель распространенности злоупотребления табакокурением – 34% (n = 40) и 37% (n = 43) соответственно.

Всем пациентам в исследуемой группе проводился опрос по шкале когнитивной оценки MoCA (The Montreal Cognitive Assessment test), включавшей вопросы на выявление зрительно-пространственных нарушений, снижения слухо-речевой памяти, концентрации и внимания.

2.2 Характеристика методов исследования

Обследование пациентов включало как инструментальные методики, так и комплексную оценку общесоматического и неврологического статуса, рутинные клинико-лабораторные тесты, определение биомаркеров методом иммуно-ферментного анализа, а также проведение молекулярно-генетического тестирования.

2.2.1 Исследование биомаркеров методом иммуноферментного анализа (ИФА)

Исследование биомаркеров проводилось на базе лаборатории гемореологии и нейроиммунологии с клинической лабораторной диагностикой ФГБНУ «НЦН» (руководитель - к.м.н. Шабалина А.А.). Исследования проводились с использованием микропланшетного ридера Victor², Perkin-Elmer (США). Для всех исследований использовались калибраторы фирм производителей реагентов. Контроль выполнения анализов иммуноферментным методом проводился в дублях с использованием лиофилизированных контрольных сывороток/ плазм с низким и высоким содержанием исследуемых параметров.

Взятие образцов крови проводилось натощак, из локтевой вены одноразовой иглой в вакуумные пробирки (1-ю, содержащую активатор свертывания, 2-ю, - ЭДТА К3). В течение 30 минут от момента взятия образцы крови центрифугировали 10 минут со скоростью 3000 об/мин. Исследуемая плазма в дальнейшем аликвотировалась и замораживалась при температуре -80°C. Размораживание образцов производилось непосредственно перед проведением ИФА.

2.2.1.1 Количественное определение окиси азота (NO).

Определение окиси азота (NO) проводили в образцах сыворотки крови с помощью ИФА с использованием биохимического метода в микропланшетном формате. Длина волны: 540 нм. Диапазон измерения: 0.78-200 мкмоль/л. Аналитическая чувствительность: 0.78-200 мкмоль/л.

Метод основан на ферментном превращении нитрата в нитрит под действием фермента нитратредуктазы. Специфическая реакция нитрит – иона, основанная на синтезе азосоединения (реакция Грисса) регистрируется колориметрически. Реакция Грисса - двухстадийная реакция диазотирования,

в которой кислый NO_2 (нитрозирующий агент, реагирует с сульфаниловой кислотой с образованием иона диазония. Этот ион присоединяется к N-(1-нафтил) этилендиамину с формированием цветного азопроизводного, которое поглощает свет на длине волны 540-570 нм.

Использовался набор Total NO/Nitrite/Nitrate Assay фирмы R&D Systems (США), который имеет 2 аналитические опции. Измерение эндогенного нитрита – первая опция. Превращение нитрата в нитрит с использованием нитрат-редуктазы и измерение общего нитрита – вторая. Для получения концентрации нитрата необходимо вычесть концентрацию эндогенного нитрита из значения общего нитрита.

2.2.1.2 Определение концентрации адипонектина

Методика является вариантом «сэндвичного» ИФА.

Определение адипонектина в образцах сыворотки крови человека проводили с использованием набора реагентов компании BioVendor. Диапазон измерения: 0.026-100 мкг/мл. Чувствительность: 0.026 мкг/мл. В процессе анализа стандарты, образцы и контроли инкубировали в лунках микропланшета с иммобилизованными на них человеческими анти-адипонектин антителами. После процедуры промывки в лунки с иммобилизованным комплексом антитела-sTfR добавляли другие моноклональные антитела sTfR человека, меченные пероксидазой хрена. После второй инкубации и процедуры промывки в лунки добавляли хромогенный субстрат - тетраметилбензидин. Реакцию останавливали раствором кислоты. Абсорбцию определяли спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Показатели абсорбции были пропорциональны концентрации адипонектина в исследуемом образце.

2.2.1.3 Определение концентрации ингибитора активатора плазминогена первого типа (РАI-1) и тканевого активатора плазминогена (t-РА)

Определение t-РА и РАI-1 проводилось по принципу иммуноанализа «сэндвич»-типа, описанному в п. 2.2.1.1, с использованием наборов реагентов компании Technoclone (Австрия).

2.2.1.4 Определение концентрации асимметричного диметиларгинина (АДМА)

Данная методика базируется на конкурентной схеме ИФА.

Использовались наборы реагентов фирмы Immundiagnostik. Диапазон измерения: 0.04-2 мкмоль/л. Чувствительность: 0.04 мкмоль/л. До начала анализа в микропланшете, образцы сыворотки крови разводились дериватизатором. Подготовленные образцы инкубировали вместе с поликлональными анти-АДМА антителами в лунках микропланшета, покрытых производным АДМА. В течение инкубационного периода АДМА в исследуемой плазме конкурирует за связывание с поликлональными антителами с исходно присутствовавшим в лунках производным АДМА.

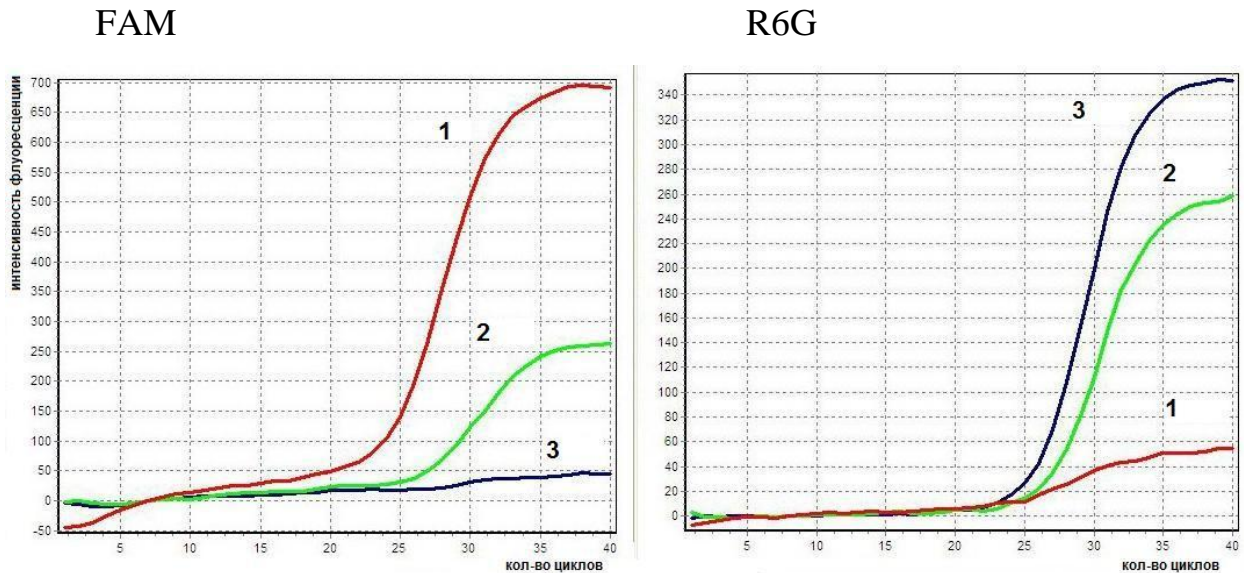
2.2.2 Молекулярно-генетическое тестирование образцов крови

Генетические исследования для настоящей работы выполнялись на базе ДНК-лаборатории отделения нейрогенетики ФГБНУ «НЦН» (хотелось бы выразить благодарность за активную помощь в вопросах организации и проведения всех этапов этой части проекта д.м.н., проф. С.Н. Иллариошкину и к.б.н. Н.Ю. Абрамычевой). В общей сложности молекулярно-генетическое тестирование было проведено на 222 образцах – это 117 пациентов из группы с «асимптомными» стенозами ВСА и 105 пациентов из группы контроля.

Образцы геномной ДНК выделяли из цельной крови с помощью набора

для выделения Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Cat.# A1125).

Основной методикой выявления генетических альтераций являлась полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ), позволяющая однозначно определять однонуклеотидные замены с помощью аллель-специфичных TaqMan зондов (Рисунок 1).



- 1 – «Дикий» вариант», норма. Рост сигнала флуоресценции наблюдается по каналу красителя FAM.
- 2 – Гетерозиготный образец. Рост сигнала флуоресценции наблюдается по каналам красителя FAM и R6G.
- 3 – Мутантный вариант, гомозиготный образец. Рост сигнала флуоресценции наблюдается по каналу красителя R6G.

Рисунок 1 – Графическое отображение результатов «real-time» ПЦР

Для оценки наличия однонуклеотидных полиморфизмов (single-nucleotide polymorphisms – SNP) в генах, ассоциированных с развитием и прогрессированием атеросклероза: G1096A в гене *SERPINA*, A575G в гене *PON1*, G435C в гене *AQP9*, A2266G в гене *SELP* методом ПЦР-РВ были выбраны праймеры, фланкирующие область однонуклеотидной замены, с помощью компьютерных программ Primer3 и Primer-BLAST. Дизайн зондов был разработан специалистами научно-производственной компании «Синтол». Праймеры и зонды синтезированы в компании «Синтол» (Таблица 4).

**Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов для детекции
полиморфизмов**

ген	Полимор- физм	Праймеры и зонды
<i>SERPINA1</i>	rs28929474 1096G>A Glu366Lys	прямой праймер: 5'- GTGTCTCTGCTTCTCTCC - 3' обратный праймер: 5'- TTGTTGAACTTGACSTCGGG -3' зонд для дикого аллеля: 5'-(FAM)CATCGACAAGAAAGGGACTGAAG(RTQ1)-3' зонд для мутантного аллеля: 5'- (R6G)ATCGACGAGAAAGGGACTGAAG(BHQ2) -3'
<i>PON1</i>	rs662 575A>G Gln192Arg	прямой праймер: 5'- TTGCTGTGGGACCTGA -3' обратный праймер: 5'- CGACCACGСТАААСССАААТ -3' зонд для дикого аллеля: 5'- (FAM)TGACCCСТАСТТАСААТССТGG(RTQ1) -3' зонд для мутантного аллеля: 5'- (R6G)GACCCСТАСТТАСГАТССТGG(BHQ2) -3'
<i>AQP9</i>	rs16939881 435G>C интрон	прямой праймер: 5'- СТСТТССТСГТГААССАС -3' обратный праймер: 5'- ТСССТGGCAGТТАСТСАСАС -3' зонд для дикого аллеля: 5'-(FAM)ТТАТТССАСАГАТАТТТГТТGGGCA(RTQ1)-3' зонд для мутантного аллеля: 5'- (R6G)ТТССАСАГАТАТТТСТТGGGCAT(BHQ2) -3'
<i>SELP</i>	rs6136 2266A> G Thr756Pro	прямой праймер: 5'- ССАТТGTCTAGAGGGCCAGT -3' обратный праймер: 5'- GACACAGGGAAGAAАСАСТ -3' зонд для дикого аллеля: 5'- (FAM) TTGGCACGGTAGTTGACCA (RTQ1) -3' зонд для мутантного аллеля: 5'- (R6G) CGGTAGGTGACСAGTGGC (BHQ2) -3'

Аmplификация проводилась в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 50 mM KCl, 15mM Трис-НCl (pH 8.8), 0.5% глицерола, 0.1% Tween 20, 2.5mM MgCl₂, 250мкM dNTP, 1ед. Таq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами («Синтол», Москва), по10 пкмоль каждого праймера и по

5 пкмоль каждого зонда, по следующему протоколу реакции: начальная денатурация при 95⁰С – 120сек и далее 40 циклов с температурно-временным режимом: плавление при 95⁰С – 15сек, отжиг и синтез при 60⁰С – 40сек. Результаты визуализировались на анализаторе нуклеиновых кислот «АНК-32» («Синтол», Москва)

Помимо указанных генов в исследование были включены и ранее описанные как в отечественной, так и в мировой литературе мажорные мутации, ассоциированные с повышением тромбогенного потенциала крови: мутация в гене PAI-1, а также две мутации в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (С677Т и А1298С). Для тестирования этих генетических маркеров (Таблица 5), использовали наборы "SNP-Скрин" компании «Синтол», позволяющие определять однонуклеотидные замены методом ПЦР-РВ.

Таблица 5

Однонуклеотидные полиморфизмы генов системы свертывания

Ген		Полиморфизм		
<i>MTHFR</i>	ген метилентетрагидро- фолатредуктазы	Ala223Val	С677Т	rs1801133
<i>MTHFR</i>	ген метилентетрагидро- фолатредуктазы	Glu429Ala	А1298С	rs1801131
<i>PAI-1</i>	ген ингибитора активатора плазминогена		-675 5G/4G	rs1799768

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Оценка клинического состояния обследованных больных

3.1.1. Общесоматический статус больных

Основной сосудистый патологический процесс у пациентов в группе исследования был представлен атеросклерозом в системе внутренних сонных артерий средней (>50% стеноз просвета артерии) и высокой (>70%) градаций. Наиболее часто он был ассоциирован с артериальной гипертонией (76%), в подавляющем большинстве 1-ой и 2-й степеней. Ишемическая болезнь сердца (ИБС) была представлена несколько реже – в 28% случаев (n = 33), однако необходимо отметить, что чаще она была представлена либо постинфарктным кардиосклерозом (n = 8), либо стенокардией напряжения (n = 11). Нарушения углеводного обмена составляли достаточно распространенную патологию среди пациентов в группе исследования: так, сахарный диабет 2-го типа (СД2) встречался в 18% случаев (n = 21). Из эндокринной патологии стоит отметить заболевания щитовидной железы, которые в группе исследования встречались в 8% случаев (n = 9). Остальные варианты соматической патологии были представлены единичными случаями: бронхиальная астма (n = 1), хроническая болезнь почек (n = 2), глаукома (n = 1).

Распространенность ожирения была сравнительно высокой в группе исследования и составила 30% (n = 35), средний показатель ИМТ у этих пациентов равнялся 31,5 [29,0; 35,5] кг/м².

В группе контроля показатели заболеваемости сердечно-сосудистой патологией были значительно ниже, чем в группе исследования, что можно объяснить и более низким возрастным порогом, а также намеренным включением пациентов без каротидного атеросклероза. Так, распространенность артериальной гипертонии среди пациентов контрольной группы составила 49% (n = 51). Кардиологическая патология

также встречалась значительно реже: лишь у 12% больных имелось указание на нарушения ритма сердца в анамнезе. Показатели заболеваемости эндокринной патологией были также несколько ниже: так, нарушение углеводного обмена было диагностировано у 11 человек (10,5%); болезни щитовидной железы встречались у 9 человек (8,5%). Средний показатель ИМТ у пациентов контрольной группы составил 23,6 [19,4; 27,3] кг/м².

Показатели распространенности наиболее часто выявляемых заболеваний у пациентов основной и контрольной групп представлены ниже (Рисунок 2).

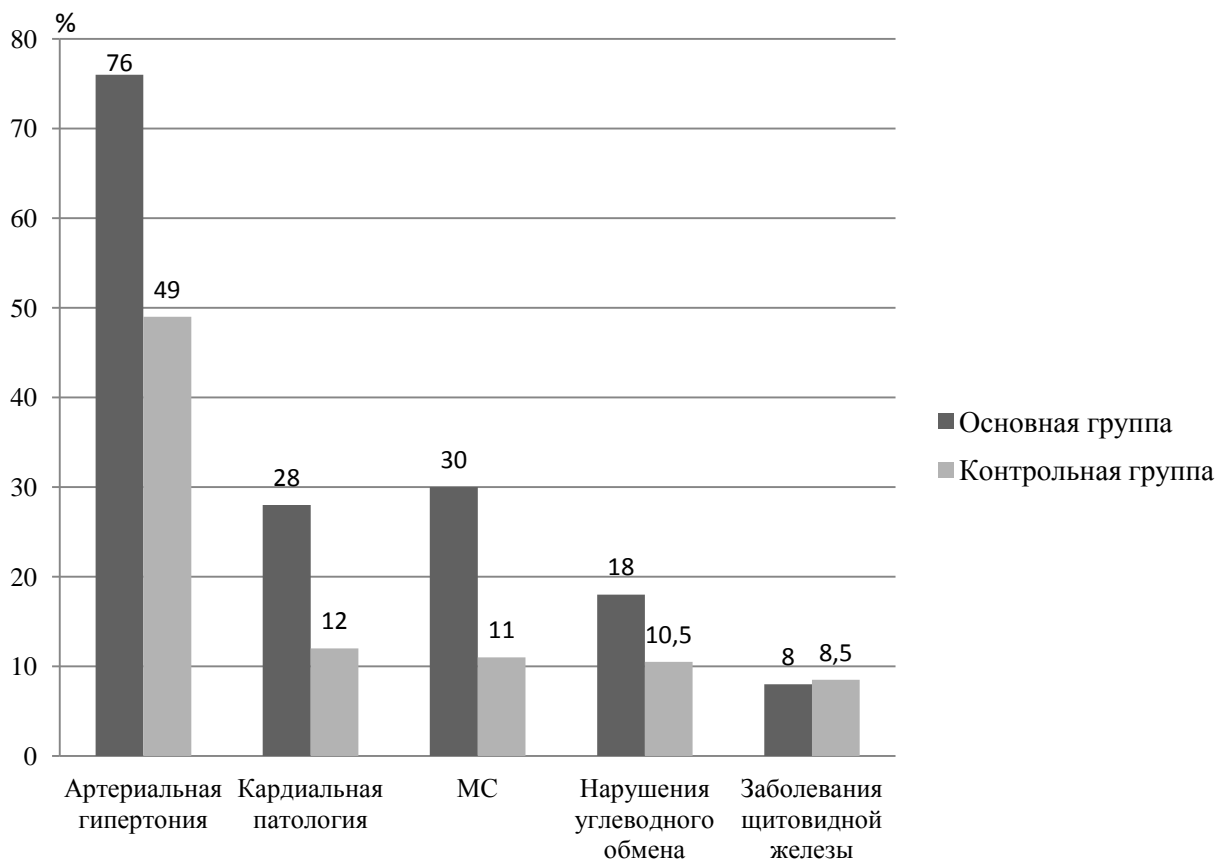


Рисунок 2 – Наиболее частые заболевания у обследованных

3.1.2. Оценка неврологического статуса обследованных больных

Наиболее распространенными жалобами пациентов с «асимптомными» стенозами ВСА были: головная боль и/или реже шум в ушах, а также лабильность настроения и памяти. Онемение в дистальных отделах рук и ног встречалась у 8 пациентов (6,8%), однако оно вероятнее всего было связано с диабетической полинейропатией, присутствовавшей у этих больных.

При анализе неврологического статуса указанной когорты пациентов основным синдромом являлся цефалгический, реже проявлялись когнитивные нарушения. Головные боли встречались достаточно часто, в 56% случаев ($n = 65$), имели в подавляющем большинстве «давящий», «тупой» характер, локализовались в лобно-височной и затылочной областях.

Когнитивные нарушения были представлены в основном жалобами на нарушение памяти (преимущественно на текущие события). Для объективизации выявленных изменений был использован опросник MoCA. Средний балл по этой шкале в группе исследования составил $24,9 \pm 2,6$ баллов, что свидетельствует о наличии у пациентов с «асимптомными» стенозами в ВСА когнитивной дисфункции легкой-умеренной степени. Не выявлено статистически достоверных корреляций между значениями балла по шкале MoCA и возрастом пациентов (коэффициент ранговой корреляции Спирмена $R = - 0,22$). В общей сложности у 79% ($n = 93$) пациентов балл по MoCA был ниже 28 (Рисунок 3). Следует отметить, что наибольшие изменения наблюдались в таких категориях высших корковых функций, как отсроченное воспроизведение и зрительно-пространственное восприятие. Зависимости характера когнитивной дисфункции от сторонности стеноза ВСА отмечено не было.

Отмечена статистически значимая разница в показателях когнитивной функции у пациентов с МС по сравнению с пациентами, у которых данная

патология не выявлялась. Так, медиана балла по шкале МОСА в группе с МС составила 24 [22; 26], в то время как в группе без МС – 26 [24; 28] ($p = 0,011$). Данное наблюдение отражает многомерность и комплексность воздействия такой патологии, как метаболический синдром, причем это влияние выходит за рамки составляющих этот синдром нозологических единиц и состояний.

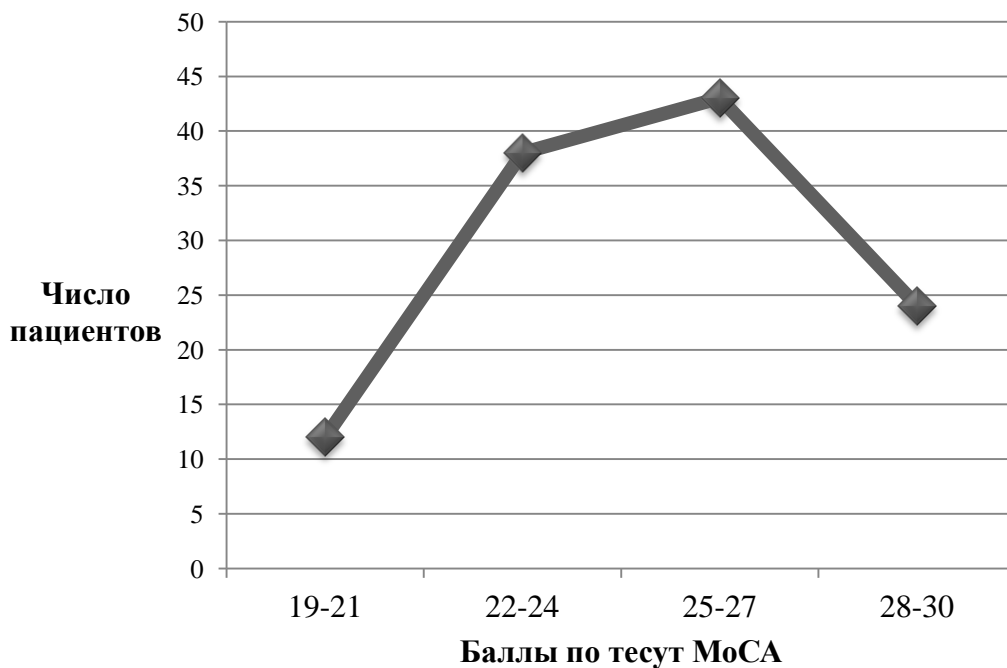


Рисунок 3 – Оценка пациентов с «асимптомными» стенозами (тест МоСА)

При оценке по балльной рейтинговой системе степень выраженности субъективной симптоматики составила у больных группы исследования в среднем 6,3 [4; 8]. При анализе объективного неврологического статуса средние показатели по рейтинговой шкале составили 7,9 [6; 9].

В группе контроля подавляющее большинство пациентов (87%) предъявляло жалобы на головную боль. В отличие от группы исследования, характер цефалгического синдрома носил более варибельный характер, в 10% случаев была диагностирована мигрень в различных формах.

Значительно более низкой оказалась и распространенность когнитивных нарушений – они выявлялись лишь в 15% случаев, отличались легким характером нарушений, с преимущественными жалобами на «забывчивость».

3.2 Степень поражения брахиоцефальных артерий по данным ультразвукового исследования

Основным критерием включения в настоящую работу было наличие стеноза просвета одной из ВСА не менее 50%. Поражение каждой из ВСА наблюдалось примерно в равном проценте случаев (48% для левой, 52% - для правой ВСА). Стенозы умеренной степени (50-69%) наблюдались в 67,6% случаев, высокой степени (70-99%) – в 30,6% (Рисунок 4). Двусторонние стенозы ВСА (>50%) встречались у 21% больных (n = 24). По ультразвуковым параметрам у пациентов в группе исследования преобладали гиперэхогенные атеросклеротические бляшки, во многих имелись участки кальциноза.

Значимых корреляций между степенью стеноза и полом пациентов получено не было, однако выявилась статистически достоверная положительная корреляционная взаимосвязь между возрастом и степенью стеноза правой ВСА ($R = 0,34$, $p = 0,033$). Части пациентов со стенозами ВСА высокой степени в соответствии с текущими рекомендациями были проведены ангиореконструктивные вмешательства (n = 14).

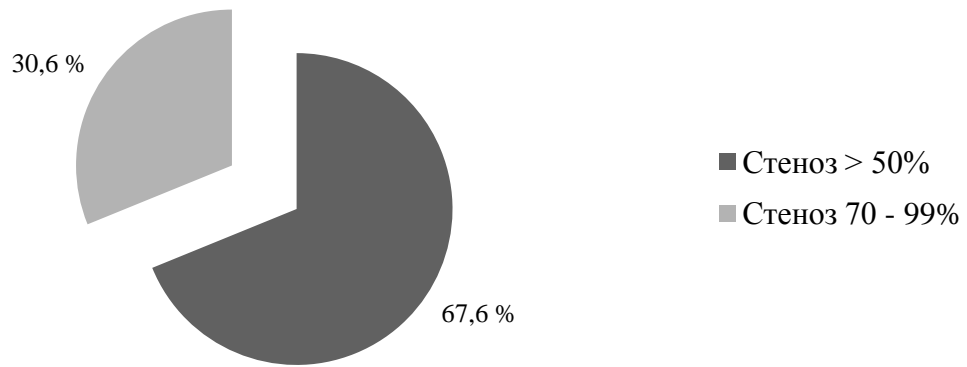


Рисунок 4 – Распределение пациентов в группе исследования в зависимости от степени стеноза

Наличие МС чаще сопровождалось развитием стенозов высокой градации (70-99%). Так, в группе пациентов без МС подавляющее большинство стенозов (80,9%) соответствовали умеренной степени (50-69%), в то время как в группе пациентов с МС этому показателю соответствовали лишь 61,9% больных (Рисунок 5).

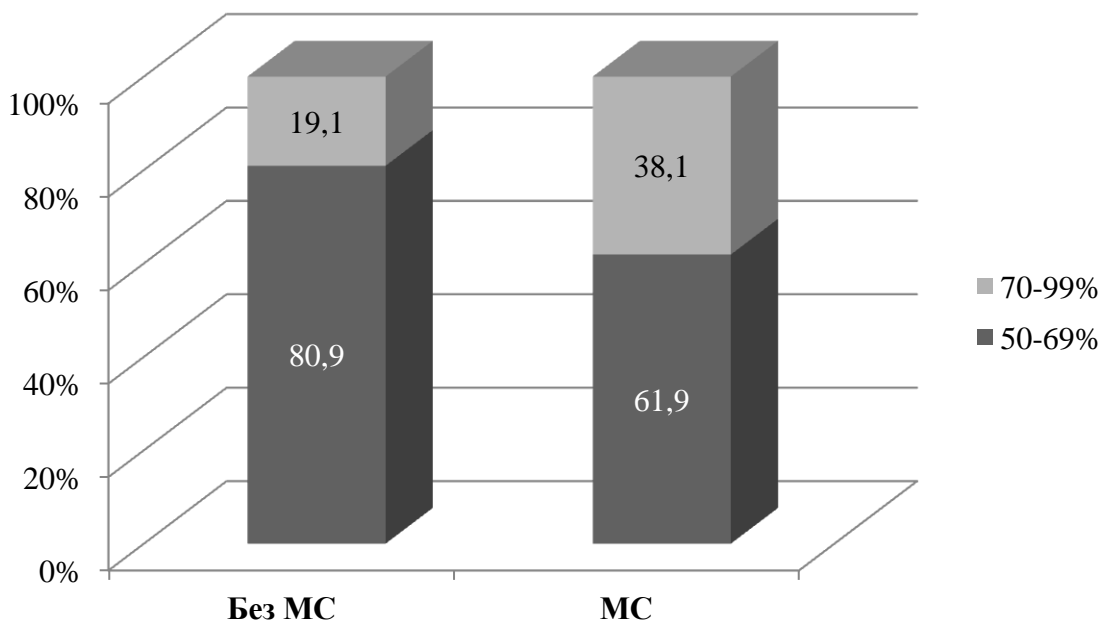


Рисунок 5 – Зависимость степени стеноза от наличия у пациентов МС

Уровень когнитивного дефицита у пациентов в группе исследования, определенный в соответствии с МОСА-тестом, не зависел от степени стеноза сонных артерий ($p = 0,536$).

3.3 Состояние биомаркеров атерогенеза

3.3.1 Оценка метаболизма системы оксида азота (NO)

У пациентов группы исследования показатели концентрации NO_3^- , NO_2^- и оксида азота (NO) плазмы крови достоверно отличались от показателей группы контроля. Как видно из таблицы 6, особенно сильно выявляются различия между уровнями NO_2^- и NO в исследуемых группах.

Указанные изменения основных продуцентов эндотелия могут свидетельствовать о выраженной дисфункции эндотелия уже у пациентов с «асимптомными» стенозами ВСА. Достоверных корреляций между уровнями оксида азота и его метаболитами и возрастом и полом пациентов как в группе исследования, так и в группе пациентов без атеросклероза не выявлялось. Зависимости степени повышения уровня биомаркеров эндотелиальной дисфункции от ИМТ и наличия МС также отмечено не было, что может говорить в пользу совершенно иного механизма, благодаря которому данные изменения реализуются при поражении сосудистой стенки атеросклерозом.

Отсутствие корреляций с основными антропометрическими характеристиками, а также возрастом пациентов свидетельствует о решающей патогенетической роли системы NO в развитии и прогрессировании сосудистой патологии (Raskurazhev A.A., 2015b). Обращает на себя внимание тот факт, что концентрации нитрата и нитрита в плазме крови у пациентов с каротидным атеросклерозом значимо повышены (58,4 [32; 64] и 43,3 [22; 49] мкмоль/л), по сравнению с контрольной группой (45,0 [28,5; 55] и 19,2 [11; 23,3] мкмоль/л, соответственно), в то время как содержание NO, наоборот, значительно

снижено (15,0 [8; 21] и 25,8 [14,5; 29,5] мкмоль/л, соответственно) (Таблица 6).

Таблица 6

Состояние метаболизма системы NO у обслекованных пациентов

<i>Показатель (мкмоль/л)</i>	Основная группа (n = 117)	Контрольная группа (n = 105)	Значение p
NO₃⁻	58,4 [32; 64]	45,0 [28,5; 55]	0,0039
NO₂⁻	43,3 [22; 49]	19,2 [11; 23,3]	0,000003
NO	15,0 [8; 21]	25,8 [14,5; 29,5]	0,0004
NO₃⁻ /NO₂⁻	1,5 [1,2; 1,7]	2,2 [1,9;2,9]	< 10 ⁻⁶

С целью наглядности указанные параметры представлены на Рисунке 6.

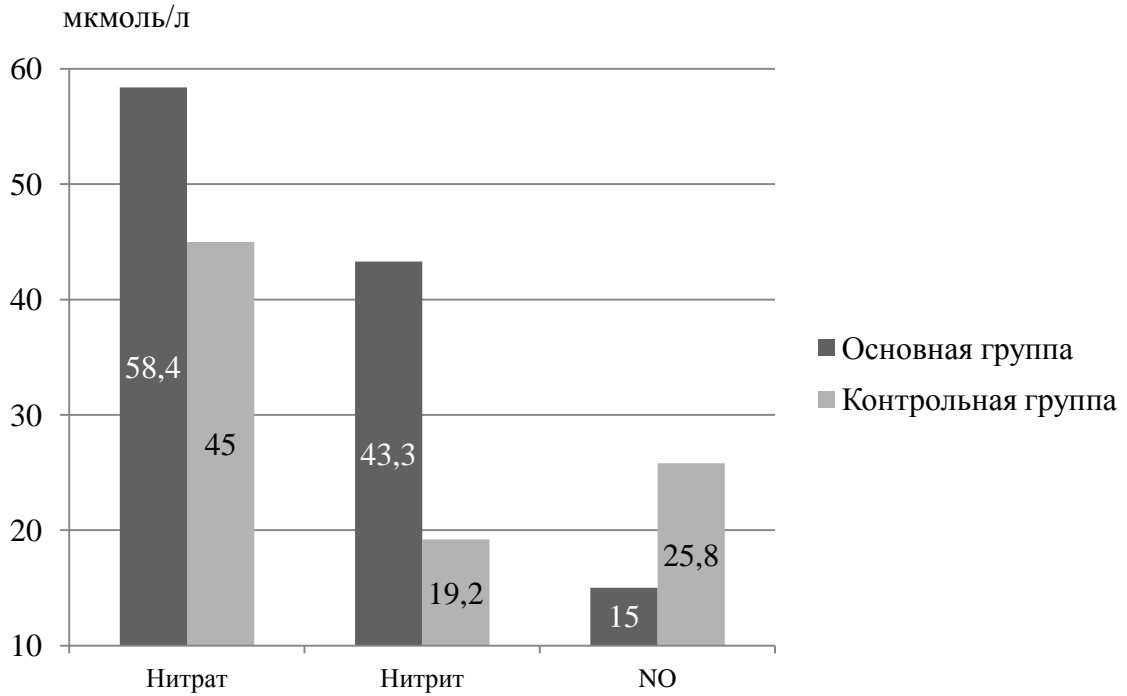


Рисунок 6 – Показатели системы оксида азота у пациентов в исследуемых группах

При оценке интегративного показателя, представляющего отношение NO_3^- к NO_2^- , отмечаются значимые различия между группами. Так, у пациентов с каротидным атеросклерозом выявлено снижение этого соотношения по сравнению с группой контроля (1,5 [1,2; 1,7] и 2,2 [1,9;2,9] соответственно).

При рассмотрении средних значений другого потенциального «участника» метаболизма системы оксида азота – эндогенного ингибитора синтазы NO, асимметричного диметиларгинина (АДМА), - между группами не получено достоверных различий ($p = 0,76$) (Таблица 7). Однако обнаружена достоверная взаимосвязь повышения содержания последнего со снижением уровня NO у «асимптомных» пациентов ($R = - 0,37$) (Рисунок 7), которой нет в группе контроля.

Концентрация АДМА у обследованных пациентов

<i>Показатель</i>	Основная группа (n = 117)	Контрольная группа (n = 105)	Значение <i>p</i>
АДМА (мкмоль/л)	0,36 [0,19; 0,51]	0,37 [0,24; 0,48]	0,76

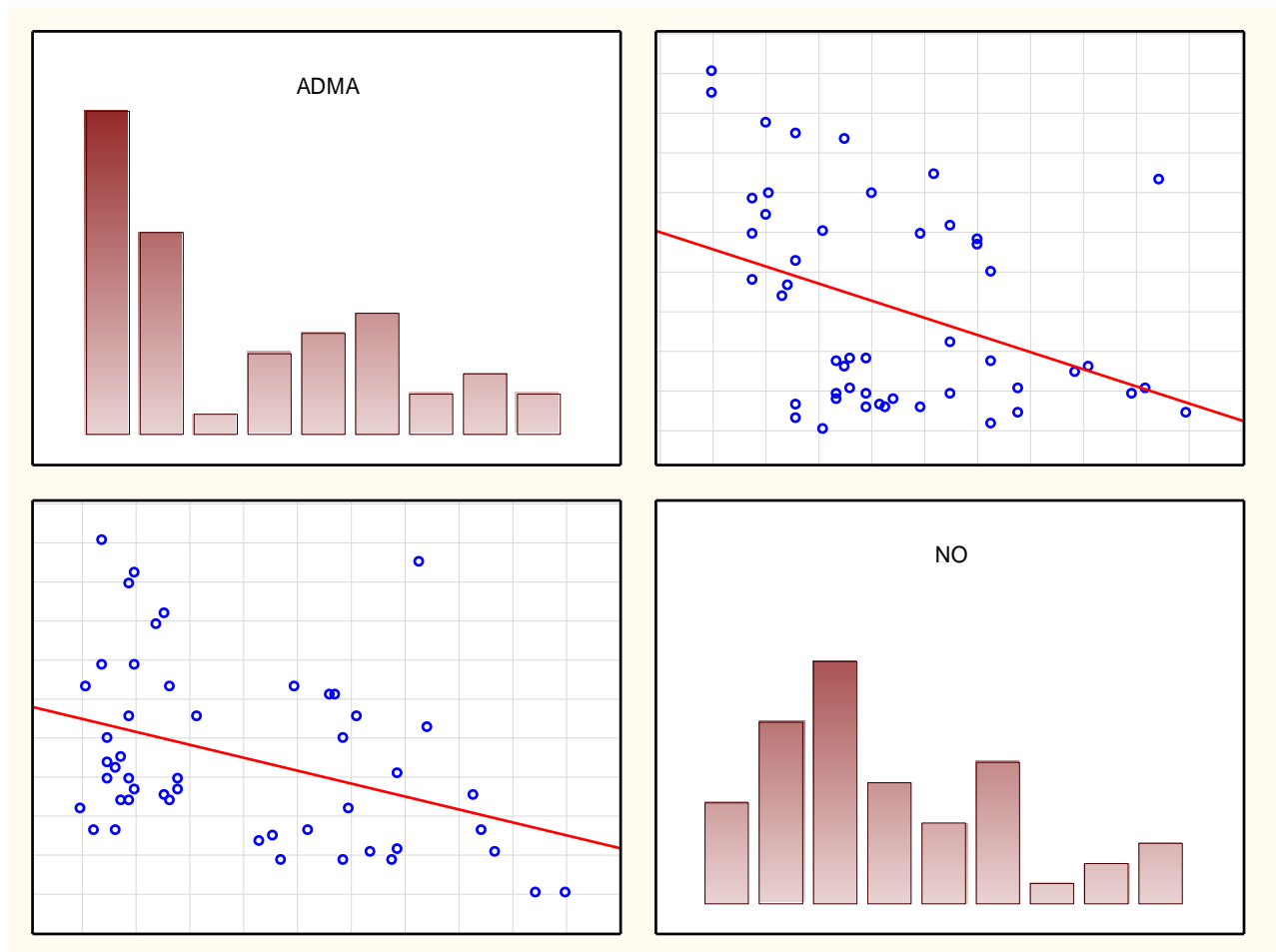


Рисунок 7 - Корреляция уровней АДМА и NO в основной группе

При детализации результатов было установлено, что значения плазменной концентрации АДМА выше 0,50 мкмоль/л чаще встречались в группе исследования по сравнению с группой контроля (30,6% vs 25,0%

соответственно). Кроме того, наличие МС оказалось фактором, влияющим на концентрацию данного метаболита: более высокие уровни АДМА ($> 0,5$ мкмоль/л) отмечались в группе пациентов с МС, по сравнению с пациентами, у которых данная патология отсутствовала (36,4% vs 25,9% соответственно). Данные различия касались только группы исследования.

В соответствии с патофизиологическим механизмом действия АДМА, являющегося эндогенным ингибитором NO, нами было исследовано соотношение АДМА/NO. Полученные коэффициенты статистически различались между группами ($p = 0,045$), составив 0,02 [0,01; 0,05] у пациентов со стенозами ВСА и 0,01 [0,008; 0,02] – в контрольной группе.

Особый интерес представляют обнаруженные статистически значимые различия в концентрации АДМА у пациентов в зависимости от наличия или отсутствия когнитивной дисфункции. Так, у пациентов, которые набирали при тестировании по MoCA 28 и более баллов, уровень АДМА был ниже, чем у пациентов с меньшими результатами (0,18 vs. 0,41 мкмоль/л соответственно, $p = 0,044$).

3.3.2 Оценка показателей фибринолитического звена системы гемостаза

В качестве маркерных молекул системы фибринолиза в настоящем исследовании определялась активность тканевого активатора плазминогена (t-РА) – соединения, способствующего превращению плазминогена в плазмин и, таким образом, обладающего антитромбогенными свойствами, а также фермента с противоположными, антифибринолитическими свойствами — ингибитора тканевого активатора плазминогена–1 (РАI-1). Концентрация обоих показателей статистически различалась между основной и контрольной группами ($p = 0,006$ и $p = 0,002$ соответственно, при применении теста Манна-Уитни), причем медиана t-РА составила 1,95 нг/мл в основной группе и 2,45 нг/мл в группе контроля, в то время как для РАI-1 эти показатели равнялись 5,10 и 2,87 Ед/мл соответственно (Таблица 8).

**Состояние фибринолитического звена системы гемостаза у пациентов
основной и контрольной групп**

<i>Показатель</i>	Основная группа (n = 117)	Контрольная группа (n = 105)	Значение p
t-PA (нг/мл)	1,95 [1,67; 2,74]	2,45 [2,0; 3,16]	0,006
РАI-1 (Ед/мл)	5,1 [2,5; 6,15]	2,87 [2,48; 3,92]	0,002

Обращает на себя внимание более высокая активность фибринолитической системы у пациентов без признаков атеросклеротического поражения БЦА и смещение равновесия в сторону протромботического состояния крови у пациентов со стенозирующей патологией в системе ВСА.

Показательны также однонаправленные изменения уровня тканевого активатора плазминогена (t-PA) и NO, корреляция между которыми является статистически достоверной, причем высокой степени ($R = 0,71$) (Рисунок 8). В группе контроля данные показатели не коррелируют друг с другом. Учитывая, что t-PA - один из важных элементов антитромбогенной активности эндотелия, наличие такой сильной положительной взаимосвязи у пациентов с атеросклерозом в системе ВСА свидетельствует, скорее всего, о включении адаптационных и компенсаторных механизмов. Отсутствие таких изменений в группе контроля говорит об отсутствии или лишь начальных проявлениях эндотелиальной дисфункции.

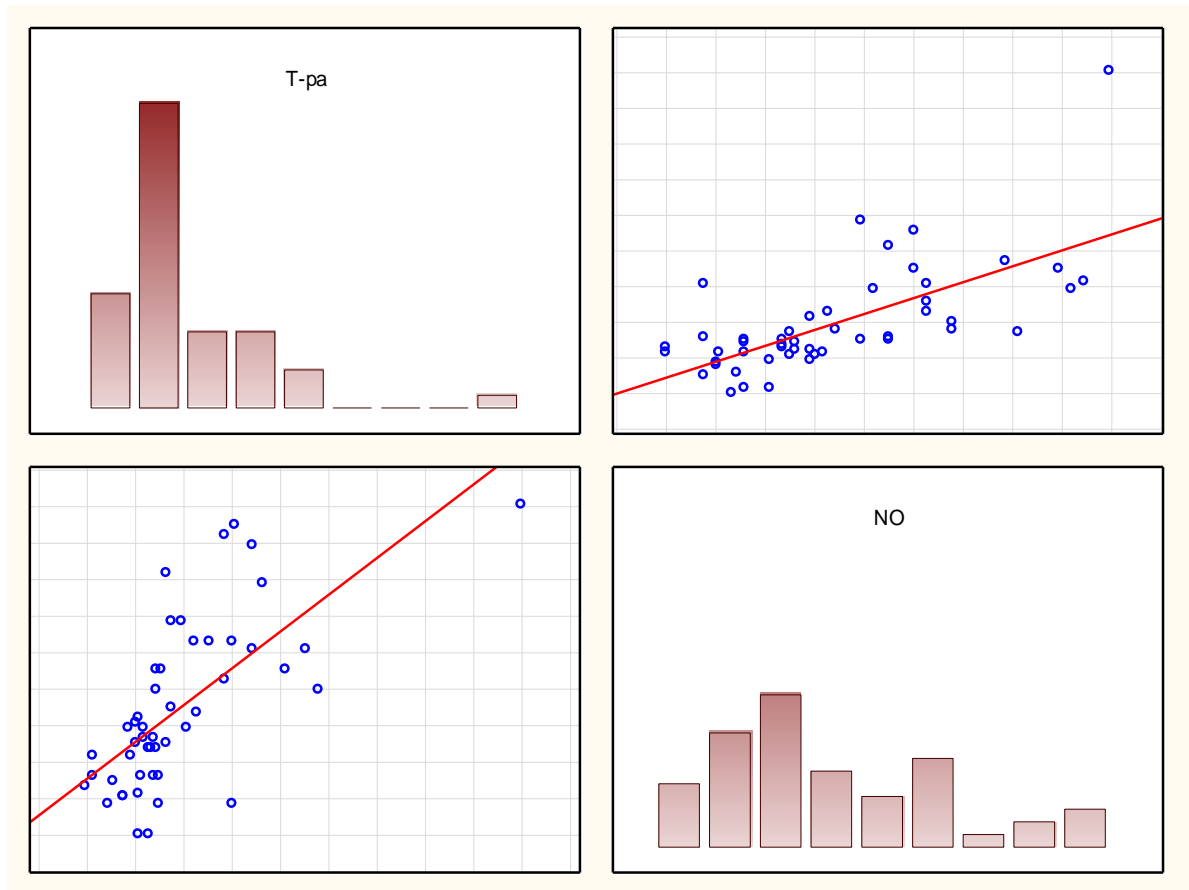


Рисунок 8 – Корреляция уровней t-РА и NO в основной группе

Статистически значимых отличий в содержании данных маркеров в крови в зависимости от пола получено не было ($p = 0,21$ для t-РА и $p = 0,57$ для PAI-1), однако у лиц мужского пола выявлена обратная зависимость содержания PAI-1 от активности NO ($R = - 0,33$). В женской популяции такой корреляции не прослеживалось, что может косвенно подтверждать выявленную ранее в многочисленных исследованиях протективную роль гормонального фона в отношении развития и прогрессирования атеросклеротического процесса.

Связи активности показателей системы фибринолиза и возраста пациентов, включенных в исследование, также не выявлялось ($R = - 0,07$ для t-РА и $R = 0,05$ для PAI-1), что может свидетельствовать в пользу возраст-независимого формирования тромбогенного потенциала крови у пациентов с цереброваскулярной патологией.

3.3.3 Оценка содержания адипонектина в исследуемых группах

Выбор адипонектина в качестве маркерной молекулы (адипокин) в настоящем исследовании был обусловлен многочисленными данными о его антиатерогенной (ангипротективной) роли в отношении развития атеросклероза и глобальных сосудистых осложнений. Отмечена и тесная связь указанного гормона жировой ткани с нарушениями углеводного обмена, в частности, входящих в структуру МС. В исследуемых группах пациентов найдены статистически значимые отличия в содержании адипонектина ($p = 0,0002$), причем повышение уровня этого показателя характерно именно для пациентов без патологии сонных артерий. Так, концентрация адипонектина в основной группе составила 9,46 [4,7; 14,0], а в группе контроля – 15,73 [8,6; 19,7] мкг/мл (Рисунок 9).

При анализе всего массива данных обращает на себя внимание тот факт, что концентрация адипонектина преимущественно повышена у женщин ($p = 0,000015$), причем такое соотношение между пациентами обоих полов сохраняется и при рассмотрении отдельно основной ($p = 0,0016$) и контрольной ($p = 0,008$) групп. В отношении возраста пациентов необходимо отметить, что корреляционный анализ не показал достоверной взаимосвязи ($R = - 0,12$).

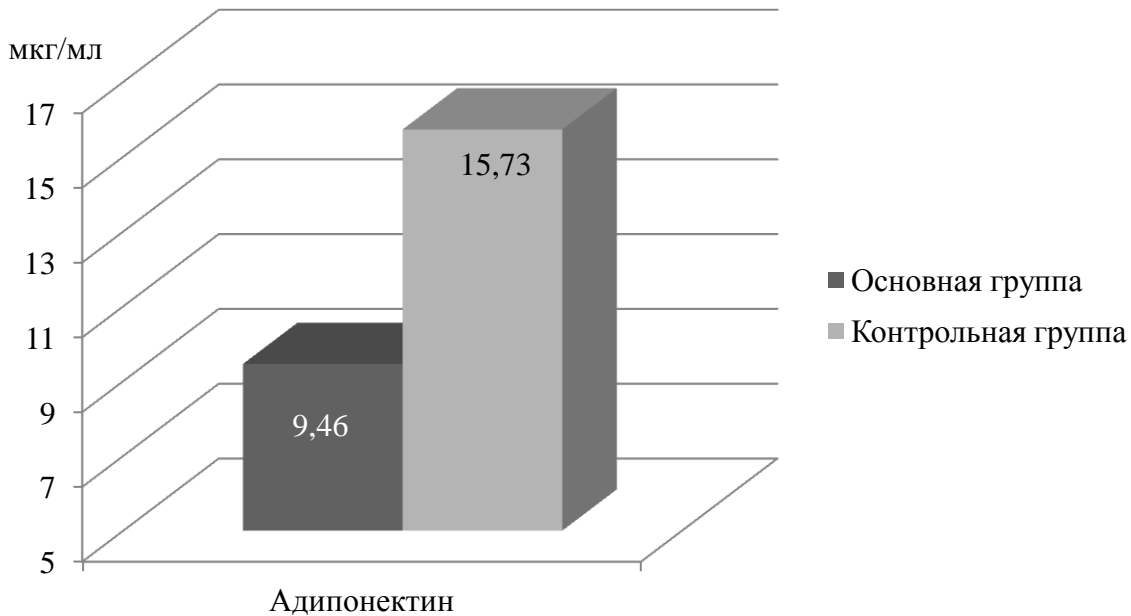


Рисунок 9 – Плазменные уровни адипонектина у обследованных

В группе контроля выявлена достоверная корреляция между концентрацией адипонектина и уровнем t-PA ($R = 0,59$, $p < 0,05$), что может отражать единообразную активность различных компонент антиатерогенной системы организма (Рисунок 10). Отсутствие такой корреляции ($R = - 0,08$, $p < 0,05$) в группе пациентов с атеросклерозом брахиоцефальных артерий говорит о серьезном дисбалансе этих структур.

Выявлена также взаимосвязь уровней адипонектина с показателями липидного спектра у пациентов в основной группе. Так, повышение концентрации адипонектина ассоциировано с повышением фракции холестерина липопротеидов высокой плотности ($R = 0,58$, $p < 0,05$), а также со снижением уровня триглицеридов ($R = - 0,41$, $p < 0,05$). Указанные результаты свидетельствуют о более благоприятном состоянии жирового обмена у пациентов с нормальными уровнями адипонектина, в то время как снижение плазменной концентрации последнего играет, по-видимому, проатерогенную роль и обладает, в том числе, многокомпонентными эффектами на тромбогенный потенциал крови, сосудистой стенки и функцию эндотелия.

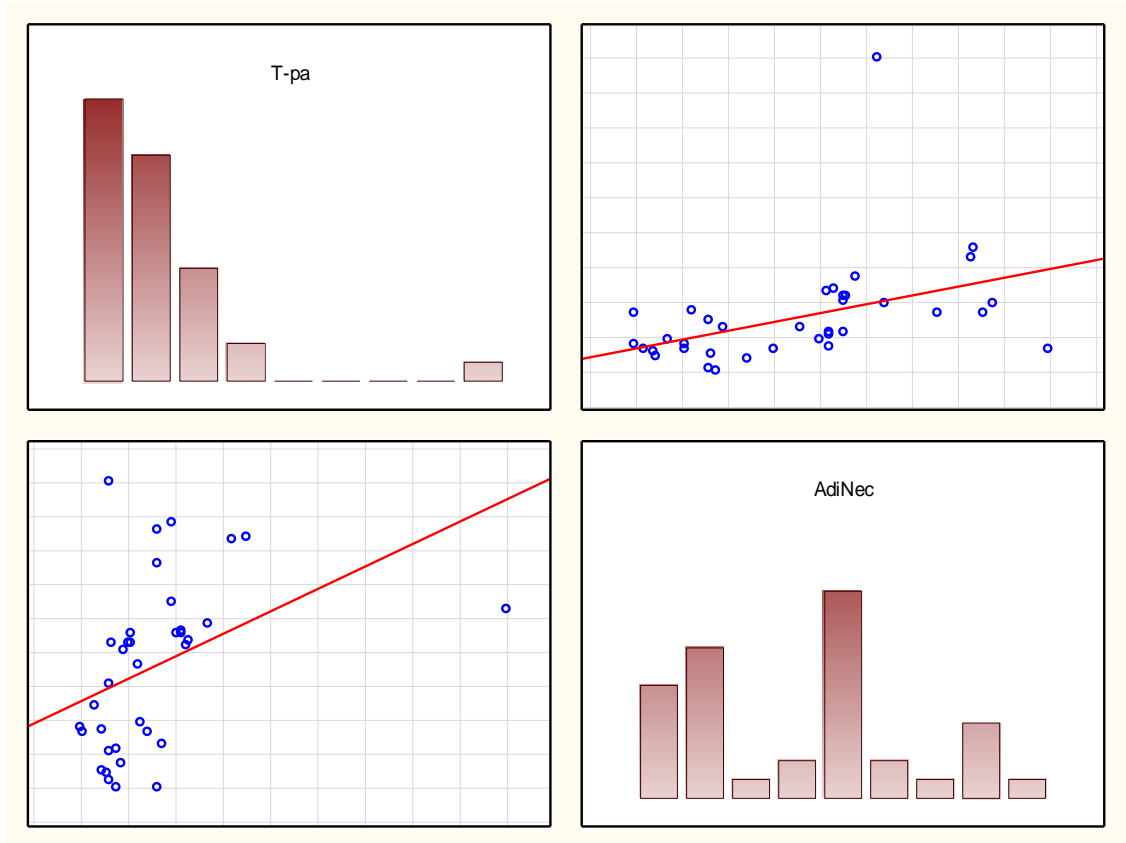


Рисунок 10 – Корреляция уровней адипонектина и t-РА в контрольной группе

3.4 Генетические альтерации в генах, ответственных за различные звенья атерогенеза

3.4.1 Однонуклеотидные полиморфизмы в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR)

Клиническое значение, как это было показано ранее, имеют два однонуклеотидных полиморфизма (SNP) в гене MTHFR – замена цитозина на тимин в 677-м положении (C677T) и замена аденина на цитозин в 1298-м положении (A1298C). В многочисленных работах показано достоверное повышение уровня гомоцистеина у пациентов с наличием данных

однонуклеотидных полиморфизмов, причем это повышение более выражено при гомозиготном варианте «мутантного» гена.

В настоящем исследовании данные однонуклеотидные замены были выбраны в составе общей линейки SNP с целью оценки генетической «отягощенности» пациентов с каротидным атеросклерозом. Частота встречаемости различных вариантов генотипов представлена в таблице 9.

Таблица 9

Распределение вариантов генотипа МТНFR в исследуемых группах

Генотип	МТНFR С677Т			МТНFR А1298С		
	<i>С/С</i>	<i>С/Т</i>	<i>Т/Т</i>	<i>А/А</i>	<i>А/С</i>	<i>С/С</i>
Группа исследования	50,3%	41,8%	7,9%	41,2%**	49,0%*	9,8%
Группа контроля	50,0%	38,9%	11,1%	58,3%**	34,7%*	7,0%

* статистически достоверные различия ($p=0,0441$)

** статистически достоверные различия ($p=0,0165$)

Как видно из таблицы, распространенность вариантов однонуклеотидных полиморфизмов С677Т в гене МТНFR сопоставима в исследованных группах пациентов. Различия, в основном, касаются замены А1298С: так, гетерозиготная (А/С) и гомозиготная мутантная (С/С) формы встречались чаще в группе пациентов с атеросклерозом по сравнению с группой контроля (49,0% и 9,8% vs. 34,7% и 7,0% соответственно).

При анализе частоты указанных вариантов генотипа МТНFR в зависимости от пола выявлено следующее: у мужчин чаще, чем у женщин встречались гетерозиготные варианты С677Т (43% vs. 37% соответственно) и А1298С (47% vs. 40% соответственно). При этом у мужчин в группе исследования намного чаще, чем в группе контроля, встречался гетерозиготный вариант А1298С (51,4% vs. 32,3% соответственно). Данное

наблюдение может свидетельствовать о возможности более значимой роли данного полиморфизма в сердечно-сосудистой патологии, проявляющейся преимущественно у лиц мужского пола (Raskurazhev A.A., 2015a).

3.4.2 Однонуклеотидный полиморфизм в гене параоксоназы-1 (PON-1)

Мутация в гене параоксоназы-1, приводящая к замене в продукте гена аминокислоты глутамин (Gln) в 192-м положении на аргинин (Arg), описана во многих работах, связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями и, в частности, с инсультом и атеросклеротическим поражением брахиоцефальных артерий. Параоксоназа позиционируется многими исследователями как антиатерогенный агент, мутация (Gln192Arg) в котором ведет к снижению активности этого фермента, создавая потенциал для развития сосудистой патологии. В связи с этим в качестве объекта исследования представляла интерес именно субпопуляция пациентов с асимптомными формами атеросклероза магистральных артерий головы, поскольку ранее уже были выявлены определенные корреляции наличия указанной мутации и развитием ишемического инсульта.

В нашей работе мы не получили убедительных данных за наличие достоверных различий в частоте встречаемости полиморфизма Gln192Arg в гене PON-1 (Таблица 10).

Таблица 10

Распределение вариантов генотипа PON-1 в исследуемых группах

Фенотип	PON-1		
	<i>Gln192Gln</i>	<i>Gln192Arg</i>	<i>Arg192Arg</i>
Основная группа	54,9%	40,5%	4,6%
Контрольная группа	52,8%	41,7%	5,5%

Таким образом, эпидемиологическая картина различных вариантов гена PON-1 сопоставима в группе пациентов с асимптомным атеросклерозом и группе контроля. Указанный факт может свидетельствовать о роли полиморфизмов гена PON-1 не столько в инициации и прогрессировании атеросклероза, сколько в формировании нестабильной атеросклеротической бляшки и развитии ишемических нарушений мозгового кровообращения. Достоверных различий распространенности того или иного фенотипа по PON-1 в зависимости от пола также выявлено не было.

3.4.3 Однонуклеотидный полиморфизм в гене Р-селектина (*SELP*)

Р-селектин представляет собой рецептор клеточной адгезии, который преимущественно экспрессируется на поверхности тромбоцитов и, реже - клеток эндотелия, и играет важную роль на ранних этапах атерогенеза.

Исследование SNP в гене Р-селектина выявило более высокую встречаемость гетерозиготных вариантов полиморфизма в гене SELP в группе контроля, по сравнению с основной группой (Таблица 11).

Таблица 11

Распределение вариантов генотипа SELP в исследуемых группах

Фенотип	SELP		
	<i>Thr715Thr</i>	<i>Thr715Pro</i>	<i>Pro715Pro</i>
Основная группа	77,1%	21,5%*	1,4%
Контрольная группа	70,8%	27,8%*	1,4%

* $p = 0,3059$

Данные различия не достигают степени статистической достоверности, однако видна тенденция к большей распространенности исследованного SNP в группе контроля, что косвенно подтверждает вышеупомянутый тезис об определенной антиатерогенной (ангиопротективной) роли указанного феномена.

При рассмотрении распределения гетерозиготных вариантов гена растворимого селектина в зависимости от пола отмечается несколько более частое выявление его у женщин, причем данное различие сохраняется как в группе исследования (24% vs. 20%), так и в группе контроля (29% vs. 20%), однако статистической достоверности данные различия не достигают ($p = 0,604$ и $0,618$ соответственно).

3.4.4 Однонуклеотидные полиморфизмы в генах PAI-1, альфа-1-антитрипсина (SERPINA-1) и аквапорина-9 (AQP-9)

Полиморфизм гена PAI-1, заключающийся в делеции/инсерции остатка гуанидина в -675-м положении (4G/5G), как было показано ранее, достаточно широко распространен в популяции. По данным различных авторов этот SNP ассоциирован как с возможными протективными свойствами в отношении сосудистой патологии (Hoekstra T. et al., 2003), так и, по мнению других, с отрицательной ролью в отношении, в первую очередь, атеросклеротического компонента (Bang C. et al., 2001).

Из представленной ниже таблицы (Таблица 12) видно, что распространенность гетерозигот статистически выше в основной группе (56,3% vs. 31,9%), в то время как в группе контроля преобладают гомозиготы, содержащие мутантный аллель 4G (40,3% vs. 27,3%). Также в контрольной группе несколько выше, по сравнению с группой исследования, частота гомозигот «дикого» типа (27,8% vs. 16,4%).

Таблица 12

Распределение вариантов генотипа PAI-1 в исследуемых группах

Генотип	PAI-1		
	5G/5G	5G/4G	4G/4G
Основная группа	16,4%	56,3%*	27,3%**
Контрольная группа	27,8%	31,9%*	40,3%**

* $p = 0,0005$

** $p = 0,05$

Распределение генотипов в зависимости от пола пациентов следующее:

Таблица 13

**Распределение вариантов генотипа PAI-1 в зависимости от пола
пациентов в исследуемых подгруппах**

Генотип	PAI-1					
	5G/5G		5G/4G		4G/4G	
Пол	Муж	Жен	Муж	Жен	Муж	Жен
Основная группа	9,7%* [^]	25,0% [^]	67,7%*** ^{^^}	41,7% ^{^^}	22,6%	33,3%
Контрольная группа	32,2%*	24,4%	38,7%**	26,8%	29,1% [†]	48,8% [†]

*p = 0,0045, **p = 0,0032, [^] p = 0,0371, ^{^^} p = 0,0074, [†] p = 0,0383

Как видно из таблицы 13, как между, так и внутри групп существуют достаточно существенные различия в частоте исследуемого аллеля у мужчин и женщин. Так, «дикий» вариант генотипа (5G/5G) встречался лишь у 9,7% мужчин в основной группе, в то время как в группе контроля – у одной трети исследованных лиц мужского пола (33,2%). Достаточно интересно отметить преобладание среди носителей мутантного аллеля в гомозиготной форме (4G/4G) лиц женского пола – причем в группе контроля этот генотип встречается у каждой второй женщины (48,8%). Среди носителей гетерозиготного варианта (5G/4G) следует обратить внимание на более частую выявляемость его у мужчин, как в основной (67,7% vs 41,7%), так и в контрольной группе (38,7% vs 26,8%).

При статистическом анализе распространенности данной мутации с применением метода хи-квадрат (χ^2) для общей модели наследования отмечено, что отношение шансов (odds ratio [OR]) составило 2,75 (95% доверительный интервал [ДИ]: 1,33 – 5,70) для гетерозигот (5G/4G) (Таблица 14). Данная модель применима, поскольку для одной из групп

(группа контроля) не выполнялось равновесие Харди-Вайнберга (уровень значимости $p = 0.003$).

Таблица 14

Общая модель наследования SNP (5G/4G) гена PAI-1

Генотипы	Случаи	Контроли	χ^2	p	OR	
					знач.	95% ДИ
Генотип 5G/5G	0.164	0.278	7.67	0.02	0.51	0.21 – 1.23
Генотип 5G/4G	0.563	0.319			2.75	1.33 – 5.70
Генотип 4G/4G	0.273	0.403			0.56	0.26 – 1.19

Встречаемость полиморфизмов в генах SERPINA-1 и AQP9 была намного ниже, чем остальных SNP. Всего было выявлено 6 случаев носительства мутации G1096A гена SERPINA-1, из которых 4 были выявлены в группе исследования (из них в одном случае отмечался гомозиготный вариант A/A), а остальные два гетерозиготных варианта (G/A) – в группе контроля. Мутаций G435C в гене аквапорина-9 было выявлено восемь: пять – в группе исследования, 3 – в группе контроля (все были представлены гетерозиготными вариантами [G/C]). Достаточно редкая встречаемость данных полиморфизмов ограничивает возможности для статистической их обработки, однако следует отметить все-таки более высокую мутантную отягощенность именно в группе исследования, а также наличие там очень редкой, гомозиготной, формы полиморфизма гена SERPINA-1.

Интересным представлялось изучение возможных корреляций между вариантами однонуклеотидных полиморфизмов и содержанием исследуемых биомаркеров атерогенеза. Так, у пациентов с гомозиготными мутациями в гене PAI-1 (4G/4G) выявлено достоверное повышение уровня ADMA по сравнению с пациентами с гетерозиготными мутациями (5G/4G) в группе исследования ($p = 0,017$). Стоит отметить, что статистически значимых различий в уровнях продукта гена – плазменной концентрации

PAI-1 – в зависимости от генотипа выявлено не было. В группе пациентов с гомозиготной мутацией в гене PON-1 отмечено значимое снижение концентрации NO по сравнению с «диким» вариантом ($p = 0,022$).

Распространенность исследуемых полиморфизмов в различных вариантах («дикий» тип, гетерозиготный, гомозиготный мутантный), а также частота встречаемости мутантных аллелей в группе исследования и группе контроля показана на рисунках 11 - 14.

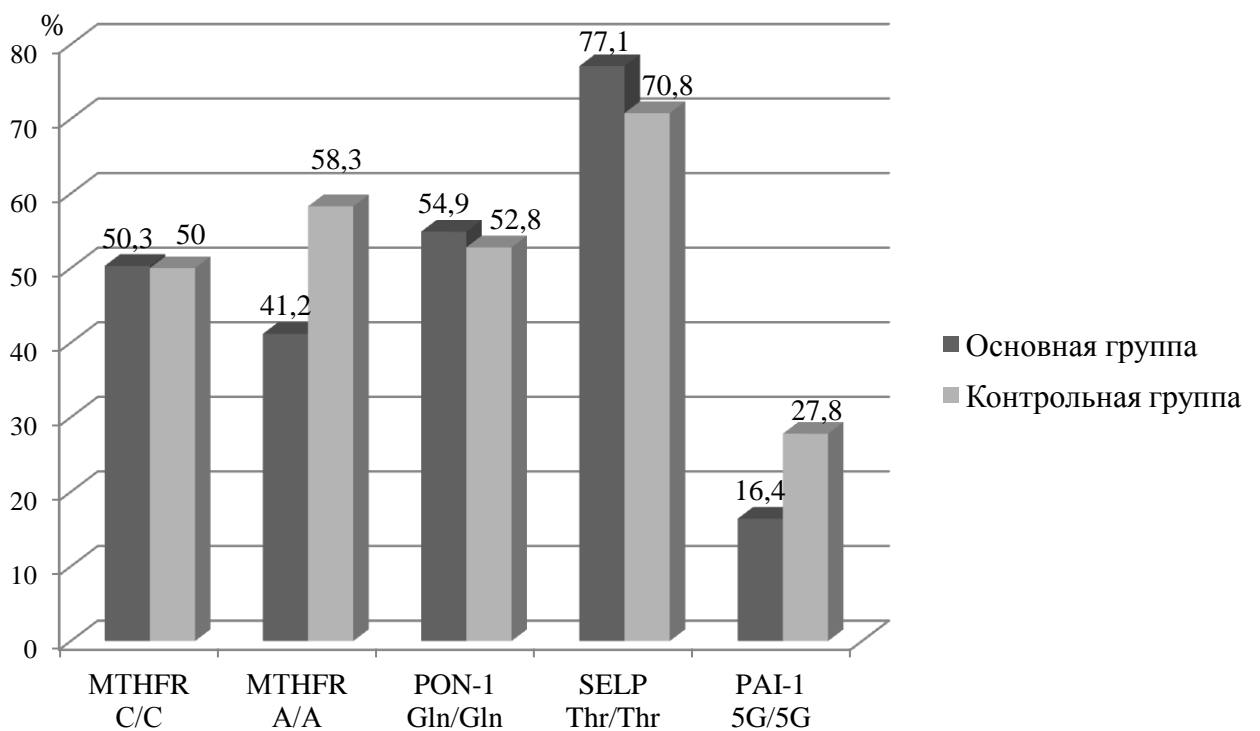


Рисунок 11 – Встречаемость «дикого» генотипа у обследованных

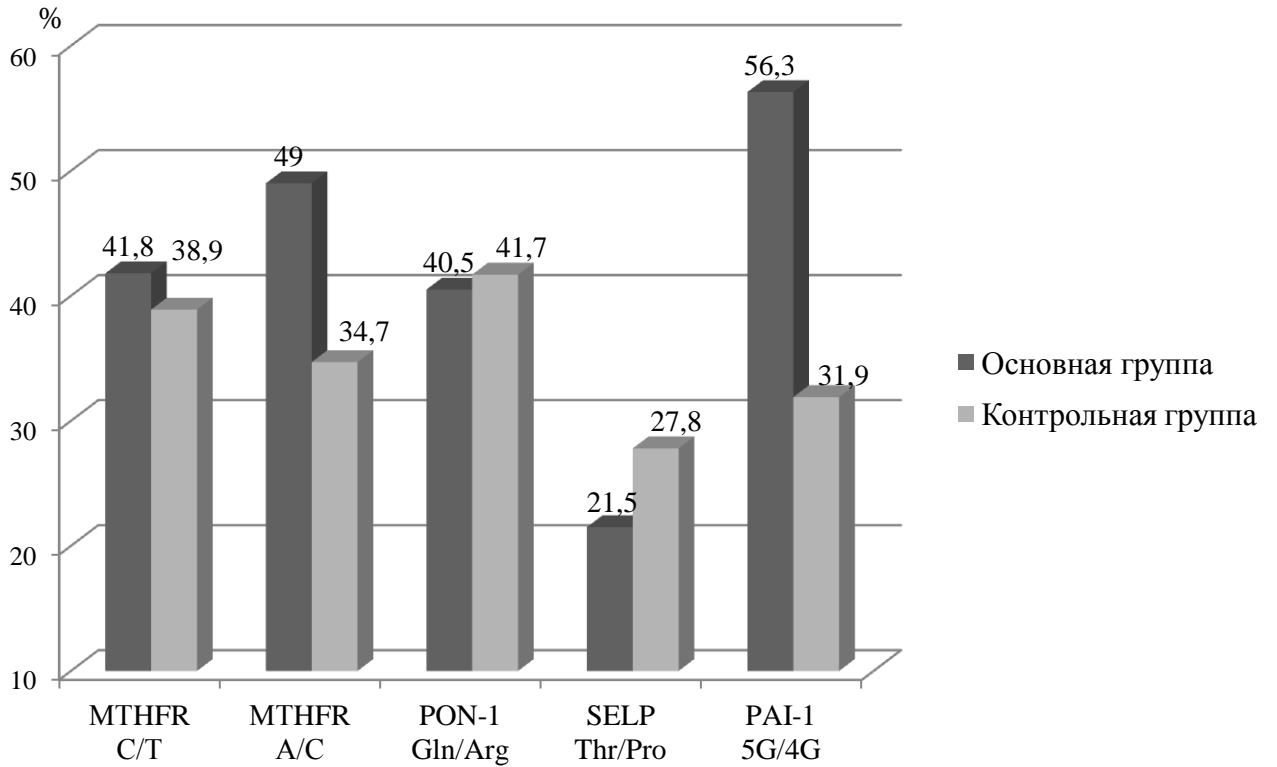


Рисунок 12 – Встречаемость гетерозиготного варианта у обследованных

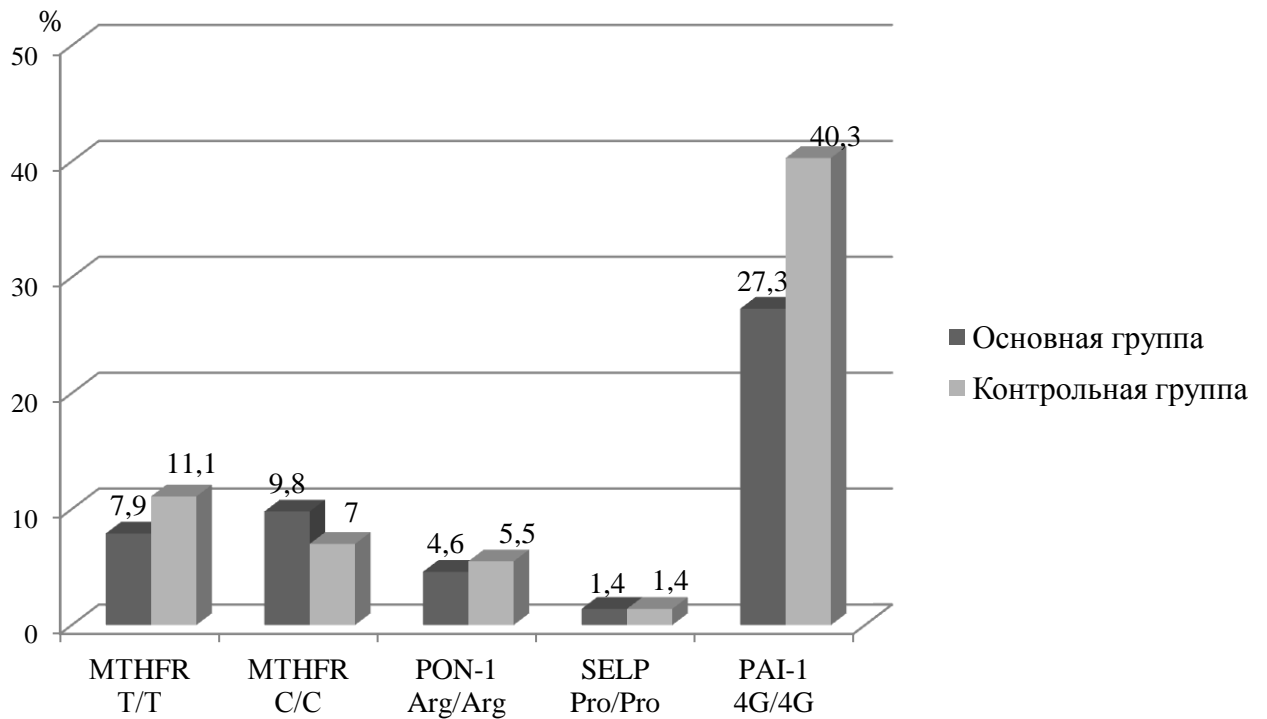
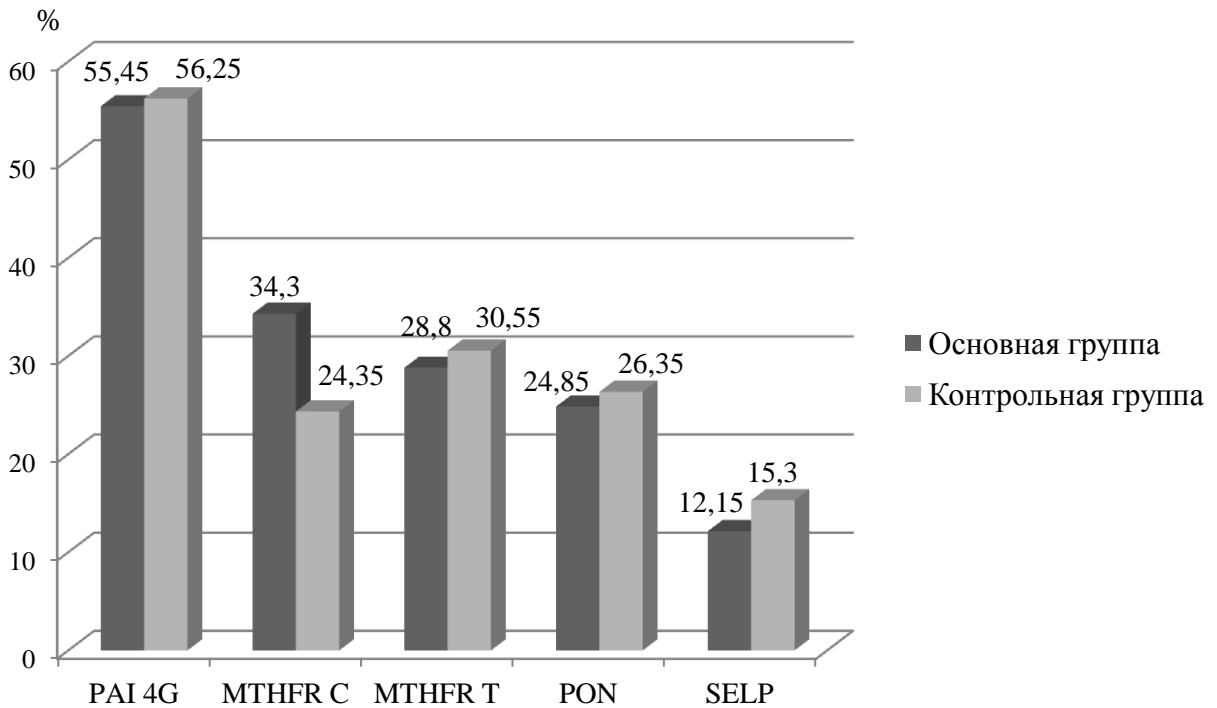


Рисунок 13 – Встречаемость гомозиготного мутантного варианта у обследованных



**Рисунок 14 – Встречаемость мутантных аллелей
в исследованных группах**

3.4.5 Ассоциации генетических альтераций в исследованных генах

Учитывая многофакторность и полиэтиологичность атеросклероза, а также маловероятный моногенный характер данной патологии, нами была предпринята попытка поиска определенных генетических ассоциаций в исследованных популяциях пациентов. Взаимовлияние нескольких однонуклеотидных полиморфизмов оценивалось как по совместному носительству нескольких значимых мутаций, так и по ассоциации нескольких мутантных аллелей исследуемых генов.

Таблица 15

Частота сочетания двух гомозиготных мутаций в основной группе

	PAI 4G/4G	SELP	C677T MTHFR	A1298C
PON	1,8%	0%	1,8%	0%
SELP	0%	-	0%	0%
MTHFR C677T	3,6%	0%	-	0%
MTHFR A1298C	3,6%	0%	0%	-

Таблица 16

Частота сочетания двух гомозиготных мутаций
в контрольной группе

	PAI-1 4G/4G	SELP Pro/Pro	MTHFR T677T	MTHFR C1298C
PON Gln/Gln	2,8%	0%	0%	1,4%
SELP Pro/Pro	0%	-	0%	1,4%
MTHFR T677T	8,3%	0%	-	0%
MTHFR C1298C	1,4%	1,4%	0%	-

Из таблиц 15 и 16 видно, что несколько чаще сочетаются гомозиготные мутации в группе контроля, однако больше это касается SNP, которые изначально чаще встречались в группе пациентов без каротидного атеросклероза: PAI-1 4G/4G и SELP Pro/Pro. Несмотря на это, степени статистической значимости данные различия не достигают. Обращает на себя внимание наличие почти у каждого десятого пациента к группе контроля ассоциации двух гомозиготных мутаций – в гене PAI-1 (4G/4G) и гене MTHFR (T677T). Интересным представляется факт отсутствия случая сочетания двух значимых гомозиготных мутаций в гене MTHFR: C677T и A1298C.

Далее был проведен анализ сочетания двух мутантных аллелей в группе исследования и группе контроля. Полученные частоты сведены в таблицах 17 и 18.

Таблица 17

Ассоциации двух мутантных аллелей в основной группе

	PAI-1 4G	SELP Pro	MTHFR 677T	MTHFR 1298C
PON Gln	30,9%	12,4%	22,9%	26,8%
SELP Pro	25,4%	-	13,7%	11,7%
MTHFR 677T	50,9%	13,7%	-	22,2%
MTHFR 1298C	49,1%	11,7%	22,2%	-

Таблица 18

Ассоциации двух мутантных аллелей в контрольной группе

	PAI-1 4G	SELP Pro	MTHFR 677T	MTHFR 1298C
PON Gln	34,7%	11,1%	26,4%	19,4%
SELP Pro	22,2%	-	16,7%	11,1%
MTHFR 677T	38,9%	16,7%	-	16,7%
MTHFR 1298C	26,4%	11,1%	16,7%	-

В группе исследования отмечена более высокая частота ассоциации носительства мутантного аллеля 4G гена PAI-1 и одного из мутантных аллелей двух значимых SNP гена МТГФР (677Т или 1298С): 50,9% и 49,1% в группе исследования и 38,9% и 26,4% в группе контроля соответственно (Рисунок 15). Ассоциации мутантного аллеля гена SELP с мутантными аллелями генов МТНФР (Т и С) и PAI-1 были сопоставимо распределены между группами (13,7%, 11,7% и 25,4% в группе пациентов с

атеросклерозом vs. 16,7%, 11,1% и 22,2% в группе контроля). Совместное носительство значимых мутаций в гене MTHFR встречалось менее чем у четверти пациентов с «асимптомным» атеросклерозом (22,2%) и у каждого шестого пациента без атеросклероза (16,7%).

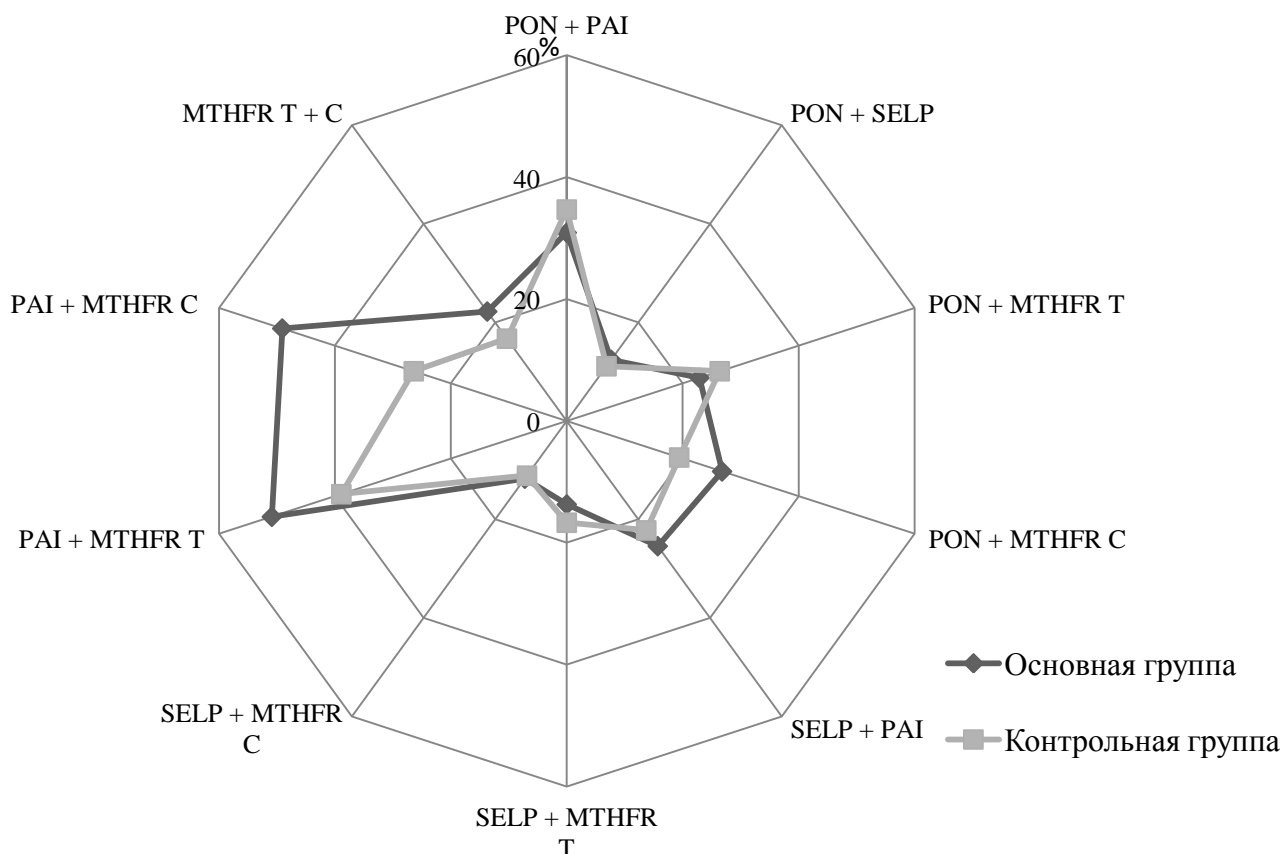


Рисунок 15 - Встречаемость ассоциаций двух мутантных аллелей у обследованных

При анализе ассоциаций трех мутантных аллелей выявлено преобладание в основной группе сочетания SNP (как гетерозиготных, так и гомозиготных вариантов) в генах MTHFR (аллели 677Т и 1298С) и PAI-1 (аллель 4G) – оно встречалось в 25,4% случаев, по сравнению с 11,1% случаев в группе контроля ($p = 0,0347$).

Суммируя вышесказанное и в соответствии с полученными данными, можно разделить влияния генетических полиморфизмов на потенциально проатерогенные и антиатерогенные (ангиопротективные) (Рисунки 16 и 17).

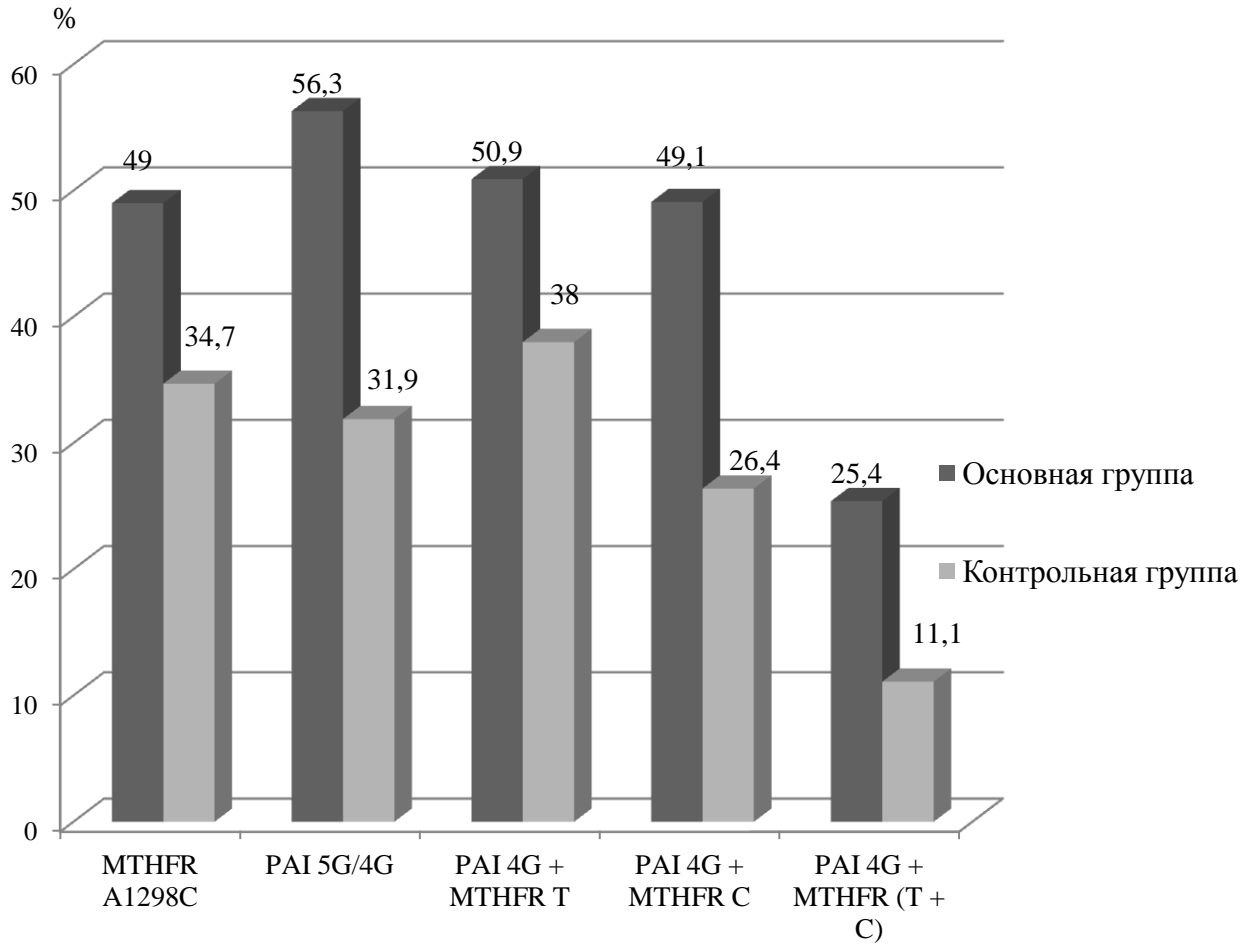


Рисунок 16 – Распределение потенциально проатерогенных однонуклеотидных полиморфизмов и ассоциаций у обследованных

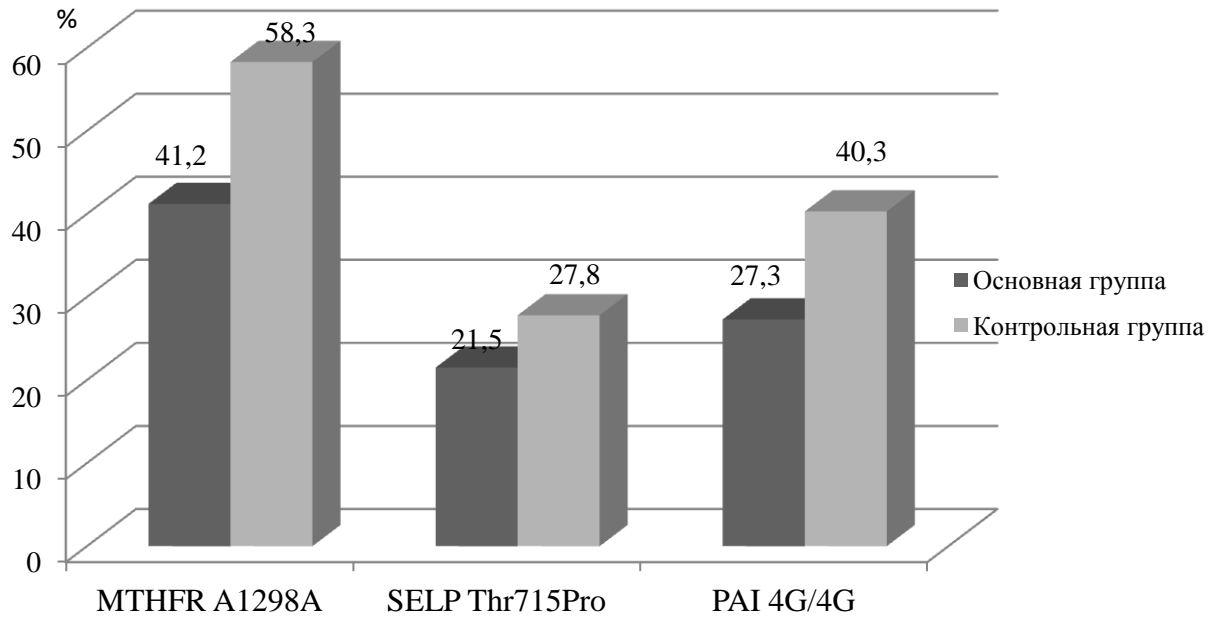


Рисунок 17 – Распределение потенциально *антиатерогенных* однонуклеотидных полиморфизмов у обследованных

Наибольшей значимостью в отношении проатерогенных факторов обладает наличие гетерозиготной формы 5G/4G гена PAI-1, а также ассоциация мутантного аллеля (4G) этого гена с мутацией в гене MTHFR (A1298C) – указанные изменения встречались у 56,3% и 49,1% пациентов с атеросклерозом БЦА по сравнению с 31,9% и 26,4% пациентов в группе контроля соответственно. Отсутствие мутации A1298C в гене MTHFR было выявлено почти у 60% пациентов в группе контроля (по сравнению с 41,2% пациентов в группе исследования), что позволяет рассматривать генотип A1298A гена MTHFR как ангиопротективный. В то же время неожиданным оказалось более частое выявление гомозиготных мутаций 4G/4G гена PAI-1 в группе пациентов без атеросклероза (40,3% по сравнению с 27,3% в группе с «асимптомными» стенозами ВСА). Данное наблюдение указывает на противоречивую роль этого гена в отношении развития и прогрессирования атеросклероза.

3.5 Ассоциации биомаркеров атерогенеза

Учитывая многофакторную природу атеросклероза, нами был проведен анализ биомаркерной «отягощенности» пациентов с «асимптомными» стенозами БЦА. С этой целью были определены референтные значения исследуемых параметров, и уровень того или иного биомаркера нами оценивался по отношению к группе контроля (Таблица 19).

Таблица 19

Модель оценки биомаркеров атерогенеза

Биомаркер	Референтное значение	Направление	Балл
<i>t-PA*</i>	2,45 нг/мл	<i>Повышение</i>	0
		<i>Снижение</i>	1
<i>PAI-1†</i>	2,87 Ед/мл	<i>Повышение</i>	1
		<i>Снижение</i>	0
<i>Адипонектин*</i>	15,73 мкг/мл	<i>Повышение</i>	0
		<i>Снижение</i>	1
<i>ADMA†</i>	0,5 мкмоль/л	<i>Повышение</i>	1
		<i>Снижение</i>	0
<i>Нитрат†</i>	45 мкмоль/л	<i>Повышение</i>	1
		<i>Снижение</i>	0
<i>Нитрит†</i>	19,2 мкмоль/л	<i>Повышение</i>	1
		<i>Снижение</i>	0
<i>NO*</i>	25,8 мкмоль/л	<i>Повышение</i>	0
		<i>Снижение</i>	1

* - потенциально антиатерогенные (ангиопротективные) биомаркеры

† - потенциально проатерогенные биомаркеры

Все маркеры в соответствии с их патофизиологической ролью и выявленными изменениями в настоящем исследовании были условно разделены на проатерогенные и антиатерогенные (ангиопротективные). Референтные уровни практически для всех биомаркеров были выбраны, исходя из средних значений последних в группе контроля. Указанная модель была применена в анализе и сравнении пациентов в группе исследования с пациентами без атеросклероза БЦА. Оказалось, что медиана среднего значения балла по приведенной шкале у пациентов с «асимптомными» стенозами ВСА составила 5 [4; 6], в то время как в группе контроля он был намного ниже – 3 [2;3,5] ($p < 0,000001$). Распространенность каждой категории в исследованных группах пациентов сведена в таблице 20.

Таблица 20

Анализ распределения балльных оценок биомаркерной шкалы в зависимости от группы

Балл	Основная группа (%)	Контрольная группа (%)
1	-	13,9
2	2	25,1
3	12,2	36
4	26,5	8,3
5	32,6	11,1
6	16,3	2,8
7	10,4	2,8

Из указанной таблицы видна тенденция к более «благоприятному» биомаркерному профилю в группе пациентов без атеросклероза БЦА – так, у более 75% пациентов в этой группе имеются изменения не более 3-х биомаркеров. В то же время, проатерогенный сдвиг отмечен у пациентов в

группе исследования с вовлечением 4-х и более биомаркеров в 85,8% случаев. С целью наглядности эти данные отображены на рисунке 18.

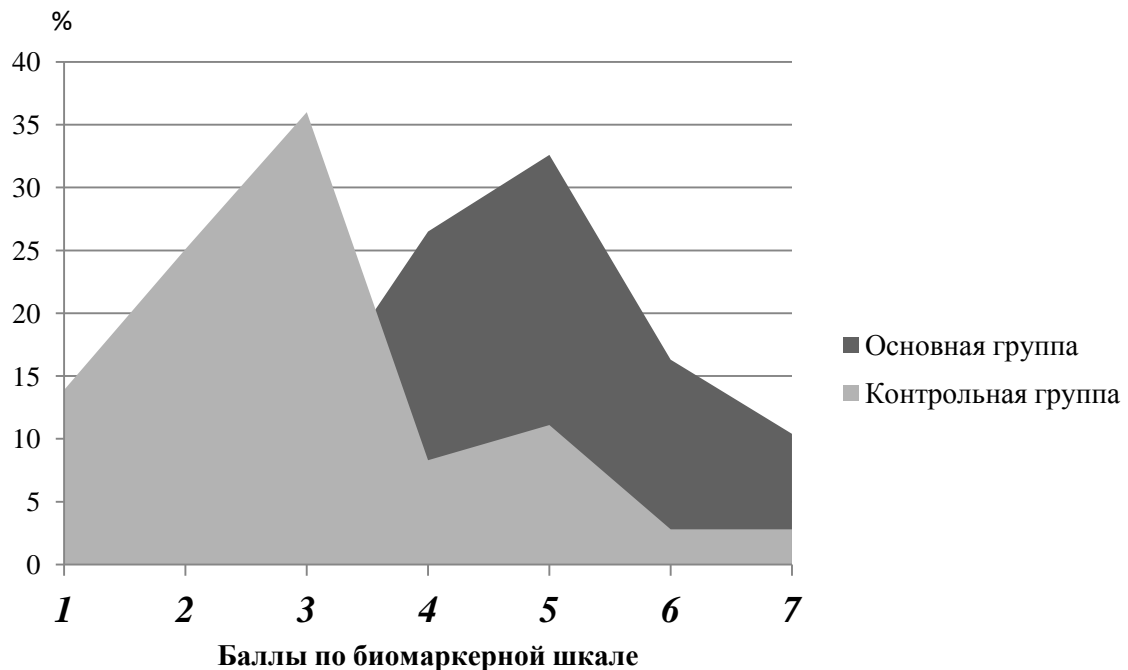


Рисунок 18 - Распределение пациентов в группах в зависимости от биомаркерной шкалы

Характерен «двух-пиковый» характер кривой, отражающий клинически значимые различия биомаркерной «отягощенности» пациентов с «асимптомным» каротидным атеросклерозом. При рассмотрении исследуемых групп в зависимости от пола выявлено, что у женщин меньше выражены негативные сдвиги биомаркеров атерогенеза, чем у мужчин ($p = 0,012$). Медиана показателя оценки по предложенной балльной системе у мужчин составила 5 [3; 6], в то время как у женщин – 3 [3; 5].

Таким образом, в соответствии с баллом можно предложить следующую шкалу проатерогенной активности: имеющих низкий риск прогрессирования атеросклероза (1-3 балла), пограничное значение (4-5) и высокий риск (6-7) (Таблица 21). Исходя из этой шкалы, на рисунке 19 представлено ранжирование оценки риска развития атеросклероза в исследованных группах пациентов.

Шкала проатерогенной активности

<i>Балл</i>	<i>Риск развития атеросклероза</i>
1-3	Низкий
4-5	«Пограничный»
6 и более	Высокий

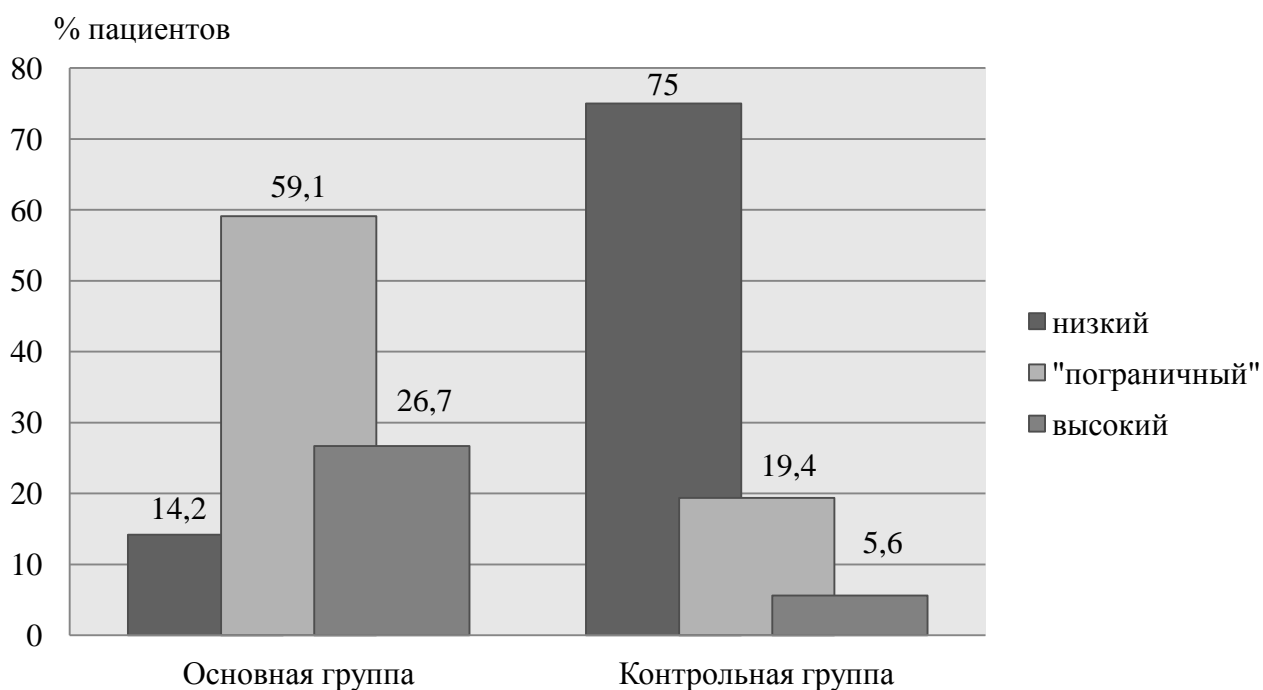


Рисунок 19 – Ранжирование риска развития атеросклероза по шкале биомаркеров у обследованных

Достаточно показательно распределение баллов у обследованных пациентов – практически 60% пациентов с атеросклерозом находятся в «пограничной» зоне, в то время как в группе контроля такие значения выявляются лишь у каждого пятого обследованного.

Нами были также более детально проанализированы проатерогенные изменения уровня каждого биомаркера в частности. Так, для всей когорты пациентов наиболее распространенным (78%) оказалось уменьшение NO

(<25,8 мкмоль/л). Частота встречаемости «неблагоприятных» изменений концентрации отдельных биомаркеров сильно варьировала в зависимости от группы пациентов (Таблица 22).

Таблица 22

Распространенность изменений отдельных биомаркеров атерогенеза ‡

Биомаркеры	Основная группа (%)	Контрольная группа (%)
<i>t-PA*</i>	69,4	50
<i>PAI-1†</i>	69,4	47,2
<i>Адипонектин*</i>	83,7	44,4
<i>ADMA†</i>	26,5	25
<i>NO₃⁻†</i>	81,6	30,5
<i>NO₂⁻†</i>	61,2	33,3
<i>NO*</i>	87,7	66,7

‡- за «изменения» взяты отклонения от референтных значений, соответствующие баллу «1» (см. табл.19)

* - потенциально антиатерогенные (ангиопротективные) биомаркеры

† - потенциально проатерогенные биомаркеры

Наибольшие различия группы пациентов с каротидным атеросклерозом по сравнению с группой контроля (как видно из таблицы 21) характерны для адипонектина и NO₃⁻. Снижение плазменной концентрации адипонектина <15,73 мкг/мл отмечено у 83,7% пациентов в группе исследования, в то время как в группе контроля подобные уровни встречались почти в половину меньше (44,4%). Схожие различия выявлены и для повышения уровня NO₃⁻ (>45 мкмоль/л) – 81,6% и 30,5% соответственно.

Взаимовлияние указанных ассоциаций однонуклеотидных полиморфизмов и биомаркерного профиля пациента на биохимические и коагулологические параметры, а также корреляты эндотелиальной дисфункции можно проиллюстрировать следующими клиническими случаями.

Клинический случай № 1.

Пациент Е., 60 лет, обратился в научно-консультативное отделение Научного центра неврологии с жалобами на головные боли и некоторое снижение памяти на текущие события. Из анамнеза известно, что длительное время страдает артериальной гипертонией с умеренным повышением цифр артериального давления (максимально – до 160/100 мм рт.ст.), систематически гипотензивную терапию не принимал; в 2011 году диагностировано нарушение толерантности к глюкозе.

При осмотре – конституция гиперстеническая (ИМТ – 29 кг/м²). Артериальное давление – 140/90 мм рт.ст. В неврологическом статусе отмечается мелкокорзинчатый нистагм при взгляде влево. Лицо симметрично в покое и при выполнении мимических проб. Глотание и фонация не нарушены. Язык по средней линии. Парезов нет. Сухожильные рефлексы симметрично снижены. Патологических рефлексов нет. Отмечается снижение болевой чувствительности в дистальных отделах рук и ног. При выполнении координаторных проб отмечается некоторая неуверенность. В пробе Ромберга пошатывается.

При проведении комплексного нейропсихологического тестирования у пациента выявлены умеренные когнитивные нарушения, преимущественно вовлекающие кратковременную память. При обследовании по Монреальской шкале оценки когнитивных функций (MoCA) пациент набрал 22 баллов (норма – 28 и выше).

При проведении биохимического анализа крови выявлено следующее: уровень гликемии натощак – 6,3 ммоль/л, гликированный

гемоглобин – 6,2 %. Уровень глюкозы плазмы через 2 часа после нагрузки в ходе ОГТТ – 9,2 ммоль/л. Обращает на себя внимание нарушение показателей липидного обмена в виде повышения уровня триглицеридов до 2,24 ммоль/л, снижение уровня холестерина ЛПВП до 0,78 ммоль/л и повышения уровня холестерина до 6,7 ммоль/л.

При оценке показателей гемостаза обнаружено повышение агрегации тромбоцитов под влиянием адреналина до 54 (в норме 37-43%) и АДФ до 60 (в норме 40-46%), повышение уровня фибриногена - до 4,3 г/л, а также снижение индекса фибринолитической активности до 5%.

При оценке биомаркеров эндотелиальной дисфункции отмечено повышение концентраций нитрата и нитрита (157 и 155 мкмоль/л соответственно), с выраженным снижением плазменного уровня NO – до 2/х мкмоль/л. Выраженное повышение PAI-1 (до 8,4 Ед/мл) сопровождалось снижением активности тканевого активатора плазминогена до 1,2 нг/мл. Уровень ADMA был резко повышен – 0,78 мкмоль/л, а адипонектина – снижен (6,5 мкг/мл). По биомаркерной шкале (см. раздел 3.5) пациент набрал максимальные 7 баллов, поскольку все показатели находилась за пределами референтных значений.

Учитывая такие выраженные изменения маркерных молекул атеросклеротического процесса, пациенту было выполнено ДС МАГ, где был обнаружен 60% стеноз правой ВСА и 55% стеноз левой ВСА (Рисунок 20).

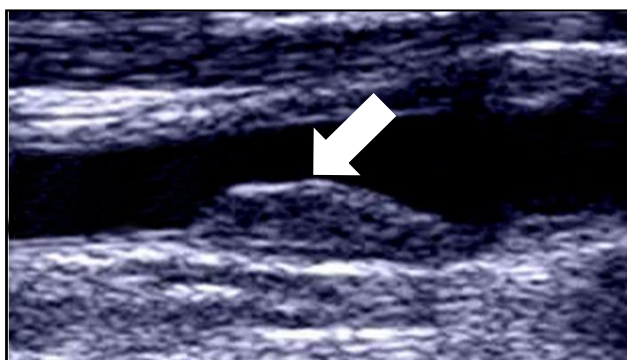


Рисунок 20 – Стеноз 55% левой ВСА (Пациент Е.)

При МРТ выявлялись признаки дисциркуляторной энцефалопатии (Рисунок 21), однако данных за перенесенное острое НМК получено не было.

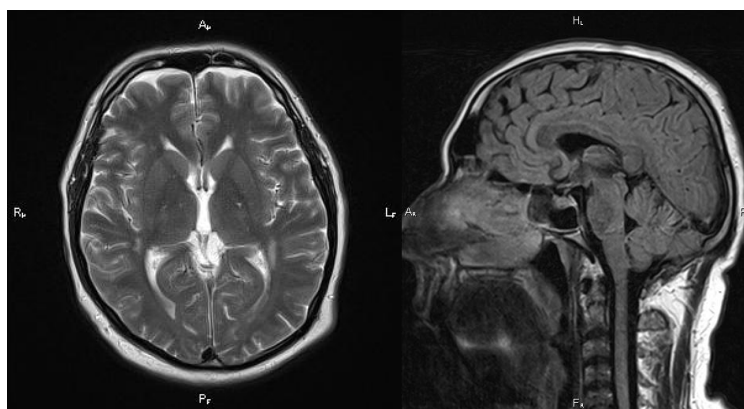


Рисунок 21 – Признаки дисциркуляторной энцефалопатии (Пациент Е.)

Пациенту был проведен молекулярно-генетический анализ с определением исследуемых полиморфизмов, в ходе которого было выявлено, что гетерозиготная мутация гена MTHFR (A1298C) сочеталась у него с гомозиготной мутацией в гене PAI-1 (4G/4G).

Таким образом, у данного пациента выявляются изменения, затрагивающие практически все звенья атерогенеза – воспаление, фибринолитическую активность, усиление гемостатической активации, липидный обмен. Несмотря на то, что пациент является по сути «асимптомным», такой большой набор различных маркеров (молекулярных и генетических, а также нейропсихологических) является фактором высокого риска по возможной дестабилизации атеросклеротической бляшки и дальнейшему развитию острого НМК по типу атеротромбоза, артерио-артериальной эмболии или по гемодинамическому подтипу. Следует отметить, что у пациента, учитывая наличие нарушения толерантности к глюкозе, повышения ИМТ, дислипидемии, артериальной гипертензии, диагностирован метаболический синдром (МС). Последний, в свою очередь, может являться негативным фактором в отношении прогрессирования атеросклеротического поражения сонных артерий. Все вышесказанное было

учтено при выборе «агрессивной» терапевтической тактики для данного пациента.

На фоне назначения адекватной антиагрегантной, гипотензивной и гиполипидемической терапии, а также препаратов, влияющих на углеводный обмен, отмечено улучшение клинической картины у данного пациента – несколько регрессировали когнитивные нарушения, почти исчез цефалгический синдром, стабилизировались цифры артериального давления. Спустя 12 месяцев после первичного осмотра были повторно проанализированы биохимические показатели: выявлена положительная динамика в виде уменьшения балла по биомаркерной шкале до 5 (за счет снижения уровня АДМА и повышения концентрации t-РА). Клинического «озвучивания» каротидного атеросклероза за указанный период наблюдения отмечено не было. Прогрессирование степени стеноза было в пределах допустимых значений – на 5% в левой ВСА.

Клинический случай № 2.

Пациентка К., 57 лет, обратилась в клинику с жалобами на эпизодически возникающую головную боль, снижение памяти (преимущественно на текущие события). Из анамнеза известно, что цефалгический синдром беспокоит в течение порядка 3-х лет, связан с психоэмоциональным напряжением. Нарушение памяти беспокоит уже год, однако сильно в повседневную жизнь пациентки «не вмешивается». Ранее не обследовалась.

При обследовании в научно-консультативном отделении выявлено некоторое пошатывание в пробе Ромберга, значение балла по шкале MoCA – 28, что соответствует нижней границе нормы. Артериальное давление при осмотре составило 130/80 мм рт. ст., частота сердечных сокращений – 78 в минуту. Признаков другой соматической патологии при осмотре выявлено не было.

В общем клиническом и биохимическом анализах крови выявляется некоторое повышение уровня общего холестерина и снижение холестерина липопротеидов высокой плотности (6,3 ммоль/л и 0,8 ммоль/л соответственно). При оценке показателей гемостаза обнаружено повышение агрегации тромбоцитов под влиянием адреналина до 50 (в норме 37-43%) и АДФ до 53 (в норме 40-46%).

Пациентка была обследована с применением указанной биомаркерной модели. Отмечены нормальные уровни t-PA (2,76 нг/мл), PAI-1 (2,4 Ед/мл), повышение адипонектина до 18 мкг/мл (что также соответствует норме). Показатели метаболизма оксида азота также были в пределах референтных значений, за исключением уровня нитрита, который был выше нормы (23 мкмоль/л). Отклонения наблюдались и в уровне АДМА, который составил 0,53 мкмоль/л. В совокупности оценка по шкале составила 2 балла, что соответствует «благоприятному» профилю атеросклероза. При молекулярно-генетическом исследовании пациента отмечено носительство гетерозиготной мутации гена SELP – Thr715Pro, ассоциированной с более благоприятным течением сосудистой патологии.

Учитывая возраст пациентки и жалобы, было решено провести ультразвуковое исследование брахиоцефальных артерий, где было выявлено лишь небольшое (до 1,1 мм) утолщение комплекса интима-медиа правой общей сонной артерии (Рисунок 22).

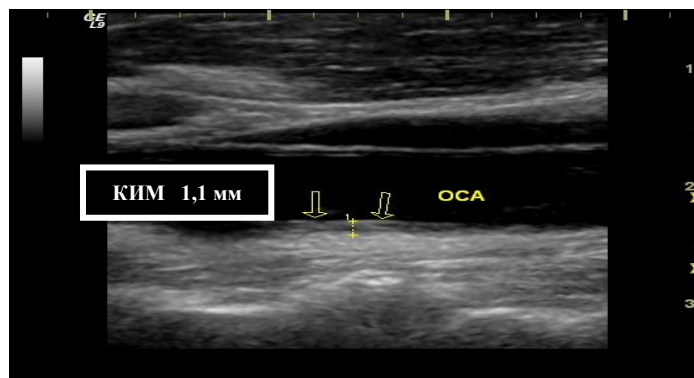


Рисунок 22 – Утолщение комплекса интима-медиа правой общей сонной артерии

На фоне назначения некоторой седативной терапии и рекомендаций по изменению образа жизни состояние пациентки заметно улучшилось, регрессировал цефалгический синдром, нарушения памяти значительно уменьшились.

Описанный случай свидетельствует о диагностическом потенциале предлагаемого набора биомаркеров и, в то же время, подчеркивает особенности сосудистой патологии у лиц женского пола – более «благоприятное» течение атеросклероза, менее выраженные проатерогенные сдвиги биомаркерного профиля, потенциальный ангиопротекторный эффект полиморфизма гена растворимого Р-селектина.

Клинический случай №3

Пациент Б., 52-х лет, обратился в клинику Научного центра неврологии с жалобами на раздражительность, колебания настроения. Со слов, указанные проблемы начали беспокоить его около года назад, однако ни с какими конкретно событиями в жизни он это не связывал. Ранее пациент не обследовался.

При осмотре в научно-консультативном отделении НЦН отмечено очень умеренное повышение артериального давления (до 145/90 мм рт.ст.). В неврологическом статусе выявлено легкое пошатывание в пробе Ромберга. Пациенту было решено провести обследование когнитивных функций с использованием Монреальской шкалы (MoCA), при котором выявлена когнитивная дисфункция (24 балла).

В общем и биохимическом анализе крови не было выявлено серьезных отклонений от нормы, а также данных за наличие нарушений углеводного и липидного обмена. При нейровизуализации также не было получено свидетельств в пользу распространенного сосудистого поражения вещества головного мозга (Рисунок 23).

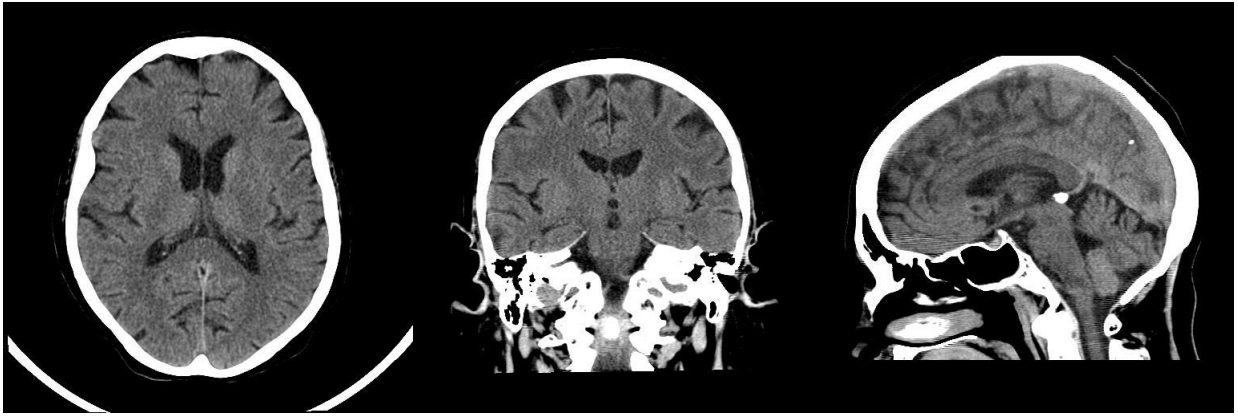


Рисунок 23 – Компьютерная томография головного мозга (пациент Б.)

При ДС МАГ у пациента выявлено выраженной атеросклеротическое поражение сонных артерий с формированием стенозов: 40% правой ВСА и 60% левой ВСА.

При анализе биомаркерного статуса пациента выявлены проатерогенные сдвиги практически по всем исследуемым параметрам. Так, снижение уровня NO (до 6 мкмоль/л) сопровождалось повышением уровня АДМА до 0,54 мкмоль/л. Значительно увеличена оказалась и концентрация РАІ-1 – 8,4 Ед/мл, в то время как уровни антиатерогенных биомаркеров – t-РА и адипонектина – были снижены (1,45 нг/мл и 2,5 мкг/мл соответственно). Таким образом, по шкале биомаркеров атерогенеза пациент «набрал» 5 баллов, что соответствует «пограничному» риску прогрессирования каротидного атеросклероза. Характерно и повышение соотношения АДМА/NO, составившего 0,09 (в то время, как в контрольной группе в настоящей работе медиана этого показателя составила 0,01). Генетический профиль по исследуемым параметрам был более «благоприятен» у этого пациента, однако имело место носительство гомозиготной мутации С677Т гена МТFНR.

Пациенту была назначена антиагрегантная, гипотензивная, гиполипидемическая терапия, рекомендованы мероприятия по увеличению физической активности, а также динамическое наблюдение за степенью прогрессирования стеноза.

Указанное наблюдение наглядно демонстрирует условность понятия «асимптомные» каротидные тенозы, поскольку при более тщательном обследовании у пациента выявлены нарушения когнитивных функций. Изменения биомаркерного статуса пациента подчеркивают не только выраженность атеросклеротического поражения сонных артерий у данного пациента, но и косвенно (в частности, повышение АДМА $> 0,5$ мкмоль/л) могут служить патогенетическими факторами развития когнитивной дисфункции.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пациенты с атеросклеротическим поражением сонных артерий представляют огромный клинический интерес как в связи с распространенностью патологии, так и в связи с высокой частотой развития у этих больных острых церебральных катастроф (den Hartog A. et al., 2013). Современные методы профилактики прогрессирования атеросклероза включают как медикаментозное, так и оперативное воздействия. Несмотря на это, процент острых нарушений мозгового кровообращения, развивающихся на фоне стенозирующих процессов в магистральных артериях головы, остается высоким, что является предпосылкой к дальнейшему изучению факторов риска этой патологии, а также путей наиболее раннего выявления группы пациентов высокого риска.

В настоящей работе в качестве целевой когорты больных была выбрана достаточно немногочисленная субпопуляция пациентов с так называемыми «асимптомными» стенозами внутренних сонных артерий. Небольшая выборка обусловлена не только относительной низкой распространенностью клинически «не звучащих» стенозов умеренной и высокой степеней (по мировым данным [de Weerd et al., 2010; den Hartog et al., 2013] – от 0 до 3%), но и достаточно строгими критериями включения в исследование. В частности, из работы были исключены пациенты, у которых в анамнезе имелось указание на перенесенное острое нарушение мозгового кровообращения (как ишемического, так и геморрагического характера). Однако анамнестическая «асимптомность» стеноза (о чем будет сказано ниже) не всегда соответствует клинической, и у таких пациентов, даже в отсутствие поражения вещества головного мозга, могут иметь место различные проявления недостаточности мозгового кровообращения.

Конечно, лимитирующим фактором в отношении оценки результатов настоящего исследования является наличие у пациентов коморбидности, сопутствующей соматической отягощенности, однако это является

особенностью большого числа работ, посвященных преимущественно клиническому анализу атеросклероза.

В качестве группы контроля, как видно из материала гл. 2, нами были выбраны пациенты, сопоставимые по полу и, в первую очередь, возрасту, у которых отсутствие атеросклеротического поражения в бассейне сонных артерий было подтверждено результатами дуплексного сканирования. Атеросклероз как системный процесс в основном рассматривался ранее как возраст-зависимое заболевание, однако ряд работ, проведенных в последнее время, показывает с определенной долей убедительности, что процессы старения играют важную, но далеко не всегда определяющую роль в генезе данной патологии. Многофакторность, включающая как эндо-, так и экзогенные влияния, является на сегодняшний день ведущей парадигмой возникновения изменений сосудистой стенки, приводящих к появлению атеросклеротической бляшки. Наряду с основными биохимическими параметрами (липидный профиль, воспалительные маркеры, состояние углеводного обмена), показателями системы гемореологии и системы гемостаза, факторами внешней среды (питание, табакокурение, злоупотребление алкоголем), огромное значение имеет генетическая составляющая, которая может быть представлена как мажорными мутациями в генах-кандидатах атеросклеротического процесса, приводя к так называемому «раннему» (и часто строго изолированному) атеросклерозу, так и одно-нуклеотидными полиморфизмами, которые при сочетании друг с другом могут определять «злокачественное» течение сосудистой патологии головного мозга, влияя, в частности, на стабильность атеросклеротической бляшки (Танащян М.М., 2013а). Ранее уже было продемонстрировано влияние провоспалительных изменений крови на развитие и прогрессирование этой патологии, в частности, повышение концентрации специфичного для каротидного атеросклероза биомаркера – липопропротеид-ассоциированной фосфолипазы А₂ (Maksyutkina L.N., 2013).

Фундаментом для проведения сравнительного исследования в представленной работе стала идентификация ряда биохимических факторов, отражающих различные звенья патологического процесса при атеросклерозе: эндотелиальную дисфункцию, активность фибринолитической системы, нарушения липидного обмена, метаболический синдром.

Одним из ведущих маркеров и этиопатогенетических элементов атеросклероза в настоящее время признана эндотелиальная дисфункция (Bonetti P. Et al., 2003). Эндотелий-опосредуемая вазодилатация при атеросклерозе нарушается, что свидетельствует в том числе о нарушении биодоступности основного медиатора сосудодвигательного компонента – оксида азота (NO) (Forstermann et al., 1988). В настоящей работе показано статистически достоверное различие между группами в уровне NO – общепринятого маркера эндотелиальной дисфункции. Однако статистически значимыми оказались и различия в уровнях нитрата и нитрита – промежуточных компонентов метаболизма NO. Эти данные согласуются с результатами опубликованного в 2015 году исследования (Gumanova N. et al., 2015), в котором на популяции из более 1000 человек было продемонстрировано повышение уровней нитрата и нитрита у пациентов, перенесших ишемический инсульт. Показано также, что нитрат и нитрит являются не только продуктами метаболического пути NO, но при определенных условиях сами могут становиться «продуцентами» этого соединения (Alef A. et al., 2012), причем этот, нитритный путь образования NO активируется при гипоксических состояниях (Huang Z. et al., 2005).

Интерес представляет обнаруженная в работе выраженная вариабельность этих показателей внутри группы с «асимптомными» стенозами ВСА. С одной стороны, это можно рассматривать как адаптационный процесс, направленный на компенсацию нарушений функции эндотелия. Так, в некоторых исследованиях (в частности, Apostoli G. et al., 2014) диета с высоким содержанием нитратов и/или нитритов

(NO_x) постулируется как возможный способ преодоления дефицита NO. С другой стороны, низкие значения содержания NO могут быть вызваны повышением концентрации одного из интенсивно изучаемых в последние два десятилетия веществ – асимметричного диметиларгинина (АДМА). Так, в рамках настоящего исследования показано, что между концентрацией АДМА и содержанием NO имеется отрицательная корреляционная взаимосвязь, т.е. повышение уровня АДМА ведет к снижению содержания NO. Данный факт находит подтверждение в мировой литературе, поскольку неоднократно было показано, что АДМА является эндогенным ингибитором NO-синтазы – фермента, участвующего в синтезе NO. Так, Kielstein и соавт. продемонстрировали, что внутривенное введение АДМА у людей вызывает снижение кровотока в почках с одновременным повышением сопротивления сосудистой сети почки, что вызывало задержку натрия и повышение артериального давления. Той же группой авторов было показано, что инфузия АДМА приводит к снижению перфузии головного мозга и увеличению степени ригидности мозговых артерий (Kielstein J. et al., 2006).

Вместе с тем, заслуживает внимания выявленный нами факт отсутствия такой взаимосвязи (статистически достоверной) в группе контроля, у пациентов без каротидного атеросклероза. Данные результаты открывают возможности для некоторой спекуляции. Так, отсутствие у пациентов без атеросклероза найденной в исследуемой группе обратной взаимосвязи уровня АДМА и NO может свидетельствовать о том, что в развитии эндотелиальной дисфункции при атеросклерозе играют важную роль принципиально иные механизмы. АДМА, как маркер сердечно-сосудистой патологии, вообще, и атеросклероза, в частности, запускает каскад событий, приводящий в итоге к развитию патологического процесса лишь в условиях уже существующего в фоне нарушения эндотелиальной функции. Вполне вероятно, что в качестве маркера атеросклероза важно определение АДМА именно в сочетании с NO (в частности, интересным

нам показалось определение соотношения АДМА/NO, которое статистически значимо различалось между группами). Использование указанного соотношения в качестве диагностической модальности не было отражено в доступной нам отечественной и мировой литературе.

При анализе активности АДМА между группами не было выявлено статистически значимых отличий (Танащян М.М., 2013в), однако при выделении в качестве определенной границы повышенного уровня концентрации в 0,5 мкмоль/л отмечено, что более высокие значения чаще встречаются в группе пациентов с каротидным атеросклерозом. Это согласуется с мировыми данными: в частности, у пациентов с атеросклерозом коронарных артерий выявлены более высокие уровни АДМА, чем у здоровых пациентов, а у лиц с нестабильной стенокардией активность этого соединения выше, чем у пациентов со стабильной формой коронарной недостаточности (Krempf T. et al., 2005). The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study, проспективное исследование со средним периодом наблюдения в 5 с половиной лет, продемонстрировало, что плазменная концентрация АДМА ассоциирована со смертностью от сердечно-сосудистых и других причин у пациентов со стабильной и нестабильной стенокардией независимо от известных факторов риска (Meininger A. et al., 2007). В другом исследовании с периодом наблюдения 24 года Leong и соавт. (2007) обнаружили взаимосвязь повышения уровня АДМА в крови с увеличением риска инфаркта миокарда и инсульта у женщин.

Некая «размытость» различий в уровне АДМА между группами в настоящем исследовании может быть связана с фармакологическими причинами – влиянием принимаемыми пациентами препаратов. Так, снижение концентрации АДМА наблюдалось у пациентов с ишемической болезнью сердца на фоне терапии ацетилсалициловой кислотой, бета-адреноблокаторами, блокаторами кальциевых каналов и ингибиторами ангиотензин-превращающего фермента (Yada T. et al., 2007). После

проведения процедуры чрескожной баллонной ангиопластики со стентированием также отмечалось существенное и значимое снижение плазменного уровня АДМА. Указанные данные свидетельствуют о том, что медикаментозная терапия сердечно-сосудистых заболеваний в целом, и цереброваскулярной патологии, в частности, ведет к снижению концентрации АДМА в плазме крови, а также к улучшению клинических показателей. При этом остается неясным, имеется ли прямая взаимосвязь между уровнем АДМА и терапевтическими эффектами проводимого лечения или АДМА является всего лишь биомаркером, отражающим улучшение клинического состояния и не играющим причинной роли (Родионов Р.Н. с соавт., 2008). Ингибирование NO-синтазы асимметричным диметиларгинином увеличивает степень оксидативного стресса на уровне эндотелия, а также вызывает экспрессию генов, ответственных за образование молекул адгезии, играющих одну из ключевых ролей на ранних этапах атерогенеза (Cybulsky M. et al., 1991). Эта особенность позволяет предполагать проатерогенные свойства АДМА. Также показано, что усиление продукции АДМА увеличивается в присутствии ЛПНП, т.е. гиперхолестеринемия может способствовать нарастанию степени эндотелиальной дисфункции посредством еще и этого механизма (Böger et al., 2000).

Длительная дискуссия гендерных различий побудила нас на анализ изучаемых биомаркеров в этом контексте. Хотя и не достигая степени статистической достоверности, результаты исследования биохимических коррелятов эндотелиальной функции несколько отличаются в зависимости от пола – у женщин отмечен более благоприятный «биомаркерный профиль», чем у мужчин. Данное наблюдение соответствует общей тенденции, которая рассматривает женскую гормональную систему как антиатерогенный фактор до определенного возраста (Lloyd-Jones D. et al., 2004).

Наличие метаболического синдрома (МС) вносит значимый вклад в дисфункцию эндотелия, зачастую являясь инициатором тесных взаимоотношающихся патогенетических изменений при инсулинорезистентности – ведущем компоненте МС (Muniyappa R. Et al., 2008). Отчасти это связано с общим отрицательным эффектом коморбидной патологии на сосудистую патологию головного мозга (Домашенко М.А. с соавт., 2007). Однако с определенной степенью уверенности можно утверждать, что входящие в структуру метаболического синдрома нозологии являются не просто аддитивным фактором, но представляют собой отдельное звено атерогенеза с иными свойствами (Танашян М.М., 2013г). Так, по нашим результатам, в системе NO у пациентов с метаболическим синдромом отмечалось истощение адаптивного аппарата сосудистой стенки, что можно рассматривать как субфинальную стадию прогрессирования цереброваскулярной патологии. Этому могут способствовать несколько причин. Известно, что инсулин обладает вазодилатирующим эффектом благодаря способности стимулировать продукцию оксида азота (NO) эндотелием, что ведет к усилению кровотока и улучшает утилизацию глюкозы скелетной мускулатурой (Zeng G. et al., 1996; Vincent M. et al., 2004). У пациентов с МС указанное действие инсулина становится неполноценным, что определяет снижение биодоступности NO и нарастание степени эндотелиальной дисфункции (Clerk L. Et al., 2006). Уже было сказано о роли ADMA в ингибировании системы NO, однако следует добавить, что этим не исчерпывается биологическая роль этой молекулы. Неоднократно были продемонстрированы значимые корреляции уровня ADMA и компонентов МС. Плазменная концентрация ADMA быстро повышается в ответ на избыточное употребление пищи: спустя 5 часов после однократного приема порции еды (с повышенным содержанием жира) в плазме крови пациента с сахарным диабетом 2-го типа (СД2) более чем в два раза повышается уровень ADMA (Fard A. et al., 2000). В эксперименте на мышах с искусственно вызванным СД уровень ADMA был прямо пропорционален

степени гипергликемии (Masuda H. et al., 1999). Дозозависимые корреляции циркулирующего в плазме крови ADMA и инсулино-резистентности были выявлены и в клинических исследованиях (Yeni-Komshian H. et al., 2000). У пациентов с СД2 отмечена корреляция уровня гликированного гемоглобина и ADMA (Začiragić A. et al., 2014). Интересным представляется тот факт, что концентрация ADMA не была повышена у пациентов с артериальной гипертонией, если у них не было выявлено признаков резистентности к инсулину (Stuhlinger M. et al., 2002). Такая тесная взаимосвязь асимметричного диметиларгинина и инсулино-резистентности позволяет предположить, что ADMA участвует в патогенетических путях, детерминирующих развитие МС (Bestermann W. et al., 2011). Мировые литературные данные находят подтверждение и в результатах настоящего исследования. Так, у пациентов с «асимптомными» каротидными стенозами более высокие уровни ADMA ($> 0,5$ мкмоль/л) отмечались у пациентов с МС, по сравнению с пациентами, у которых данная патология отсутствовала (36,4% vs 25,9% соответственно).

Механизмы влияния метаболического синдрома на регуляцию функции эндотелия остаются неясными до сих пор, однако можно говорить также и о повышении протромбогенной активности крови, в первую очередь, в результате хронической гипергликемии, а также о значительном вкладе в указанные нарушения патологии жирового обмена, представленных у пациентов чаще всего ожирением. МС способствует снижению фибринолитической активности крови посредством синтеза в висцеральной жировой ткани ингибитора активатора плазминогена-1 (РАI-1), который ингибирует расщепление фибрина (Медведев И.Н. и соавт., 2010). Важным фактором, через который реализуется проатерогенное действие МС, являются как воспалительные изменения в самой атеросклеротической бляшке, ведущие к ее нестабильности, так и повышение концентрации провоспалительных биомаркеров в крови (Raskurazhev A.A. et al., 2014b). Показано также, что у пациентов с острыми и хроническими ЦВЗ на фоне сопутствующего МС отмечаются

однонаправленные изменения систем гемореологии и гемостаза в сторону повышения протромботической активности (Орлов С.В., 2006; Теленкова Н.Г., 2010).

В представленном исследовании выявлена достаточно сильная корреляционная взаимосвязь между показателями эндотелиальной дисфункции и активностью фибринолитической системы. Последняя в настоящей работе изучалась посредством определения тканевого активатора плазминогена (t-РА) и ингибитора активатора плазминогена-1 (РАI-1). Концентрация обоих соединений, являющихся патофизиологическими антагонистами, достоверно различалась между основной и контрольной подгруппами, причем в основной группе преобладающей была тенденция к повышению протромботической активности с одновременным снижением функции фибринолитической системы крови. Концентрация РАI-1 рассматривается многими исследователями как предиктор именно атеросклероз-ассоциированных острых сосудистых событий: инфаркта миокарда, инсульта (Massot A. et al., 2014). Интересным представляется факт отсутствия связи выявленных изменений с возрастом пациентов, что может свидетельствовать о принципиально иных, отличных от процессов старения, патогенетических аспектах развития сосудистого поражения. Остается открытым вопрос об этиологической роли данных изменений в прогрессировании стенозирующих изменений брахиоцефальных артерий. Настоящая работа не позволяет опровергнуть и обратную позицию – атеросклероз в системе сонных артерий, запуская каскад патофизиологических реакций, приводит уже вторично к изменениям гемореологической картины крови. Сочетаясь с разнонаправленными и переменными изменениями биохимических показателей функции эндотелия, нарушения фибринолитической активности крови формируют «порочный круг», ведущий к прогрессированию и «озлокачествлению» атеросклероза, сопровождающегося острыми и хроническими цереброваскулярными заболеваниями.

Несмотря на такую неоднозначную оценку роли указанных показателей в патогенетической структуре атеросклеротического поражения брахиоцефальных артерий, стоит обратить внимание и на несомненную значимость данных изменений в диагностическом поиске группы пациентов «высокого» риска по развитию острых ишемических церебральных катастроф. Статистически достоверные различия между группами, не показавшие корреляционных взаимосвязей с возрастом пациентов, позволяют валидировать оценку маркеров как эндотелиальной функции, так и фибринолитической активности, в особенности, при рассмотрении вопроса о степени превентивного воздействия в каждом конкретном случае.

Особо хотелось бы обратить внимание на сильную прямую взаимозависимость t-РА и NO, отмеченную у пациентов в основной группе. Такие тесные механизмы взаимодействия эндотелиальной регуляции и фибринолитической системы представляются нам важным адаптивным физиологическим компонентом антитромбогенной активности сосудистой стенки. Его истощение ведет к срыву механизмов компенсации и появлению патологических изменений, в дальнейшем проявляющимся атеросклерозом. Стоит отметить, что у лиц женского пола показатели фибринолитической активности крови отражают несколько больший антитромбогенный потенциал сосудистой стенки. О вероятных причинах такого феномена упоминается выше.

Помимо регуляции эндотелия и изменений в системе гемореологии и гемостаза патологические явления при атеросклерозе представлены еще одним важным аспектом – нарушениями жирового обмена. В настоящей работе в качестве одного из критериев сравнения исследуемых групп нами был выбран адипонектин – гормон (адипокин) жировой ткани. Результатами многочисленных исследований была продемонстрирована протективная роль адипонектина в отношении развития и прогрессирования атеросклероза (Ouchi N. et al., 2000; Ouchi N. et al., 1999), и данный факт нашел подтверждение и в представленной работе - концентрация

адипонектина в основной и контрольной группе статистически достоверно различалась. Повышение сывороточного уровня адипонектина является, как нам представляется, достаточно характерным признаком «благоприятного» течения сосудистой патологии, представленной, в частности, атеросклерозом в системе сонных и позвоночных артерий. Почти двукратное превышение средних значений концентрации адипонектина в контрольной группе по сравнению с основной свидетельствует о важной антиатерогенной роли данного гормона. Стоит, однако, предостеречь от сугубо односторонней оценки выявленных различий, ведь существует возможность обратной взаимосвязи – снижения уровня адипонектина под влиянием развития атеросклеротических изменений в сосудах. В таком случае, гипoadипонектинемия предстает в качестве вторичного по отношению к основной сосудистой патологии процесса. Несмотря на то, что в настоящей работе не было выявлено статистически достоверных корреляций между снижением уровня адипонектина и повышением ИМТ, в мировой литературе находятся подтверждения данному наблюдению, причем как в прикладных, так и в фундаментальных работах (Kumada M. et al., 2003; Hotta K. et al., 2000). Основываясь на данном наблюдении, можно с определенной долей уверенности говорить о всё-таки более вероятной первичной роли гипoadипонектинемии как одного из патогенетических аспектов развития и прогрессирования атеросклероза. В рамках указанной концепции становится более понятной и значимость метаболических нарушений в возникновении сосудистой патологии головного мозга. В нашей работе снижение адипонектина наблюдалось чаще именно у пациентов с метаболическим синдромом, что согласуется как с данными клинических исследований, так и с известными биохимическими и патофизиологическими механизмами указанных процессов.

Интересным нам показалось наблюдение значимого повышения уровня адипонектина в группе пациентов женского пола по сравнению с мужчинами, причем данные различия сохраняли степень статистической

достоверности и при рассмотрении внутри каждой из исследованных групп. Данный факт в очередной раз подтверждает положение о превентивной роли гормональных механизмов атерогенезе у женщин (Lloyd-Jones D. et al., 2004). Стоит добавить, что достоверной взаимосвязи между концентрацией адипонектина и возрастом пациентов отмечено не было, что может свидетельствовать о возможном потенциале определения адипонектинемии в ранней диагностике атеросклеротического поражения брахиоцефальных артерий.

Поскольку ни один из представленных биохимических маркеров не является строго специфичным и чувствительным в отношении атеросклероза (так, повышение ADMA описано и при почечной патологии [Alroim P. et al., 2015]), нами была предпринята попытка комплексной оценки исследуемых биомаркеров у пациентов с каротидным атеросклерозом. С этой целью были выбраны референтные значения для каждого показателя (по медиане показателей в группе контроля), и в зависимости от характера биомаркера (проатерогенный или антиатерогенный) было решено присваивать 1 балл за любое изменение, ассоциированное с атерогенезом (для проатерогенных факторов это было повышение относительно референтного значения, для антиатерогенных – наоборот, снижение). Представленная нами модель (шкала биомаркеров атерогенеза) включает 7 показателей, оценка по ней варьирует от 0 баллов (благоприятный профиль) до 7 (максимально неблагоприятное соотношение биомаркеров). При анализе всего массива данных в соответствии с этой шкалой было выявлено резкое преобладание биомаркерной «отягощенности» в группе пациентов с атеросклерозом БЦА – проатерогенные, неблагоприятные изменения в 4-х и более показателях выявлялись у 4-х из пяти пациентов в этой группе (83,7%). В тоже время такие неблагоприятные профили отмечались лишь у четверти (25%) пациентов из группы контроля.

Настоящее исследование не ограничивалось изучением лишь биохимической составляющей атеросклероза, но нами была предпринята попытка оценить и охарактеризовать генотипические свойства популяции пациентов с «асимптомным» атеросклерозом на основании анализа линейки мутаций в генах, по разным свидетельствам имеющим отношение к атерогенезу. Так, была подтверждена патогенетическая роль значимых однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR): мутантный аллель С в положении 1298 встречался почти в полтора раза чаще в группе исследования по сравнению с группой контроля. Учитывая ранее многократно доказанные корреляции между наличием SNP в гене МТГФР и плазменным уровнем гомоцистеина, можно говорить о роли гипергомоцистеинемии не только как фактора, способствующего тромбообразованию, но и как потенциального инициатора атеросклеротического процесса в брахиоцефальных артериях. Распределение вариантов гена МТНFR в зависимости от пола продемонстрировало более неблагоприятный (в плане «мутантной» отягощенности) профиль у мужчин.

Частота значимого полиморфизма Gln192Arg в гене параоксоназы-1 (PON-1) достоверно не различалась между группами. Указанное наблюдение не опровергает, а скорее подтверждает существующие свидетельства о роли данного однонуклеотидного полиморфизма в цереброваскулярной патологии. Неоднократно было показано, что наличие мутантного аллеля 192Arg существенно повышает риск ишемического инсульта. Поскольку все пациенты, включенные в наше исследование, были «асимптомными», отсутствие различий по частоте выявляемости данного SNP позволяет говорить о возможной роли мутации преимущественно в дестабилизации атеросклеротической бляшки с формированием в последующем ишемических церебральных катастроф. Последнее ассоциировано также и с неэффективностью проводимой антиагрегантной

терапии – ранее показано влияние полиморфизма гена циклооксигеназы-1 A842G на прогрессирование каротидного атеросклероза и развитие «клинической» резистентности к аспирину (Khamidova Z.M. et al., 2013).

Однако генетические альтерации не во всех случаях играют негативную роль на развитие и прогрессирование того или иного мультифакторного заболевания. Результаты исследования распределения однонуклеотидного полиморфизма (Thr715Pro) в гене P-селектина (SELP) показывают более частое выявление мутантного аллеля (715Pro) у лиц из контрольной группы. В данном случае возможно лишь косвенно говорить об ангиопротективном значении указанной мутации (Раскуражев А.А., 2015), однако в мировой литературе имеются подтверждения этому феномену (Au C. et al., 2007). В частности, постулируется, что данный полиморфизм приводит к снижению уровня P-селектина – одной из активных молекул, обеспечивающих межклеточные взаимодействия, - а это, в свою очередь, потенциально ведет к уменьшению активности миграции макрофагов в субэндотелиальный слой и инициации дальнейших механизмов атерогенеза. В крови циркулирует растворимая форма P-селектина, у которой отсутствует трансмембранный домен, причем ранее было показано, что повышение ее уровня в плазме крови ассоциировано с развитием сердечно-сосудистых и, в частности, цереброваскулярных заболеваний. Полиморфизм в гене SELP (rs6136), приводящий к замене в продукте гена аминокислоты треонин на пролин в 715-м положении, приводит к снижению уровня растворимого P-селектина, что может говорить в пользу ангиопротективного (антиатерогенного) эффекта данного SNP. У женщин в нашем исследовании также более «благоприятный» генетический профиль – мутантный аллель выявлялся у них чаще, по сравнению с мужчинами.

Говоря об антиатерогенных генетических альтерациях, неоднозначными представляются результаты исследования однонуклеотидного полиморфизма (-675 5G/4G) в промоторной области

гена ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1). Гомозиготный мутантный вариант гена (4G/4G) встречался в группе контроля в 1,5 раза чаще, чем в группе исследования ($p = 0,05$). Показанное ранее в нашей работе достоверное ухудшение фибринолитической активности крови на фоне повышения концентрации PAI-1 свидетельствует о важной роли этой молекулы в процессах, связанных с атерогенезом. Однако более частая встречаемость мажорной мутации 4G/4G в группе контроля говорит о скорее протективном значении данного полиморфизма. Практически у 50% лиц женского пола в группе контроля наблюдался гомозиготный вариант 4G/4G, в то время как в группе исследования этот показатель составил лишь одну треть, однако в обеих группах распространенность мутантного аллеля 4G была выше у женщин, по сравнению с мужчинами.

Продемонстрированные в работе ассоциации SNP исследованных генов и мутантных аллелей представляют определенный практический интерес. Учитывая, что атеросклероз – мультифакториальный и средово-обусловленный процесс, поиск моногенного характера наследования этой патологии (за редким исключением случаев строго семейного наследования заболевания) сложная, малореализуемая задача. Напротив, поиск аллельных ассоциаций и сравнение их распространенности в соответствующих когортах пациентов – перспективное направление исследований в этой области. В настоящей работе показано сочетание мутантных аллелей гена MTHFR (С и Т) с однонуклеотидным полиморфизмом в гене PAI-1, которое чаще встречалось в группе пациентов с каротидным атеросклерозом. Анализ ассоциаций трех аллелей выявил сочетания тех же генов, однако здесь различия в их распространенности достигли уже степени статистической значимости. В доступной нам литературе об указанных ассоциациях мутантных аллелей информации найдено не было.

В целом, говоря о биомаркерах каротидного атеросклероза, следует остановиться подробнее на их разделении на проатерогенные и антиатерогенные (ангиопротективные). Обладая достаточной долей

условности, такая классификация позволяет в то же время «вскрыть» и акцентировать внимание на определенных этиологических и патогенетических аспектах развития и прогрессирования сосудистой патологии. Атеросклероз – это сложная и чрезвычайно вариабельная (как по вызываемым биохимическим и другим изменениям, так и по разнообразию ассоциированных осложнений и состояний), которая в своем развитии проходит большое число стадий.

Такое подчас длительное, хроническое течение заболевания не означает, что отсутствие клинических проявлений ассоциировано с «благоприятным» прогнозом. Исполдволь нарастающие нарушения гемореологии и системы гемостаза, усиление дисфункции эндотелия, сопровождающиеся протромботическими сдвигами, часто являются причиной резкого прогрессирования атеросклероза, его «озлокачествления» с формированием острых сосудистых катастроф (инсульт, инфаркт миокарда). В этой связи чрезвычайно важным представляется комплексная оценка различных звеньев атерогенеза для создания наиболее полной картины происходящих в организме пациентов патологических изменений. Зачастую один или два исследуемых показателя могут находиться в пределах нормальных значений, что не вызовет настороженности у врача-клинициста. Однако определение биомаркеров различной направленности (как проатерогенных, так и антиатерогенных) в совокупности позволит дать более адекватную оценку и определить наиболее вероятный прогноз в каждом конкретном случае. В качестве ранней диагностической модальности при комплексной оценке риска прогрессирования каротидного атеросклероза (в том числе его «асимптомных» стадий) можно рекомендовать исследование следующей панели биомаркеров - адипонектин, тканевой активатор плазминогена, ингибитор тканевого активатора плазминогена - 1, асимметричный диметиларгинин, оксид азота.

ВЫВОДЫ

1. Определение «асимптомный» атеросклеротический стеноз сонных артерий является весьма условным, поскольку сужения сонных артерий умеренной и высокой градаций часто сопровождаются цефалгическими синдромом (в 56% случаев), а также ухудшением когнитивных функций (в 79% случаев). Наличие различных проявлений метаболического синдрома усиливает выраженность неврологической симптоматики.
2. Расстройство когнитивных функций чаще ассоциировано с дисбалансом в NO-зависимой функции эндотелия (высокие значения асимметричного диметиларгинина наряду с истощением NO-обмена), что позволяет говорить о ее роли в потенцировании клинического ухудшения у пациентов с каротидным атеросклерозом.
3. У пациентов с «асимптомным» каротидным атеросклерозом отмечается повышение протромбогенной активности крови (снижение уровня t-РА, повышение PAI-1) и ухудшение эндотелиальной функции (дисбаланс в системе NO), что свидетельствует о предикторной роли этих показателей как биомаркеров атеросклероза. Выраженное снижение концентрации адипонектина при каротидном атеросклерозе позволяет расценивать высокую вероятность данного соединения как значимого антиатерогенного (ангиопротективного) биомаркера.
4. При оценке биомаркерного статуса у пациентов с «асимптомными» каротидными стенозами в 86% случаев выявлен проатерогенный сдвиг в сторону прогрессирования атерогенеза по 4-м и более показателям шкалы проатерогенной активности.
5. Уточнена роль генетических полиморфизмов генов систем гемореологии и гемостаза как биомаркеров прогрессирования каротидного атеросклероза. Выявлены проатерогенные (гены MTHFR) и антиатерогенные (ген SELP) мутации в генах, а также атероагрессивное

действие ассоциации нескольких мутантных аллелей (генов MTHFR и PAI-1).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В качестве ранней диагностической модальности при комплексной оценке риска прогрессирования каротидного атеросклероза (в том числе его «асимптомных» стадий) можно рекомендовать исследование следующей панели биомаркеров – адипонектин, тканевой активатор плазминогена, ингибитор тканевого активатора плазминогена-1, асимметричный диметиларгинин, оксид азота.
2. Обосновано внедрение в более широкую клиническую практику методов оценки атерогенеза следующих генетических альтераций – однонуклеотидных полиморфизмов в генах MTHFR, SELP и PAI-1, с целью назначения адресной и персонализированной превентивной терапии.
3. Оценка когнитивной дисфункции даже на стадии «асимптомного» каротидного атеросклероза – необходимое условие определения наиболее адекватной терапевтической тактики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Джибладзе Д.Н., Красников А.В., Лагода О.В., Бархатов Д.Ю. Асимптомные стенозы артерий каротидного бассейна. Нервные болезни. 2005. № 2. С. 26-31.
2. Домашенко М.А., Орлов С.В., Костырева М.В., Танащян М.М., Ионова В.Г., Чечеткин А.О., Суслина З.А. Дисфункция эндотелия при ишемических нарушениях мозгового кровообращения на фоне ИБС. Сердце: журнал для практикующих врачей. 2006. Т. 5. № 7 (31). С. 376-378.
3. Зорилова И.В. Молекулярно – генетические факторы риска тромбофилических состояний при ишемическом инсульте у пациентов молодого возраста: дисс. ... канд. мед. наук / И.В. Зорилова. - М., 2006.
4. Карчевская В.А., Ануфриев П.Л., Гулевская С.Т., Танащян М.М. Структура атеросклеротических бляшек каротидного синуса у больных с ишемическими нарушениями мозгового кровообращения и сахарным диабетом 2 типа (исследование биоптатов). Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.- 2010.- №61(5).- С. 443-448.
5. Медведев И.Н., Даниленко О.А. Коррекция антикоагуляционной и фибринолитической активности сосудистой стенки у больных артериальной гипертонией при метаболическом синдроме, перенесших окклюзию сосудов глаза, под действием сочетания дилтиазема, пиоглитазона и немедикаментозного воздействия // Фундаментальные исследования.– 2010.– № 5– С. 43-47.
6. Орлов С.В. Гемореология и гемостаз при ишемических инсультах у больных с метаболическим синдромом: дисс. ... канд. мед. наук / С.В. Орлов. - М., 2006.

7. Родионов Р.Н. Асимметричный диметиларгинин и его роль в этиологии и патогенезе сердечно – сосудистых заболеваний / Р.Н. Родионов, И.О. Блохин, М.М. Галагудза и соавт. // Артериальная гипертензия. – 2008. – Т. 14, № 4. – 306 – 314с.
8. Соболева Г.Н., Рогоза А.Н., Шумилина М.В., Бузиашвили Ю.И., Карпов Ю.А. Дисфункция эндотелия при артериальной гипертензии: вазопротективные эффекты бета-блокаторов нового поколения. Росс. мед. журн. 2001. Т. 9, № 18. С. 754-758.
9. Суслина З.А. Сосудистая патология головного мозга: итоги и перспективы. Анналы клинической и экспериментальной неврологии 2007; 1(1):10-16.
10. Танащян М.М., Лагода О.В., Клименко Н.А., Глотова Н.А., Чечеткин А.О., Фонякин А.В., Коновалов Р.Н. Асимптомные стенозы сонных артерий: еще один взгляд на проблему. Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2009. Т. 3. № 2. С. 17-20.
11. Теленкова Н.Г. Гематовазальные взаимодействия при хронических цереброваскулярных заболеваниях на фоне метаболического синдрома: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / Н.Г. Теленкова. - М., 2010, С.29.
12. Федин А.И., Старых Е.П., Путилина М.В., Старых Е.В., Миронова О.П., Бадалян К.Р. Эндотелиальная дисфункция у больных с хронической ишемией мозга и возможности ее фармакологической коррекции. Лечащий врач, май 2015, №5, с.15-20.
13. Чазов Е.И. (ред.) Руководство по кардиологии. М., 1982. Т.1:438-441.
14. Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP. et al. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. Am J Cardiol 2001; 88: 1201-3.
15. Abe T, Tohgi H, Murata T, Isobe C, Sato C. Reduction in asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in the

- cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2001 Oct 26;312(3):177-9.
16. Agirbasli M, Eren M, Eren F, Murphy SB, Serdar ZA, Seckin D, Zara T, Cem Mat M, Demirkesen C, Vaughan DE. Enhanced functional stability of plasminogen activator inhibitor-1 in patients with livedoid vasculopathy. *J Thromb Thrombolysis*. 2011 Jul; 32(1):59-63.
 17. Agirbasli M. Pivotal role of plasminogen-activator inhibitor 1 in vascular disease. *Int J Clin Pract*. 2005 Jan; 59(1):102-6.
 18. Aji W, Ravalli S, Szabolcs M, et al. L-arginine prevents xanthoma development and inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. *Circulation*. 1997;95:430–437.
 19. Alef MJ, Tzeng E, Zuckerbraun BS Nitric oxide and nitrite-based therapeutic opportunities in intimal hyperplasia. *Nitric Oxide*. 2012 May 15; 26(4):285-94.
 20. Alessi MC, Juhan-Vague I. PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Oct; 26(10):2200-7.
 21. Alpoim PN, Sousa LP, Mota AP, Rios DR, Dusse LM. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in cardiovascular and renal disease. *Clin Chim Acta*. 2015 Feb 2;440:36-9.
 22. Antoniades, C.; Shirodaria, C.; Leeson, P.; Antonopoulos, A.; Warrick, N.; van Assche, T.; Cunnington, C.; Tousoulis, D.; Pillai, P.; Ratnatunga, C.; et al. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: Implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur. Heart J*. 2009, 30, 1142–1150.
 23. Apostoli GL, Solomon A, Smallwood MJ, Winyard PG, Emerson M. Role of inorganic nitrate and nitrite in driving nitric oxide-cGMP-mediated inhibition of platelet aggregation in vitro and in vivo. *J Thromb Haemost*. 2014 Nov;12(11):1880-9.

24. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Kumada M, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Shimomura I, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adipocytederived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation*. 2002; 105:2893–2898.
25. Arndt PG, Young SK, Worthen GS. Regulation of lipopolysaccharide-induced lung inflammation by plasminogen activator Inhibitor-1 through a JNK-mediated pathway. *J Immunol*. 2005 Sep 15; 175(6):4049-59.
26. Arrol S, Mackness MI, Durrington PN. High-density lipoprotein associated enzymes and the prevention of low-density lipoprotein oxidation. *Eur J Lab Med*. 1996;4:33–38.
27. Autret A, Pourcelot L, Saudeau D, Marchal C, Bertrand P, de Boisvilliers S. Stroke risk in patients with carotid stenosis. *Lancet*. 1987 Apr 18;1(8538):888-90.
28. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Erogul J, Hsu C, Dunlop C, La Du BN. Paraonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraonase activities: selective active of human paraonase alloenzymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;10:1617–1624.
29. Ay C, Jungbauer LV, Sailer T, et al. High concentrations of soluble P-selectin are associated with risk of venous thromboembolism and the P-selectin Thr715 variant. *Clin Chem* 2007;53:1235-1243.
30. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN. Serum paraonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 330–335.
31. Balta G, Altay C, Gurgey A (2002) PAI-1 gene 4G/5G genotype: a risk factor for thrombosis in vessels of internal organs. *Am J Hematol* 71(2):89–93

32. Bang CO, Park HK, Ahn MY, et al. 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene and insertion/deletion polymorphism of the tissue- type plasminogen activator gene in atherothrombotic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2001; 11: 294–9.
33. Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:463– 478.
34. Bedford, M.T.; Clarke, S.G. Protein arginine methylation in mammals: Who, what, and why. *Mol. Cell* 2009, 33, 1–13.
35. Benditt, E.P., Benditt J.M. Evidence for monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1973;70:1753-1756.
36. Bestermann WH., Jr The ADMA-Metformin Hypothesis: linking the cardiovascular consequences of the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Cardiorenal Med.* 2011;1:211–219.
37. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89-95
38. Boekholdt SM, Bijsterveld NR, Moons AH, et al. Genetic variation in coagulation and fibrinolytic proteins and their relation with acute myocardial infarction: a systematic review. *Circulation* 2001; 104: 3063–8.
39. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:1842-7.
40. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98: 1842-7
41. Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Böger SM. LDL Cholesterol Upregulates Synthesis of Asymmetrical Dimethylarginine in Human Endothelial Cells: Involvement of S-

- Adenosylmethionine -Dependent Methyltransferases. *Circ Res.* 2000;87:99-105
42. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk.
 43. Boring L, Gosling J, Cleary M, et al. Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:894–897.
 44. Bouch JL, Hansen H, Feener EP. Natriuretic factors and nitric oxide suppress plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. Role of cGMP in the regulation of the plasminogen system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1771–1779.
 45. Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L (1998) Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 98: 2520–2526.
 46. Burger PC, Wagner DD. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood.* 2003 Apr 1; 101(7):2661-6.
 47. Buysschaert M, Dramais AS, Wallemacq PE, Hermans MP. Hyperhomocysteinemia in type 2 diabetes: relationship to macroangiopathy, nephropathy, and insulin resistance. *Diabetes Care.* 2000 Dec; 23(12):1816-22.
 48. The CASANOVA Study Group. Carotid surgery versus medical therapy in asymptomatic carotid stenosis. *Stroke.* 1991 Oct;22(10):1229-35.
 49. Carter AM, Anagnostopoulou K, Mansfield MW, Grant PJ. Soluble P-selectin levels, P-selectin polymorphisms and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost.* 2003 Aug;1(8):1718-23.
 50. Carter AM, Anagnostopoulou K, Mansfield MW, Grant PJ. Soluble P-selectin levels, P-selectin polymorphisms and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost.* 2003 Aug;1(8):1718-23.

51. Cesari M., Pahor M., Incalzi R. A. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovascular Therapeutics*. 2010;28(5):e72–e91.
52. Chen J, Kuhlencordt PJ, Astern J, et al. Hypertension does not account for the accelerated atherosclerosis and development of aneurysms in male apolipoprotein e/endothelial nitric oxide synthase double knockout mice. *Circulation*. 2001;104:2391–2394.
53. Chhabra N. Endothelial dysfunction – A predictor of atherosclerosis. *Internet J Med Update*. 2009;4(1):33–41.
54. Chimowitz MI, Weiss DG, Cohen SL, Starling MR, Hobson RW 2nd. Cardiac prognosis of patients with carotid stenosis and no history of coronary artery disease. Veterans Affairs Cooperative Study Group 167. *Stroke*. 1994 Apr;25(4):759-65.
55. Chirinos JA, David R, Bralley JA, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors, arterial hemodynamics, and subclinical vascular disease: the PREVENCIÓN Study. *Hypertension* 2008; 52: 1051-9
56. Clendenning JB, Humbert R, Green ED, Wood C, Traver D, Furlong CE. Structural organisation of the human PON1 gene. *Genomics*. 1996;35:586–589.
57. Clerk LH, Vincent MA, Jahn LA, Liu Z, Lindner JR, Barrett EJ. Obesity blunts insulin-mediated microvascular recruitment in human forearm muscle. *Diabetes*. 2006;55(5):1436–1442.
58. Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 1991;251: 788–791.
59. Dawson S, Hamsten A, Wiman B, et al. Genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus is associated with altered levels of plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 183–90.

60. de Weerd M, Greving JP, Hedblad B, Lorenz MW, Mathiesen EB, O’Leary DH, et al. Prevalence of asymptomatic carotid artery stenosis in the general population: an individual participant data meta-analysis. *Stroke*. 2010;41:1294-1297.
61. den Hartog AG, Achterberg S, Moll FL, Kappelle LJ, Visseren FLJ, van der Graaf Y, et al. Asymptomatic carotid artery stenosis and the risk of ischemic stroke according to subtype in patients with clinically manifest arterial disease. *Stroke*. 2013;44:1002-1007.
62. Dorheim MA, Tracey WR, Pollock JS, Grammas R Nitric oxide synthase activity is elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 659–65.
63. Durand M. K. V., Bødker J. S., Christensen A., Dupont D. M., Hansen M., Jensen J. K., Kjelgaard S., Mathiasen L., Pedersen K. E., Skeldal S., Wind T., Andreasen P. A. Plasminogen activator inhibitor-1 and tumour growth, invasion, and metastasis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2004;91(3):438–449.
64. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis.. *JAMA*. 1995 May 10;273(18):1421-8.
65. Esper R.J., Nordaby R.A., Vilarino J.O. et al. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovascular Diabetology*. 2006. Vol. 5 (4). P. 1-18.
66. Evora PR, Baldo CF, Celotto AC, Capellini VK. Endothelium dysfunction classification: why is it still an open discussion? *Int J Cardiol*. 2009 Oct 2; 137(2):175-6.
67. Fard A, Tuck CH, Donis JA, et al. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:2039–2044.

68. Feaver RE, Gelfand BD, Wang C, Schwartz MA, Blackman BR. Atheroprone hemodynamics regulate fibronectin deposition to create positive feedback that sustains endothelial inflammation. *Circ. Res.* 2010;106: 1703-1711
69. Fickling, S.; Leone, A.; Nussey, S.; Vallance, P.; Whitley, G. Synthesis of NG, NG dimethylarginine by human endothelial cells. *Endothelium* 1993, 1, 137–140.
70. Förstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006;113:1708–1714.
71. Forstermann, U., Mugge, A., Alheid, U., Haverich, A., Frolich, J.C., 1988. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ. Res.* 62, 185–190.
72. Freedman JE, Sauter R, Battinelli EM, et al. Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ Res.* 1999;84:1416–1421.
73. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, et al. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10: 111–113
74. Furuki K, Adachi H, Enomoto M, et al. Plasma level of asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a predictor of carotid intima-media thickness progression: six-year prospective study using carotid ultrasonography. *Hypertens Res* 2008; 31: 1185-9
75. Furuki K, Adachi H, Matsuoka H, et al. Plasma levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) are related to intima-media thickness of the carotid artery: an epidemiological study. *Atherosclerosis* 2007; 191: 206-10.
76. Gardener H., Sjoberg C., Crisby M, et al. Adiponectin and carotid intima-media thickness in the northern Manhattan study. *Stroke* 2012;43:1123–1125.

77. Garg PK, McClelland RL, Jenny NS, Criqui MH, Greenland P, Rosenson RS, Siscovick DS, Jorgensen N, Cushman M. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of incident cardiovascular disease in a multi-ethnic cohort: The multi ethnic study of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2015 May 16;241(1):176-182.
78. Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P, Ruiz J. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme: a possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest*. 1997; 99: 62–66.
79. Giannoglou GD, Koskinas KC, Tziakas D, et al. Total cholesterol content of erythrocyte membranes and coronary atherosclerosis. An intravascular ultrasound pilot study. *Angiology*. 2010;60:676 – 82.
80. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, et al. (1994) Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 7: 195–200.
81. Grundy SM. Atherosclerosis imaging and the future of lipid management. *Circulation*. 2004;110(23):3509-11.
82. Gu L, Okada Y, Clinton SK, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*. 1998;2:275–281.
83. Gumanova NG, Teplova NV, Ryabchenko AU, Denisov EN. Serum nitrate and nitrite levels in patients with hypertension and ischemic stroke depend on diet: a multicenter study. *Clin Biochem*. 2015 Jan;48(1-2):29-32.
84. Hahn C, Schwartz MA. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2009;10: 53-62
85. Hamsten A., Walldius G., Szamosi A., Blombäck M., De Faire U., Dahlénf G., Landou C., Wiman B. Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *The Lancet*. 1987;2(8549):3–9.

86. Hegele RA, Connelly PW, Scherer SW, Hanley AJG, Harris SB, Tsui L-C, Zinman B. Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:3373–3377.
87. Hegele RA. Paraoxonase genes and disease. *Ann Med.* 1999;31: 217–224.
88. Hennerici M, Hülsebömer HB, Hefter H, Lammerts D, Rautenberg W. Natural history of asymptomatic extracranial arterial disease. Results of a long-term prospective study. *Brain.* 1987 Jun;110(Pt 3):777-91.
89. Herrmann SM1, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Cambien F. The P-selectin gene is highly polymorphic: reduced frequency of the Pro715 allele carriers in patients with myocardial infarction. *Hum Mol Genet.* 1998 Aug;7(8):1277-84.
90. Hoekstra T, Geleijnse JM, Kluft C, et al. 4G/4G genotype of PAI-1 gene is associated with reduced risk of stroke in elderly. *Stroke* 2003; 34: 2822–8.
91. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1595–1599.
92. Howard DPJ, van Lammeren GW, Redgrave JN, Moll FL, de Vries JPPM, de Kleijn DPV, et al. Histological features of carotid plaque in patients with ocular ischemia versus cerebral events. *Stroke.* 2013;44:734-739.
93. Hsieh H, Liu CA, Huang B, Tseng AHH, Wang DL. Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications. *Journal of Biomedical Science.* 2014, 21:3
94. Huang Z, Shiva S, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Ringwood LA, Irby CE, Huang KT, Ho C, Hogg N, Schechter AN, Gladwin MT. Enzymatic

- function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *J Clin Invest.* 2005 Aug; 115(8):2099-107.
95. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet.* 1993; 3: 73–76.
 96. Hunter SJ, Garvey WT. Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. *Am J Med.* 1998;105:331–345.
 97. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med.* 2003 Jan; 9(1):61-7.
 98. Iglseder B, Mackevics V, Stadlmayer A, Tasch G, Ladurner G, Paulweber B. Plasma adiponectin levels and sonographic phenotypes of subclinical carotid artery atherosclerosis: data from the SAPHIR Study. *Stroke.* 2005 Dec;36(12):2577-82.
 99. Inouye M, Ripatti S, Kettunen J, Lyytikäinen L-P, Oksala N, et al. (2012) Novel Loci for Metabolic Networks and Multi-Tissue Expression Studies Reveal Genes for Atherosclerosis. *PLoS Genet* 8(8): e1002907. doi:10.1371/journal.pgen.1002907
 100. Janssens S, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1992;267(21):14519–14522.
 101. Johnson-Tidey, R.R., McGregor, J.L., Taylor, P.R. and Poston, R.N. (1994) Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am. J. Pathol.*, 144, 952–961.
 102. Juhan-Vague I., Alessi M. C., Joly P., Thirion X., Vague P., Declercq P. J., Serradimigni A., Collen D. Plasma plasminogen activator inhibitor-1 in

- angina pectoris. Influence of plasma insulin and acute-phase response. *Arteriosclerosis*. 1989;9(3):362–367.
103. Kang et al. Adipokines, inflammation, insulin resistance, and carotid atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2013,15:R194
 104. Kielstein J.T., Donnerstag F., Gasper S., Menne J., Kielstein A., Martens-Lobenhoffer J., et al. ADMA increases arterial stiffness and decreases cerebral blood flow in humans. *Stroke* 2006;37:2024–2029.
 105. Kielstein J.T., Impraim B., Simmel S., Bode-Boger S.M., Tsikas D., Frolich J.C., et al. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 2004;109:172–177.
 106. Knottnerus IL, Govers-Riemslog JW, Hamulyak K, Rouhl RP, Staals J, Spronk HM, van Oerle R, van Raak EP, Lodder J, ten Cate H, van Oostenbrugge RJ. Endothelial activation in lacunar stroke subtypes. *Stroke*. 2010 Aug; 41(8):1617-22.
 107. Koenen RR, Weber C. Chemokines: established and novel targets in atherosclerosis. *EMBO Molecular medicine*.2011;3: 713–725.
 108. Koskinas KC, Giannoglou GD. Intraplaque hemorrhage, RBC-derived cholesterol, and plaque progression. Time to move from conjecture to evidence? *JACC: Cardiovascular imaging*. 2012;5(11):1181-1185.
 109. Koyama H, Maeno T, Fukumoto S, Shoji T, Yamane T, Yokoyama H, Emoto M, Shoji T, Tahara H, Inaba M, Hino M, Shioi A, Miki T, Nishizawa Y. Platelet P-selectin expression is associated with atherosclerotic wall thickness in carotid artery in humans. *Circulation*. 2003 Aug 5; 108(5):524-9.
 110. Krempl T.K., Maas R., Sydow K., Meinertz T., Boger R.H., and Kahler J. Elevation of asymmetric dimethylarginine in patients with unstable angina and recurrent cardiovascular events. *Eur Heart J* 2005;26:1846–1851.

111. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, et al. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation*. 2001;104:448–454.
112. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, Okamoto Y, Shimomura I, Hiraoka H, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y; Osaka CAD Study Group. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:85–89.
113. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial Function: A Critical Determinant in Atherosclerosis? *Circulation*. 2004;109:II-27-II-33
114. Landmesser U., Hornig B., Drexler H. Endothelial function. A critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 2004. Vol. 109 (suppl II). P. 1127-1123.
115. Lange LA, Croteau-Chonka DC, Marvelle AF, Qin L, Gaulton KJ, et al. (2010) Genome-wide association study of homocysteine levels in Filipinos provides evidence for CPS1 in women and a stronger MTHFR effect. *Hum Mol Genet* 19: 2050–2058
116. Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, et al. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol*. 1999;276:H1943–H1950.
117. Leong T., Zylberstein D., Graham I., Lissner L., Ward D., Fogarty J., et al. Asymmetric dimethylarginine independently predicts fatal and nonfatal myocardial infarction and stroke in women: 24-year follow-up of the population study of women in Gothenburg. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:961–967.
118. Libby P, Ridker PM, Hansson GK, Leducq. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice.
119. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;150:1135–1143.

120. Lijnen H. R. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005;3(1):35–45.
121. Lima LM, Carvalho Md, Fonseca Neto CP, Garcia JC, Sousa MO. PAI-1 4G/5G polymorphism and plasma levels association in patients with coronary artery disease. *Arq Bras Cardiol*. 2011 Dec; 97(6):462-389.
122. Lloyd-Jones D.M., Wilson P.W., Larson M.G., Beiser A., Leip E.P., D'Agostino R.B., Levy D. Framingham risk score and prediction of lifetime risk for coronary heart disease. // *Am. J. Cardiol.* - 2004. Vol. 94 (1).- P. 20 - 24.
123. Lo L.Y., Luk Y., Wong W.J. et al. A follow-up study of asymptomatic carotid stenosis. 2-nd World congress of stroke. Washington. USA. 1992. Abstr. P.43.
124. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res*. 2001;88:756–762.
125. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233–241.
126. Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI. Paraonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 1451–1457.
127. Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, Boulton AJM, Mackness MI. Low paraonase activity in type II diabetes complicated by retinopathy. *Clin Sci*. 2000;98:355–363.
128. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Lack of protection against oxidative modification of LDL by avian HDL. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;247:443– 446.
129. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the molecular polymorphisms of human paraonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraon. *Br J Pharmacol*. 1997;112:265–268.
130. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the human serum paraonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the

- protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett.* 1998;423:57–60.
131. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Julier K, Abuasha B, Miller JE, Boulton AJ, Durrington PN. Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis.* 1998; 139: 341–349.
 132. Mackness MI, Abbott CA, Arrol S, Durrington PN. The role of high density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J.* 1993;294:829–835.
 133. Mackness MI, Arrol S, Abbott CA, Durrington PN. Protection of lowdensity lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis.* 1993;104:129–135.
 134. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991;286: 152–154.
 135. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol.* 1996;7:69 –76.
 136. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;221:286 –289.
 137. Markus HS, King A, Shipley M, Topakian R, Cullinane M, Reihill S, et al. Asymptomatic embolisation for prediction of stroke in the Aymptomatic Carotid Emboli Study (ACES): a prospective observational study. *Lancet Neurol.* 2010;9:663-71.
 138. Marquardt L, Geraghty OC, Mehta Z, Rothwell PM. Low risk of ipsilateral stroke in patients with asymptomatic carotid stenosis on best medical treatment a prospective, population-based study. *Stroke.* 2010;41:e11-e17.

139. Massot, A. et al. Predictive value of ankle-brachial index and PAI-1 in symptomatic intracranial atherosclerotic disease recurrence. *Atherosclerosis*, Volume 233 , Issue 1 , 186 - 189
140. Masuda H, Goto M, Tamaoki S. Accelerated intimal hyperplasia and increased endogenous inhibitors for NO synthesis in rabbits with alloxan-induced hyperglycemia. *Br J Pharmacol*. 1999;126:211–218.
141. Mathiesen EB, Waterloo K, Joakimsen O, Bakke SJ, Jacobsen EA, Bønaa KH. Reduced neuropsychological test performance in asymptomatic carotid stenosis: The Tromsø Study. *Neurology* 2004; 9;62(5):695-701.
142. Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, et al. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis: The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem* 2002; 277: 37487 – 37491.
143. McCarthy MJ, Loftus IM, Thompson MM, et al. Angiogenesis and the atherosclerotic carotid plaque: an association between symptomatology and plaque morphology. *J Vasc Surg* 1999; 30:261–268
144. Meinitzer A., Seelhorst U., Wellnitz B., Halwachs-Baumann G., Boehm B.O., Winkelmann B.R., et al. Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study). *Clin Chem* 2007;53:273–283.
145. Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, Valeri CR. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 15; 93(21):11877-82.
146. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99: 1141-6

147. Mofidi R, Crotty TB, McCarthy P, Sheehan SJ, Mehigan D, Keaveny TV. Association between plaque instability, angiogenesis and symptomatic carotid occlusive disease. *Br J Surg* 2001; 88:945–950
148. Moneta G.L., Taylor D.C., Nicholls S.C. et al. Operative versus nonoperative management of asymptomatic high-grade internal carotid artery stenosis: improved results with endarterectomy. *Stroke*. 1987. Vol. 18 №6:1005-1010.
149. Motoshima H, Wu XD, Mahadev K, Goldstein BJ. Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells with oxidized LDL. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004;315: 264–271
150. Muniyappa R, Iantorno M, Quon MJ. An integrated view of insulin resistance and endothelial dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(3):685–711. doi: 10.1016/j.ecl.2008.06.001.
151. Muris DM, Houben AJ, Schram MT, Stehouwer CD. Microvascular Dysfunction Is Associated With a Higher Incidence of Type 2 Diabetes Mellitus--Brief Report: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012
152. Nicolaidis AN, Kakkos SK, Kyriacou E, Griffin M, Sabetai M, Thomas DJ, et al. Asymptomatic internal carotid artery stenosis and cerebrovascular risk stratification. *J Vasc Surg*. 2010;52:1486-96.
153. Okamoto Y, Arita Y, Nishida M, Muraguchi M, Ouchi N, Takahashi M, Igura T, Inui Y, Kihara S, Nakamura T, Yamashita S, Miyagawa J, Funahashi T, Matsuzawa Y. An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls. *Horm Metab Res*. 2000;32: 47–50.
154. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2002;106:2767–2770.

155. Olken, N.M.; Marletta, M.A. NG-methyl-L-arginine functions as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase. *Biochemistry* 1993, 32, 9677–9685.
156. Onalan O, Balta G, Oto A, Kabakci G, Tokgozoglu L, Aytemir K, Altay C, Gurgey A, Nazli N J. Plasminogen activator inhibitor-1 4G4G genotype is associated with myocardial infarction but not with stable coronary artery disease. *Thromb Thrombolysis*. 2008 Dec; 26(3):211-7.
157. Osto E, Cosentino F. The role of oxidative stress in endothelial dysfunction and vascular inflammation. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. 2nd edn. London: Academic Press; 2010. pp. 705–754.
158. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*. 1999;100: 2473–2476.
159. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adipocytederived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*. 2001;103:1057–1063.
160. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, an adipocytederived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*. 2000;102:1296 –1301.
161. Ouedraogo R, Gong Y, Berzins B, Wu X, Mahadev K, et al. (2007) Adiponectin deficiency increases leukocyte-endothelium interactions via upregulation of endothelial cell adhesion molecules in vivo. *J Clin Invest* 117: 1718–1726

162. Palm, F.; Onozato, M.L.; Luo, Z.; Wilcox, C.S. Dimethylargininedimethylaminohydrolase (DDAH): Expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007, 293, H3227–H3245.
163. Pandolfi A, Cetrullo D, Polishuck R, Alberta MM, Calafiore A, Pellegrini G, Vitacolonna E, Capani F, Consoli A. Plasminogen activator inhibitor type 1 is increased in the arterial wall of type II diabetic subjects.. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Aug; 21(8):1378-82
164. Paré G, Chasman DI, Parker AN, Zee RRY, Mälarstig A, et al. (2009) Novel associations of CPS1, MUT, NOX4, and DPEP1 with plasma homocysteine in a healthy population: a genome-wide evaluation of 13 974 participants in the Women's Genome Health Study. *Circ Cardiovasc Genet* 2: 142–150.
165. Pikula A, Böger RH, Beiser AS, et al. Association of plasma ADMA levels with MRI markers of vascular brain injury: Framingham offspring study. *Stroke.* 2009;40:2959–64.
166. Pizzarelli F, Maas R, Dattolo P, Tripepi G, Michelassi S, D'Arrigo G, Mieth M, Bandinelli S, Ferrucci L, Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine predicts survival in the elderly. *Age (Dordr).* 2013 Dec;35(6):2465-75.
167. Prati P, Vanuzzo D, Casaroli M, Di Chiara A, De Biasi F, Feruglio GA, Touboul PJ. Prevalence and determinants of carotid atherosclerosis in a general population. *Stroke.* 1992 Dec;23(12):1705-11.
168. Primo-Parma SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 1996;33:498 –509.
169. Puranik R, Celermajer DS. Smoking and endothelial function. *Progr Cardiovasc Dis.* 2003;45:443–458.
170. Qian H, Neplioueva V, Shetty GA, et al. Nitric oxide synthase gene therapy rapidly reduces adhesion molecule expression and inflammatory cell

- infiltration in carotid arteries of cholesterol-fed rabbits. *Circulation*. 1999;99:2979–2982.
171. Ranade K, Kirchgessner TG, Iakoubova OA, Devlin JJ, DelMonte T, Vishnupad P, Hui L, Tsuchihashi Z, Sacks FM, Sabatine MS, Braunwald E, White TJ, Shaw PM, Dracopoli NC. Evaluation of the paraoxonases as candidate genes for stroke: Gln192Arg polymorphism in the paraoxonase 1 gene is associated with increased risk of stroke. *Stroke*. 2005 Nov;36(11):2346-50.
172. Redgrave JN, Gallagher P, Lovett JK, Rothwell PM. Critical cap thickness and rupture in symptomatic carotid plaques: the Oxford plaque study. *Stroke* 2008; 39:1722–1729
173. Redgrave JN, Lovett JK, Gallagher PJ, Rothwell PM. Histological assessment of 526 symptomatic carotid plaques in relation to the nature and timing of ischemic symptoms: the Oxford plaque study. *Circulation* 2006; 113:2320–2328
174. Redmond EM, Cullen JP, Cahill PA, Sitzmann JV, Stefansson S, Lawrence DA, Okada SS. Endothelial cells inhibit flow-induced smooth muscle cell migration: role of plasminogen activator inhibitor-1. *Circulation*. 2001 Jan 30; 103(4):597-603.
175. Richardson, JD, Main, KA. Carotid endarterectomy in the elderly population: a statewide experience. *J Vasc Surg*. 1989;9:65–73.
176. Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation*. 2001 Jan 30; 103(4):491-5.
177. Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost*. 2009 Jan; 7(1):4-13.
178. Robertson KS, Hawe E, Miller GJ, Talmud PJ, Humphries SE, Northwick Park Heart Study II. Human paraoxonase gene cluster polymorphisms as predictors of coronary heart disease risk in the prospective Northwick Park Heart Study II. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1639:203–212.

179. Ross R. Atherosclerosis: the role of endothelial injury, smooth muscle proliferation and platelet factors. *Triangle*. 1976;15(2-3):45-51.
180. Rowles J, Scherer SW, Xi T, Majer M, Nickle DC, Rommans JM, Popov KM, Harris RA, Riebow NL, Xia J, et al. Cloning and characterization of PDK4 on 7q21.3 encoding a fourth pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme in human. *J Biol Chem*. 1996;271:22376–22382.
181. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*. 1986 May; 250(5 Pt 2):H822-7.
182. S Arlt, F Schulze, M Eichenlaub, R Maas, K Wiedemann, R Böger, H Jahn. Asymmetrical dimethylarginine is increased in plasma and decreased in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry* 2009; 42 - A3. DOI: 10.1055/s-0029-1240075
183. Schneiderman J, Sawdey MS, Keeton MR, Bordin GM, Bernstein EF, Dilley RB, Loskutoff DJ. Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug 1; 89(15):6998-7002.
184. Schneiderman J., Sawdey M. S., Keeton M. R., Bordin G. M., Bernstein E. F., Dilley R. B., Loskutoff D. J. Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(15):6998–7002.
185. Schober A, Manka D, von Hundelshausen P, Huo Y, Hanrath P, Sarembock IJ, Ley K, Weber. Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury. *Circulation*. 2002 Sep 17; 106(12):1523-9.
186. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PW, Belanger AJ, O'Leary DH, Wolf PA, Schaefer EJ, Rosenberg IH. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *The New England journal of medicine*. 1995 Feb 2;332(5)

187. Shih DM, Gu L, Xia Y-R, Navab M, Li W-F, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*. 1998;394:284–287.
188. Simionescu M. Cellular dysfunction in inflammatory-related vascular disorders' review series. The inflammatory process: a new dimension of a 19 century old story. *J Cell Mol Med*. 2009;13: 4291-4292
189. Spencer M., Reid J. Quantitation of Carotid Stenosis with Continuous-Wave (C-W) Doppler Ultrasound. *Stroke* 1979; Vol 10, No 3, 326-330.
190. Spiegelman BM, Choy L, Hotamisligil GS, Graves RA, Tontonoz P. Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *J Biol Chem*. 1993;268:6823– 6826.
191. Strandberg L, Lawrence D, Ny T. The organization of the human-plasminogen-activator-inhibitor-1 gene. Implications on the evolution of the serine-protease inhibitor family. *Eur J Biochem* 1988; 176: 609–16.
192. Strijdom H, Chamane N, Lochner A. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. *Cardiovasc J Afr*. 2009;20:303–310.
193. Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven JM, Tsao PS. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA*. 2002;287:1420–1426.
194. Sun J, Underhill HR, Hippe DS, Xue Y, Yuan C, Hatsukami TS. Sustained acceleration in carotid atherosclerotic plaque progression with intraplaque hemorrhage. *JACC: Cardiovascular imaging*. 2012;5(8):798-804.
195. Takaya N, Yuan C, Chu B, et al. Association between carotid plaque characteristics and subsequent ischemic cerebrovascular events: a prospective assessment with MRI—initial results. *Stroke* 2006; 37:818–823
196. Takeuchi S, Wada K, Uozumi Y, Otani N, Osada H, Nagatani K, Mori K. Adiponectin receptor 1 expression is associated with carotid plaque stability. *Neurol India* 2013;61:249-53.

197. Thögersen AM, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Weinehall L, Huhtasaari F, Hallmans G. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation*. 1998 Nov 24; 98(21):2241-7.
198. Tomita H, Egashira K, Kubo-Inoue M, et al. Inhibition of NO synthesis induces inflammatory changes and monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat hearts and vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1456–1464.
199. Transatlantic Network on Atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Dec 1; 54(23):2129-38.
200. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Bonovas S, Kopterides P, Vaiopoulos G. The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk. *Thromb Res*. 2008; 122(6):736-42.
201. Tsao PS, Theilmer G, Singer AH, et al. L-arginine attenuates platelet reactivity in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:1529–1533.
202. Turk AS, Chaudry I, Haughton VM, Hermann BP, Rowley HA, Pulfer K, Aagaard-Kienitz B, Niemann DB, Turski PA, Levine RL, Strother CM. Effect of carotid artery stenting on cognitive function in patients with carotid artery stenosis: preliminary results. *Am J Neuroradiol* 2008;29(2):265-8.
203. Tziakas DN, Kaski JC, Chalikias GK, et al. Total cholesterol content of erythrocyte membranes is increased in patients with acute coronary syndrome: a new marker of clinical instability? *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:2081–9.
204. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572-5.

205. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, et al. (1998) A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 62: 1044–1051
206. Vaughan DE. PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost.* 2005 Aug; 3(8):1879-83.
207. Vincent MA, Clerk LH, Lindner JR, Klibanov AL, Clark MG, Rattigan S, et al. Microvascular recruitment is an early insulin effect that regulates skeletal muscle glucose uptake in vivo. *Diabetes.* 2004;53(6):1418–1423.
208. Virmani R, Ladich ER, Burke AP, Kolodgie FD. Histopathology of carotid atherosclerotic disease. *Neurosurgery* 2006; 59(5 suppl 3):S219–S227
209. Volcik KA, Ballantyne CM, Coresh J, Folsom AR, Wu KK, Boerwinkle E. P-selectin Thr715Pro polymorphism predicts P-selectin levels but not risk of incident coronary heart disease or ischemic stroke in a cohort of 14595 participants: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Atherosclerosis.* 2006 May;186(1):74-9.
210. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Fault KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low-density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1995;96:2882–2891.
211. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R (1998) A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 64: 169–172.
212. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, et al. (2001) The 1298A>C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 156: 409–415
213. Wheeler JG, Keavney BD, Watkins H, Collins R, Danesh J. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease

- and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet*. 2004;363: 689–695.
214. Widmer RJ, Lerman A. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2014; 2014(3): 291–308.
215. Woolard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7(2): 77–86.
216. Yada T., Kaji S., Akasaka T., Mochizuki S., Ogasawara Y., Tanemoto K., et al. Changes of asymmetric dimethylarginine, nitric oxide, tetrahydrobiopterin, and oxidative stress in patients with acute myocardial infarction by medical treatments. *Clin Hemorheol Microcirc* 2007;37:269–276.
217. Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:3815–3819.
218. Yang Z, Ming X-Z. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin Med Res*. 2006;4:53–65.
219. Yasar Yildiz S, Kuru P, Toksoy Oner E, Agirbasli M. Functional Stability of Plasminogen Activator Inhibitor-1. *The Scientific World Journal* 2014;2014:858293.
220. Yeni-Komshian H, Carantoni M, Abbasi F, Reaven GM. Relationship between several surrogate estimates of insulin resistance and quantification of insulin-mediated glucose disposal in 490 healthy nondiabetic volunteers. *Diabetes Care*. 2000;23:171–175.
221. Yoon J-H, Kim S-K, Choi H-J, Choi S-I, Cha S-Y, et al. (2013) Adiponectin Provides Additional Information to Conventional Cardiovascular Risk Factors for Assessing the Risk of Atherosclerosis in Both Genders. *PLoS ONE* 8(10): e75535. doi:10.1371/journal.pone.0075535

222. Začiragić A, Huskić J, Mulabegović N, Avdagić N, Valjevac A, Hasić S, et al. An assessment of correlation between serum asymmetric dimethylarginine and glycated hemoglobin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Bosn J Basic Med Sci.* 2014;14(4):21–24.
223. Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, et al. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res.* 1995;76:980–986.
224. Zeng G, Quon MJ Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1996;98(4):894–898.
225. Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a cardiovascular and renal risk factor on the move. *J Hypertens* 2006;24:611–619

Работы, опубликованные автором

226. Khamidova Z.M., Shabalina A.A., Kostyreva M.V., Abramycheva N.Y., Raskurazhev A.A., Illaryoshkin S.N., Tanashyan M.M., Suslina Z.A. Hemorheological parameters and gene polymorphisms in patients with cerebral atherosclerosis receiving antiplatelet therapy. *Cerebrovasc Dis* 2013;35(suppl 3):1–2 (e-book: p. 443)
227. Maksyutkina L.N., Shabalina A.A., Kostyreva M.V., Petrukhina S.Y., Raskurazhev A.A., Lagoda O.V., Tanashyan M.M. Plaque Morphology and Biomarkers of Carotid Atherosclerosis. *Cerebrovasc Dis* 2013;35(suppl 3):1–2 (e-book: p. 759)
228. Raskurazhev A.A., Maksyutkina L.N., Tanashyan M.M., Lagoda O.V., Shabalina A.A., Chechetkin A.O. Biomarkers of carotid atherosclerosis progression. *Cerebrovasc Dis* 2014b;37(suppl 1):1–2. (e-book: p. 583).
229. Raskurazhev A.A., Tanashyan M.M., Khamidova Z.M., Abramycheva N. Yu., Illaryoschkin S.N.. Gene polymorphisms in patients with

- asymptomatic carotid atherosclerosis. *Cerebrovascular Diseases* 2015a, Vol. 39, Suppl. 2, p.199.
230. Raskurazhev A.A., Tanashyan M.M., Lagoda O.V., Shabalina A.A., Kostyreva M.V., Chechetkin A.O. Biomarker profile in patients with asymptomatic carotid artery stenosis. *Cerebrovascular Diseases* 2015b, Vol. 39, Suppl. 2, p.208.
231. Раскуражев А.А., Танащян М.М., Иллариошкин С.Н., Абрамычева Н.Ю., Лагода О.В., Хамидова З.М. Генетические полиморфизмы у пациентов с асимптомным атеросклерозом брахиоцефальных артерий. *Медицинская генетика*, 2015, №3, С.74.
232. Танащян М.М., Лагода О.В., Гулевская Т.С., Максюткина Л.Н., Раскуражев А.А. Клинико-морфологические и биохимические маркеры прогрессирования атеросклероза сонных артерий. **Журнал неврології ім. Б.М. Маньковського**. 2013а;1: 38-42.
233. Танащян М.М., Лагода О.В., Гулевская Т.С., Максюткина Л.Н., Раскуражев А.А. Прогрессирующий церебральный атеросклероз: клинические, биохимические и морфологические аспекты. **Анналы клинической и экспериментальной неврологии**. 2013б;4:4-10.
234. Танащян М.М., Максюткина Л.Н., Лагода О.В., Раскуражев А.А., Шабалина А.А., Костырева М.В. Цереброваскулярные заболевания и каротидный атеросклероз: биомаркеры воспаления и коагуляции. **Клиническая неврология**, 2013в.-N 3.-С.16-23.
235. Танащян М.М., Раскуражев А.А., Лагода О.В., Шабалина А.А., Антонова К.В. Цереброваскулярная патология на фоне метаболического синдрома: клинические наблюдения. *Атмосфера. Нервные болезни*. 2013г;4:56-60.