

На правах рукописи

РАСКУРАЖЕВ АНТОН АЛЕКСЕЕВИЧ

**АСИМПТОМНЫЕ СТЕНОЗЫ ВНУТРЕННИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ:
БИОМАРКЕРЫ АТЕРОГЕНЕЗА**

14.01.11 - нервные болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр неврологии»

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор **Танащян Маринэ Мовсесовна**

Официальные оппоненты:

Савин Алексей Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры нервных болезней лечебного факультета Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Московского государственного медико-стоматологического университета имени А.И. Евдокимова Министерства здравоохранения Российской Федерации

Дамулин Игорь Владимирович, доктор медицинских наук, профессор кафедры нервных болезней лечебного факультета Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского

Защита диссертации состоится «06» «октября» 2015 года в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.006.01 при ФГБНУ НЦН по адресу: 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ НЦН по адресу: 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80 и на сайте www.neurology.ru

Автореферат разослан «__» «_____» 2015 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 001.006. 01,
кандидат медицинских наук

Гнедовская Е.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Атеросклероз – это 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 (Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study, 1995).

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).

Последние могут быть представлены как биологическими молекулами, отражающими то или иное звено атерогенеза (эндотелиальная дисфункция, нарушения липидного обмена, воспалительная реакция, патология гемореологии и гемостаза), так и различными генетическими альтерациями, ассоциированными с проатерогенными эффектами.

В связи с этим очевидна актуальность исследования, **целью** которого 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 [PAI-1], NO_3^- , NO_2^- , асимметричный диметиларгинин [ADMA]) 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).

Внедрение результатов работы

Полученные результаты внедрены в практику работы неврологических отделений, лабораторий гемореологии и гемостаза, молекулярной генетики ФГБНУ НЦН.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 3 статьи в изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ. Подана патентная заявка на изобретение №2015124791 от 24.06.2015.

Личный вклад автора

Автору принадлежит определяющая роль в разработке протокола исследования, постановке задач, в обосновании выводов и практических рекомендаций. Автором проанализированы основные отечественные и зарубежные источники литературы. Самостоятельно проведены обследование и лечение больных с цереброваскулярной патологией, первичная лабораторная обработка образцов крови пациентов. Аналитическая и статистическая обработка, обобщение полученных данных выполнены непосредственно автором.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 141 странице машинописного текста; состоит из введения, обзора литературы, описания объема и методов исследования, включающего характеристику пациентов, изложения методик иммуноферментного и молекулярно-генетического анализов крови, результатов собственных исследований (приводится в 5 подглавах), обсуждения полученных результатов, выводов и практических рекомендаций.

Работа иллюстрирована 23 рисунками и содержит 22 таблицы. Библиографический указатель включает в себя 235 источников, из них – 13 отечественных, 212 зарубежных и 10 собственных публикаций.

ОБЪЕМ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика больных

В группу исследования (основную) было включено 117 пациентов с «асимптомными» стенозами одной из внутренних сонных артерий (не менее 50%). Критерием «асимптомности» стеноза, в соответствие с текущими рекомендациями, являлось отсутствие ишемического инсульта в бассейне пораженной внутренней сонной артерии (ВСА) в течение 6 месяцев от времени выявления стеноза. Однако в настоящей работе 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%).

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.).

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 этих пациентов составил $53,4 \pm 11,6$ лет; несколько преобладали женщины (61%).

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.

Согласно критериям Всероссийского научного общества кардиологов (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: $ИМТ = \text{вес (кг)} / \text{рост (м)}^2$.

Методы исследования

Изучение клинической картины заболевания проводилось на основании данных анамнеза, соматической и неврологической симптоматики. С целью объективизации неврологического статуса пациентов в настоящей работе была проведена его оценка по балльной рейтинговой шкале со стандартизированными критериями оценки и степени выраженности субъективной и объективной симптоматики (Суслина З.А., Смирнова И.Н., 2003). 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.

Исходя из основной цели работы, всем пациентам было проведено изучение биохимических показателей, отражающих эндотелиальную функцию (система оксида азота и метаболитов, асимметричный диметиларгинин), состояние фибринолитической системы крови (тканевой активатор плазминогена [t-PA], ингибитор активатора плазминогена-1 [PAI-1]) и липидного обмена (адипонектин), а также определение генетических

полиморфизмов, ответственных за повышение тромбогенного потенциала крови и потенциально играющих роль в атерогенезе.

Исследование биомаркеров проводилось на базе лаборатории гемореологии и нейроиммунологии с клинической лабораторной диагностикой ФГБНУ НЦН. Исследования проводились с использованием микропланшетного ридера Victor², Perkin-Elmer (США).

Оксид азота (NO) и метаболиты (NO₃⁻, NO₂⁻) исследовались с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с применением биохимического метода с использованием набора Total NO/Nitrite/Nitrate Assay фирмы R&D Systems (США).

Асимметричный диметиларгинин (АДМА) определялся с помощью конкурентного ИФА с использованием набора реагентов фирмы Immundiagnostik (Германия).

Определение *t-PA* и *PAI-1* проводилось по принципу ИФА «сэндвич»-типа с использованием наборов реагентов компании Technoclone (Австрия).

Адипонектин определялся методом ИФА «сэндвич»-типа с использованием набора реагентов компании BioVendor (Чехия).

Генетические исследования для настоящей работы выполнялись на базе ДНК-лаборатории отделения нейрогенетики ФГБНУ НЦН. 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. 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. Праймеры и зонды, в том числе их дизайн, были разработаны и синтезированы в научно-производственной компании «Синтол».

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, использовали наборы "SNP-Скрин" компании «Синтол», позволяющие определять однонуклеотидные замены методом ПЦР-РВ.

Цветовое дуплексное сканирование брахиоцефальных артерий выполнялось на приборах Logiq 9 («GE») и iU 33 («Phillips») с использованием линейного датчика с частотой излучения 5,5 - 12 МГц и конвексного датчика с частотой излучения 3,5 МГц по общепринятой методике (Кунцевич Г.И., 2006).

Статистическая обработка результатов проводилась на Intel-совместимом персональном компьютере с применением программ MicrosoftExcel, а также пакета компьютерных прикладных программ Statistica, версия 10.0. При этом применялись следующие непараметрические методы: анализ связи (корреляции) двух признаков (метод Спирмена); сопоставление двух независимых групп по количественному признаку (с использованием U-критерия Манн-Уитни); сопоставление двух групп по точному критерию Фишера; описательная статистика. Данные представлены в виде медианы, 25% и 75% квартилей: Me [25%; 75%]. Статистическая достоверность принималась при $p < 0,05$.

Диссертационное исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол № 15/12 от 19.12.12 г.). Всеми пациентами было подписано информированное согласие.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клиническая характеристика обследованных больных

Основной сосудистой 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 (Рис. 1). Кардиальная патология, в основном представленная ишемической болезнью сердца (ИБС), встречалась в 28% случаев (n = 33), из них в 8 случаях имел место постинфарктный кардиосклероз, в 11 – стенокардия напряжения.

Метаболический синдром согласно вышеуказанным критериям был диагностирован у 30% (n = 35) больных. При этом изолированные нарушения углеводного обмена составляли достаточно распространенную патологию среди пациентов в группе исследования: так, сахарный диабет 2-го типа (СД) встречался в 18% случаев (n = 21).

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.

Пациенты с МС в этой группе составили 11% (n = 12), при этом нарушение углеводного обмена было диагностировано у 11 человек (10,5%), а

средний показатель ИМТ у пациентов контрольной группы составил 23,6[19,4; 27,3] кг/м².

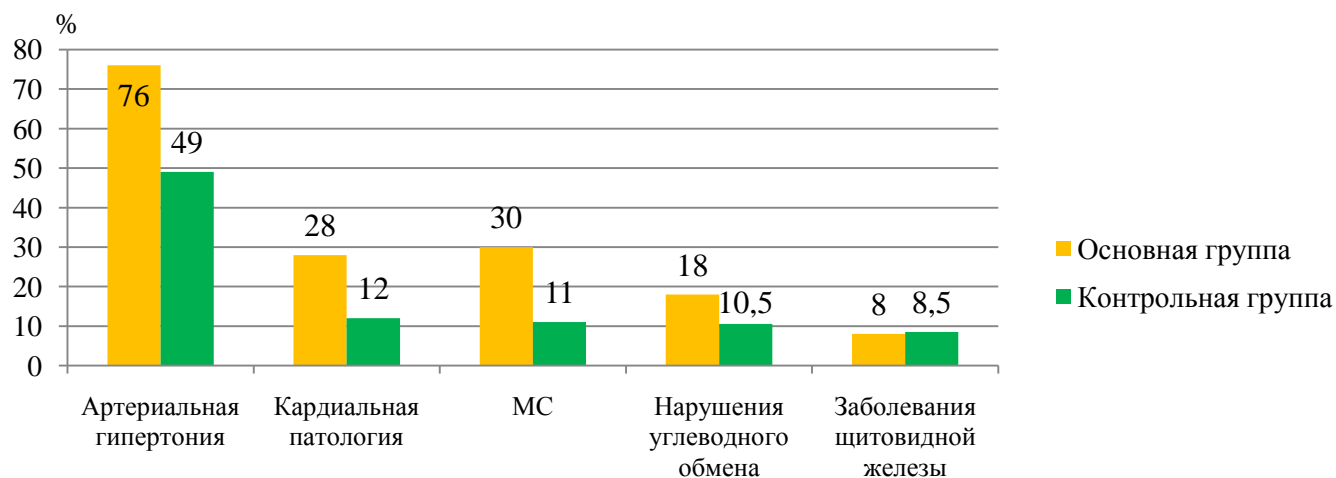


Рис. 1 Наиболее частые заболевания у обследованных

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 у этих больных основным синдромом являлся цефалгический. Головные боли встречались достаточно часто, в 56% случаев ($n = 65$), имели в подавляющем большинстве «давящий», «тупой» характер, локализовались в лобно-височной и затылочной областях.

Реже у больных основной группы выявлялись когнитивные нарушения, которые 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 МоСА и возрастом пациентов (коэффициент ранговой корреляции Спирмена $R = -0,22$). В общей сложности у 79% ($n = 93$) пациентов балл по МоСА был ниже 28 (Рис. 2). 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 не выявлено.

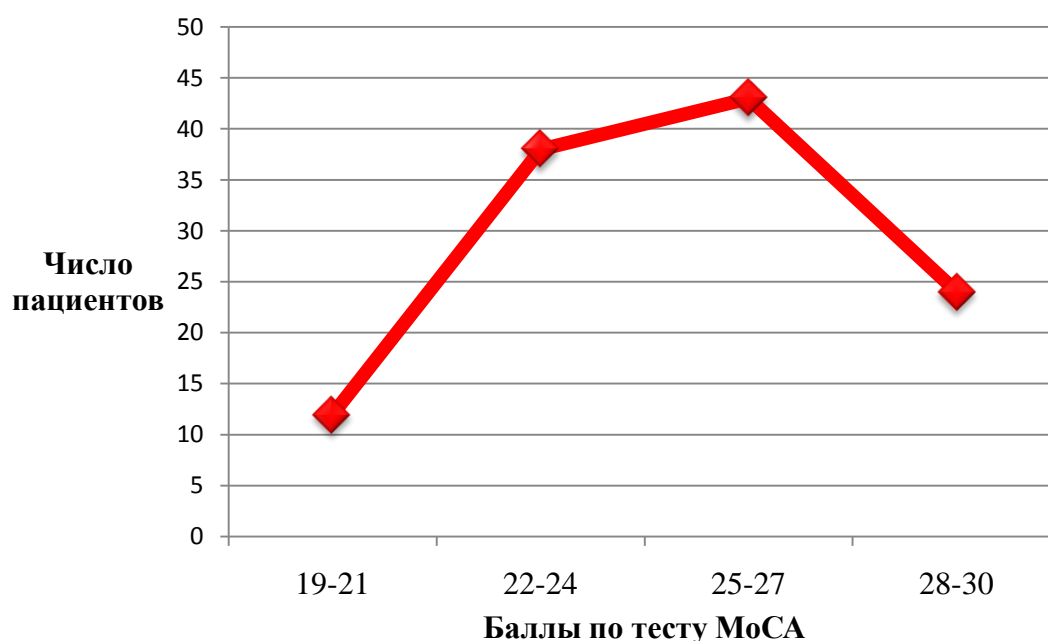


Рис. 2 Оценка пациентов с «асимптомными» стенозами (тест МоСА)

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.

При оценке по балльной рейтинговой шкале неврологического статуса степень выраженности субъективной симптоматики составила у больных

группы исследования в среднем 6,3 балла [4; 8]. При анализе объективного неврологического статуса средние показатели по рейтинговой шкале составили 7,9 баллов [6; 9].

В группе контроля подавляющее большинство пациентов (87%) предъявляло жалобы на головную боль. В отличие от группы исследования, характер цефалгического синдрома носил более вариабельный характер, в 10% случаев была диагностирована мигрень в различных формах. Значительно более низкой оказалась и распространенность когнитивных нарушений – они выявлялись лишь в 15% случаев (средний балл по шкале MoCA в группе $28,7 \pm 1,1$), отличались легким характером нарушений, с преимущественными жалобами на «забывчивость».

Степень поражения брахицефальных 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% (Рис. 3). 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 ($R = 0,34$, $p = 0,033$).

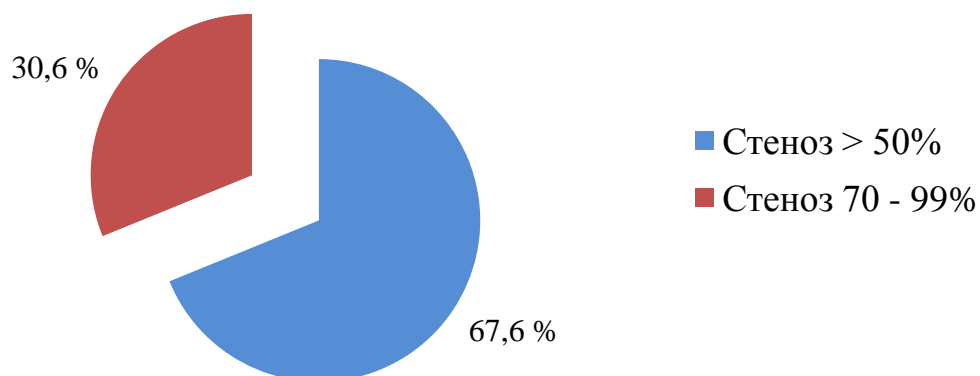


Рис. 3 Распределение пациентов в основной группе в зависимости от степени стеноза

Наличие МС чаще сопровождалось развитием стенозов высокой градации (70-99%). Последние встречались в группе пациентов с МС в два раза чаще, чем у больных без него (38,1% и 19,1% соответственно) (Рис. 4).

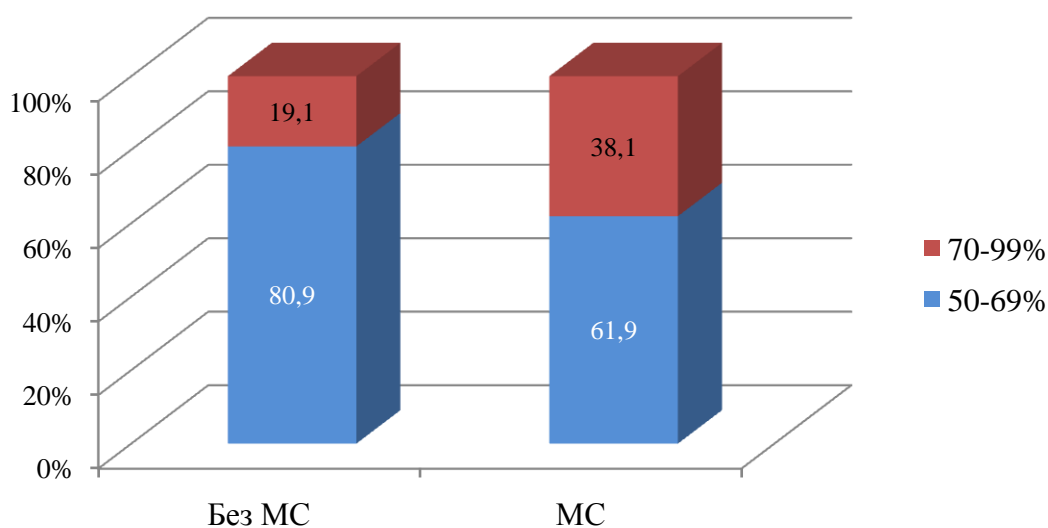


Рис. 4 Зависимость степени стеноза от наличия у пациентов МС

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

Характеристика биомаркеров атерогенеза

Исходя из основной цели исследования, проведен анализ обозначенных биомаркеров у пациентов обследованных групп — основной и контроля. При

анализе исследуемых биомаркеров выявилось преимущественное повышение плазменных концентраций одних и снижение других в основной группе по сравнению с контрольной (Табл. 1).

У пациентов основной группы показатели концентрации NO_3^- , NO_2^- и оксида азота (NO) плазмы крови достоверно отличались от показателей группы контроля, причем особенно сильно эти различия выявлялись между уровнями NO_2^- и NO (Рис. 5).

Таблица 1

Биомаркеры церебрального атеросклероза

<i>Показатель</i>	Основная группа	Контрольная группа	Значение <i>p</i>
t-PA (нг/мл)	1,95 [1,67; 2,74]	2,45 [2,0; 3,16]	0,006
PAI-1 (Ед/мл)	5,1 [2,5; 6,15]	2,87 [2,48; 3,92]	0,002
ADMA (мкмоль/л)	0,36 [0,19; 0,51]	0,37 [0,24; 0,48]	0,76
NO_3^- (мкмоль/л)	58,4 [32; 64]	45,0 [28,5; 55]	0,0039
NO_2^- (мкмоль/л)	43,3 [22; 49]	19,2 [11; 23,3]	0,000003
NO (мкмоль/л)	15,0 [8; 21]	25,8 [14,5; 29,5]	0,0004
Адипонектин (мкг/мл)	9,46 [4,7; 14,0]	15,73 [8,6; 19,7]	0,0002

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.

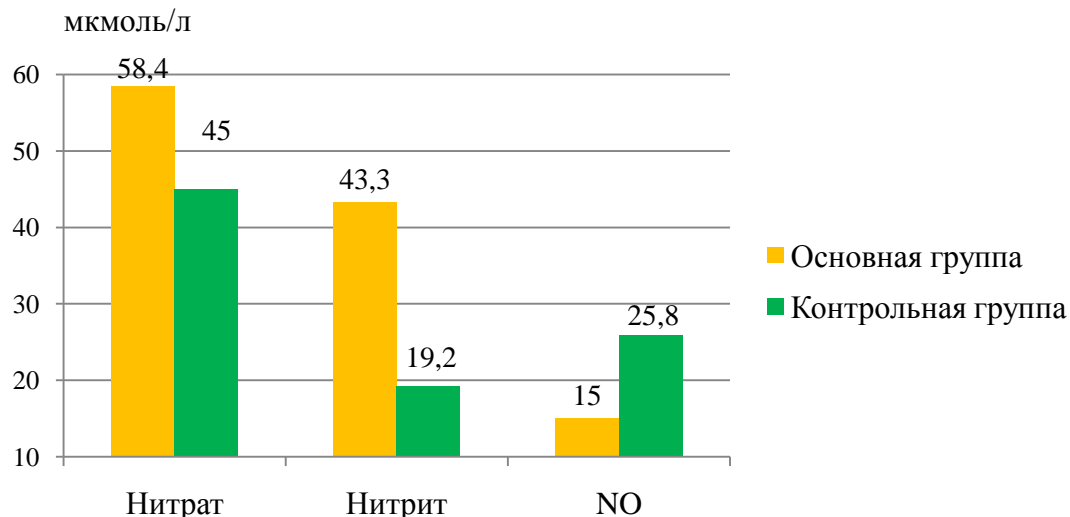


Рис. 5 Показатели системы оксида азота у обследованных

При рассмотрении средних значений другого потенциального «участника» метаболизма системы оксида азота – эндогенного ингибитора синтазы NO, асимметричного диметиларгинина (ADMA), не получено значимых различий между группами ($p = 0,76$). Однако обнаружена достоверная взаимосвязь повышения содержания последнего со снижением уровня NO у «асимптомных» пациентов ($R = - 0,37$), которой нет в группе контроля (Рис.6).

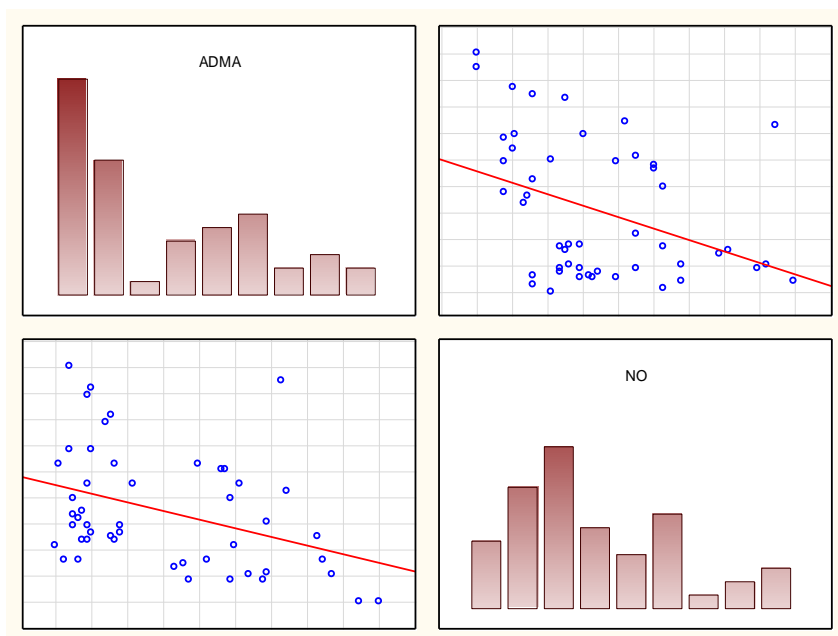


Рис. 6 Корреляция уровней ADMA и NO в основной группе

При детализации результатов было установлено, что значения плазменной концентрации АДМА выше 0,50 мкмоль/л чаще встречались в основной группе 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 у пациентов с МС по сравнению с пациентами, у которых данная патология отсутствовала (36,4% vs 25,9% соответственно), причем данные различия касались только больных основной группы.

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 МоСА 28 и более баллов, уровень АДМА был ниже, чем у пациентов с меньшими результатами ($p = 0,044$) (Рис. 7).

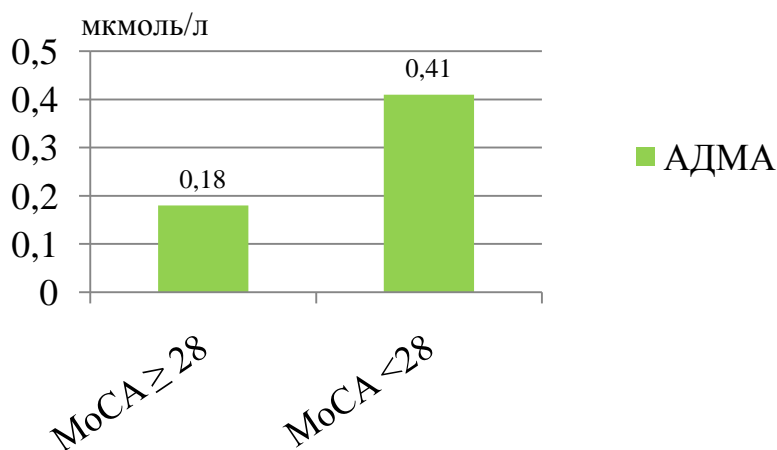


Рис. 7 Когнитивная функция (тест МоСА) и концентрация АДМА

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-PA составила 1,95 нг/мл в основной группе и 2,45 нг/мл в группе контроля, в то время как для PAI-1 эти показатели равнялись 5,10 и 2,87 Ед/мл соответственно. 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 ($R = 0,71$) (Рис. 8).

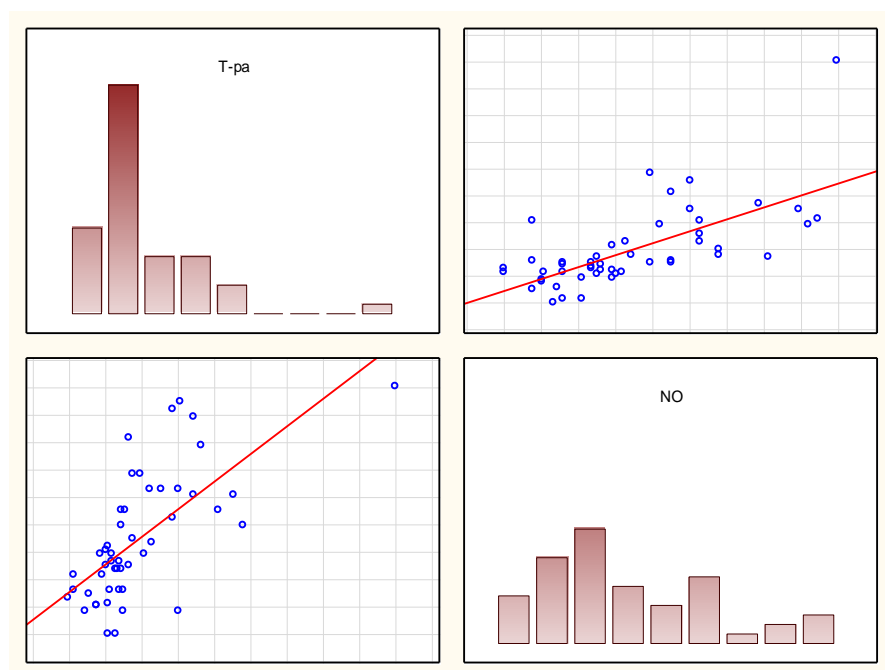


Рис. 8 Корреляция уровней t-PA и NO в основной группе

Выбор адипонектина (адипокин) в качестве маркерной молекулы в настоящем исследовании был обусловлен многочисленными данными о его ангиопротективной (антиатерогенной) 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.

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 (Табл. 2).

Таблица 2

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). Указанная модель была применена в анализе и сравнении пациентов в основной группе 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 она была намного ниже – 3 [2;3,5] ($p < 0,000001$).

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) (Табл. 3). Исходя из этой шкалы, на рис. 9 представлено ранжирование оценки риска развития атеросклероза в исследованных группах пациентов.

Таблица 3

Шкала проатерогенной активности

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

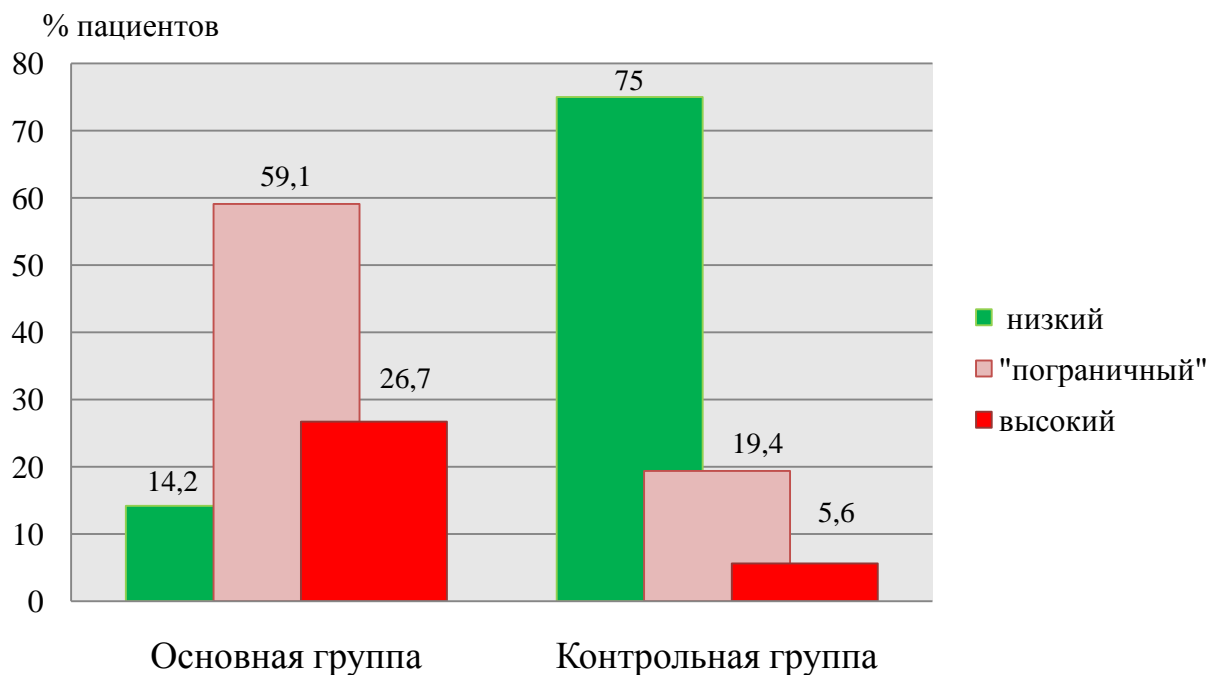


Рис. 9 Ранжирование риска развития атеросклероза по шкале биомаркеров

Достаточно показательное распределение баллов у обследованных пациентов – 86% пациентов с атеросклерозом находятся в зоне «пограничного» и высокого риска, в то время как в группе контроля такие значения выявляются лишь у каждого четвертого обследованного.

Характеристика однонуклеотидных полиморфизмов в генах-кандидатах атеросклероза

На сегодняшний день накоплено немало свидетельств генетической составляющей атеросклеротического процесса, определяющей во многих случаях его течение и прогрессирование. В соответствии с этими данными совместно с лабораторией нейрогенетики нами была также проанализирована распространенность однонуклеотидных полиморфизмов ряда генов, имеющих отношение к инициации и развитию атеросклероза. На рис. 10, 11 представлена частота встречаемости гомо- и гетерозиготных мутаций у пациентов с «асимптомным» атеросклерозом БЦА и в контрольной группе. Обращает на себя внимание значительная разница в выявляемости гомозиготного варианта гена PAI-1 (мутация которого заключается в инсерции или делеции одного остатка гуанидина в промоторной области гена), который чаще встречается у пациентов в группе контроля. При этом гетерозиготный вариант этого гена в подавляющем большинстве выявлялся у пациентов основной группы – с «асимптомным» атеросклерозом.

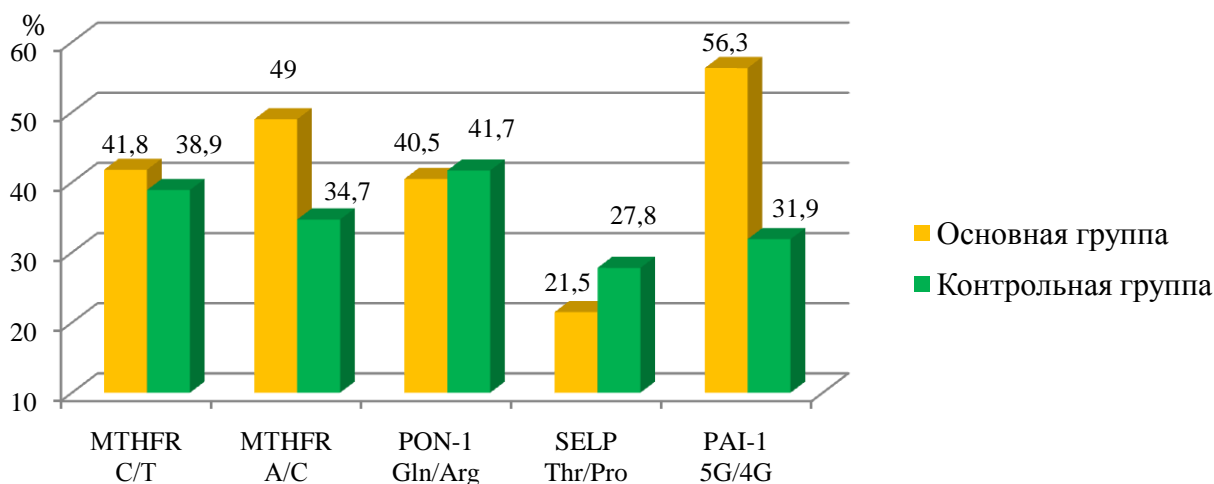


Рис. 10 Встречаемость гетерозиготных мутаций у обследованных

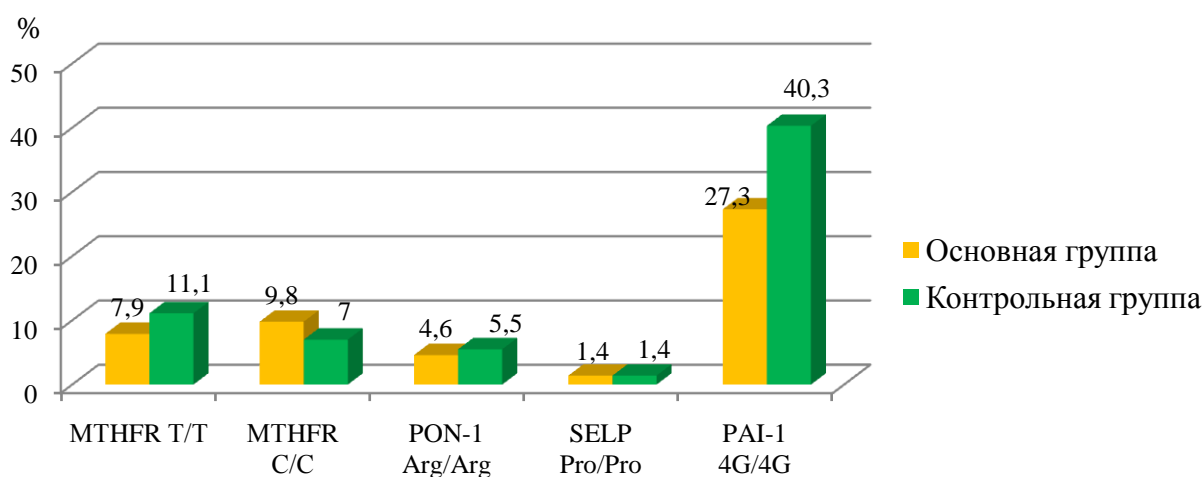


Рис. 11 Встречаемость *гомозиготных* мутаций у обследованных

Учитывая многофакторность и полиэтиологичность атеросклероза, а также маловероятный моногенный характер данной патологии, нами была предпринята попытка поиска определенных генетических ассоциаций в исследованных когортах пациентов.

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 (Рис.12).

Ассоциации мутантного аллеля гена SELP с мутантными аллелями генов МТНFR (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 МТНFR встречалось менее чем у четверти пациентов с «асимптомным» атеросклерозом (22,2%) и у каждого шестого пациента без атеросклероза (16,7%). При анализе ассоциаций трех мутантных аллелей выявлено преобладание в группе исследования сочетания SNP (как гетерозиготных, так и гомозиготных вариантов) в генах МТНFR (аллели 677Т и 1298С) и PAI-1 (аллель 4G) – оно встречалось в 25,4% случаев, по сравнению с 11,1% случаев в группе контроля ($p = 0,0347$).

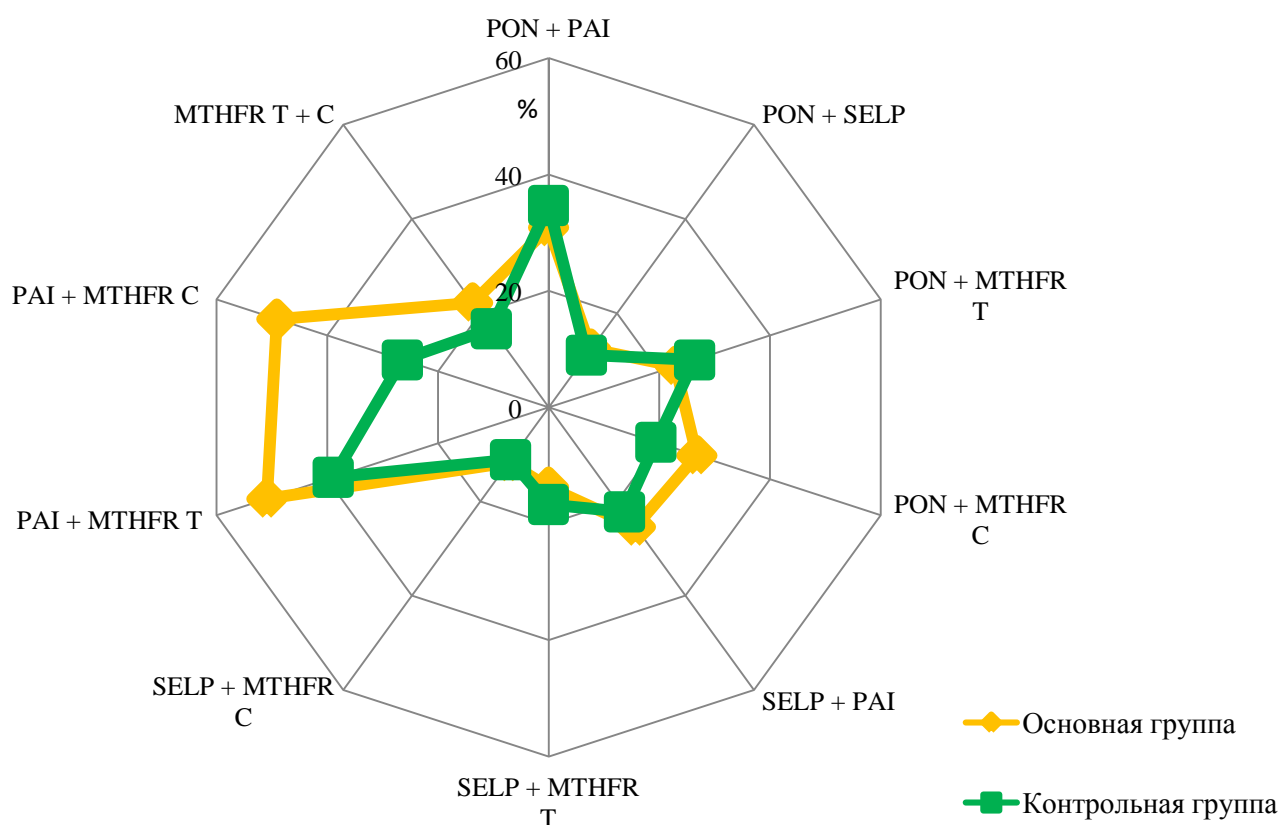


Рис. 12 Встречаемость ассоциаций двух мутантных аллелей у обследованных

Суммируя вышесказанное и в соответствии с полученными данными, можно разделить генетические полиморфизмы на потенциально проатерогенные и антиатерогенные (ангиопротективные). 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 (рис. 13, 14).

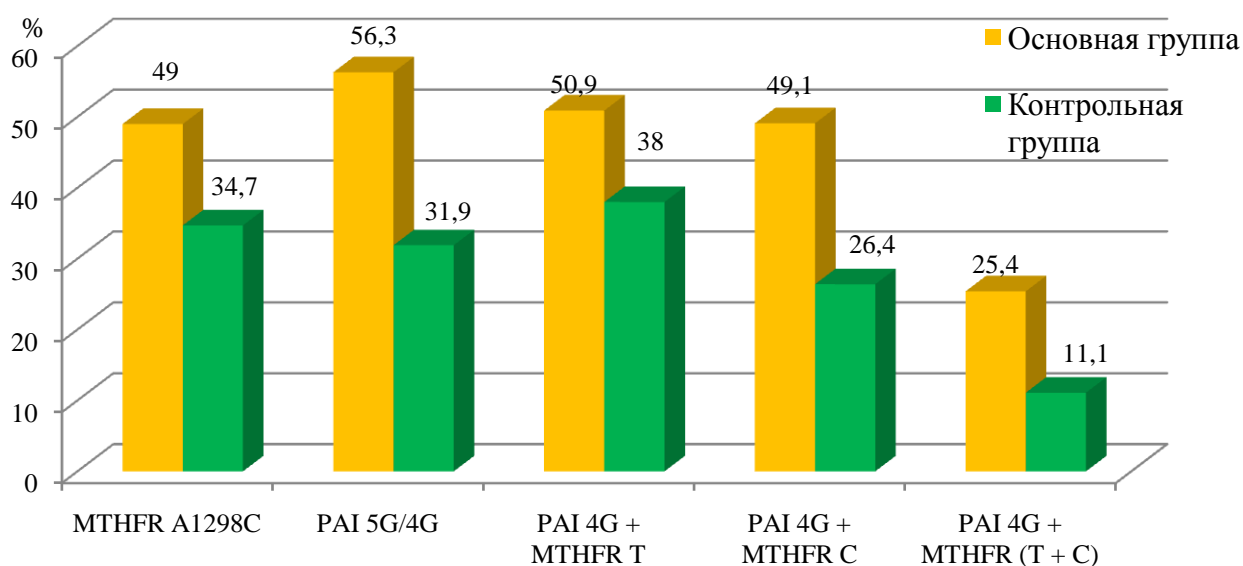


Рис. 13 Распределение потенциально *проатерогенных* полиморфизмов и ассоциаций у обследованных

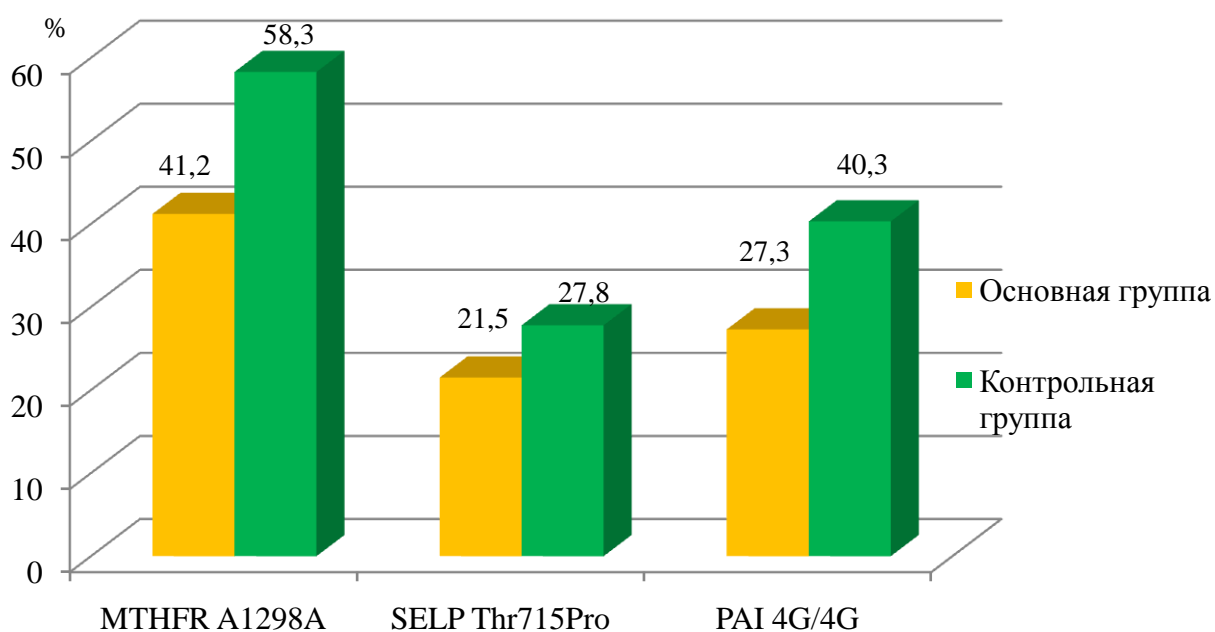


Рис. 14 Распределение потенциально *антиатерогенных* (ангиопротективных) полиморфизмов у обследованных

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).

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, мало реализуемая задача. Напротив, поиск аллельных ассоциаций и сравнение их распространенности в соответствующих популяциях 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.

ВЫВОДЫ

1. Определение «асимптомный» атеросклеротический стеноз сонных артерий является весьма условным, поскольку сужения сонных артерий умеренной и высокой градаций часто сопровождаются цефалгическим 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 персонифицированной превентивной терапии.

3. Оценка когнитивной дисфункции даже на стадии «асимптомного» каротидного атеросклероза – необходимое условие определения наиболее адекватной терапевтической тактики.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Танашян 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**, 2013.-N 3.-С.16-23.
2. Танашян 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**. 2013;4:4-10.
3. Танашян М.М., Раскуражев А.А., Шабалина А.А., Лагода О.В., Гнедовская Е.В. Биомаркеры церебрального атеросклероза: возможности ранней диагностики и прогнозирования индивидуального риска. **Анналы клинической и экспериментальной неврологии**. 2015; 3 (в печати).
4. Танашян 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. 2013;1: 38-42.
5. Танашян 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*. 2013;4:56-60.
6. Maksyutkina L.N., Shabalina A.A., Kostyрева M.V., Petrukhina S.Y., Raskurazhev A.A., Lagoda O.V., Tanashyan M.M. Plaque Morphology and Biomarkers of Carotid Atherosclerosis. *CerebrovascDis* 2013;35(suppl 3):1–2 (e-book: p. 759).
7. Khamidova Z.M., Shabalina A.A., Kostyрева M.V., Abramychева 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).
8. Raskurazhev A.A., Maksyutkina L.N., Tanashyan M.M., Lagoda O.V., Shabalina A.A., Chechetkin A.O. Biomarkers of carotid atherosclerosis progression. *CerebrovascDis* 2014;37(suppl 1):1–2. (e-book: p. 583).

9. Raskurazhev A.A., Khamidova Z.M., Shabalina A.A., Kostyreva M.V., Abramychева N.Y., Illaryoshkin S.N., Tanashyan M.M., Suslina Z.A. Genetic markers of aspirin-sensitivity in patients with cerebrovascular disease. *Cerebrovasc Dis* 2014;37(suppl 1):1–2. (e-book: p. 511).
10. Хамидова З.М., Раскуражев А.А., Шабалина А.А., Костырева М.В., Абрамычева Н.Ю., Танашян М.М. Генетические маркеры аспиринорезистентности при цереброваскулярной патологии. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, 2014;Т.114, №8, с 268.
11. Raskurazhev A.A., Tanashyan M.M., Khamidova Z.M., Abramychева N. Yu., Illaryoschkin S.N. Gene polymorphisms in patients with asymptomatic carotid atherosclerosis. *Cerebrovascular Diseases* 2015, Vol. 39, Suppl. 2, p.199.
12. 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* 2015, Vol. 39, Suppl. 2, p.208.
13. Раскуражев А.А., Танашян 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AQP9	аквапорин-9
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
АДМА	асимметричный диметиларгинин
БЦА	брахиоцефальные артерии
ВСА	внутренняя сонная артерия
ИБС	ишемическая болезнь сердца
ИМТ	индекс массы тела
ИФА	иммуно-ферментный анализ
ЛПВП	липопротеиды высокой плотности
MoCA	Монреальская шкала когнитивной оценки
МС	метаболический синдром
НМК	нарушение мозгового кровообращения
ПЦР	полимеразная цепная реакция
СД	сахарный диабет
ТИА	транзиторная ишемическая атака