

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

Читинская государственная медицинская академия



На правах рукописи

Фефелова Елена Викторовна

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ В
ЭКСПЕРИМЕНТЕ И КЛИНИКЕ

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научный консультант : д.м.н., профессор Цыбиков Намжил Нанзатович

Чита – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
Введение	7–19
Глава 1.	20–39
1.1 ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ ГОМОЦИСТЕИНА НА ОРГАНИЗМ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	
1.2 ЕДИНАЯ КЛЕТОЧНО-ГУМОРАЛЬНАЯ СИСТЕМА ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	40–54
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55–76
Глава 3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	77–187
3.1. Влияние гипергомоцистеинемии на состояние организма человека	77–111
3.1.1. Роль гипергомоцистеинемии в развитии системной воспалительной реакции	77–96
3.1.1.1. Математическое отображение вклада гипергомоцистеинемии в развитие артериальной гипертензии и атеросклероза	97–105
3.1.2. Влияние гипергомоцистеинемии на общие проявления местной воспалительной реакции	106–111
3.2. Влияние экзогенной гипергомоцистеинемии в экспериментах <i>in vivo</i>	112–138
3.2.1. Индукция окислительного стресса экзогенной гипергомоцистеинемией в эксперименте	112–114
3.2.2. Состояние иммунного статуса при экспериментальной экзогенной гипергомоцистеинемии	114–120
3.2.3. Гипергомоцистеинемия у иммунодефицитных животных	121–124
3.2.4. Коагулопатия при экспериментальной экзогенной гипергомоцистеинемии	125–128
3.2.5. Активация апоптоза кардиомиоцитов у животных с	128–130

экспериментальной гипергомоцистеинемией	
3.2.6. Оценка повреждающей роли гипергомоцистеинемии в анализе главных компонент у экспериментальных животных	131–139
3.3. Ответ организма на модификацию аминотиолами белковых структур организма	140–145
3.4. Влияние различных концентраций аминотиолов на клетки человека <i>in vitro</i>	146–187
3.4.1. Ответ лейкоцитов на высокие дозы аминотиолов	147–155
3.4.2. Ответ отдельных видов лейкоцитов на высокие концентрации аминотиолов	156–187
3.4.2.1. Изменение фенотипа и функций лимфоцитов под воздействием высоких доз гомоцистеина в краткосрочной культуре клеток крови	156–172
3.4.2.2. Изменение функций нейтрофилов и моноцитов под воздействием высоких доз гомоцистеина в краткосрочной культуре клеток крови	172–182
3.4.3. Дозозависимое влияние различных концентрации гомоцистеина на функциональную активность фибробластов в культуре	182–187
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ	188–210
4.1. Изменения, развивающиеся в организме человека, обусловленные повышенным уровнем гомоцистеина	189–198
4.2. Влияние экзогенной гипергомоцистеинемии на организм животного	198–201
4.3. Единый клеточно-гуморальный ответ организма на экзогенную гипергомоцистеинемию	201–210
Заключение	210–213
Выводы	214–216
Список литературы	217–272

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД	- артериальное давление
аАТ	- аутоантитела
АЧТВ	- активированное частичное тромбопластиновое время
ГГЦ	- гипергомоцистеинемия
ИА	- индекс атерогенности
ИБС	- ишемическая болезнь сердца
ИДС	- иммунодефицитное состояние
ИМ	- инфаркт миокарда
ИФА	- иммуноферментный метод
КМЦ	- кардиомиоциты
ЛПВП	- липопротеиды высокой плотности
ЛПНП	- липопротеиды низкой плотности
ЛПОНП	- липопротеиды очень низкой плотности
ЛТА	- лимфоцитарно-тромбоцитарные агрегаты
МДА	- малоновый диальдегид
НК	- нарушение кровообращения
о-ЛПНП	- окисленные липопротеиды низкой плотности
ОСА	-общая сонная артерия
ОЦК	- объем циркулирующей крови
ОХ	- общий холестерин
РАС	- ренин- ангиотензиновая система
РПГА	- реакция пассивной гемагглютинации
ПЭГ	- полиэтилен гликоль
ТАГ	- триацилглицериды
ЭД	- эндотелиальная дисфункция
ФК	- функциональная недостаточность
ХСН	- хроническая сердечная недостаточность
ЦИК	- циркулирующие иммунные комплексы

ЦЭК	- циркулирующие эндотелиальные клетки
ЧСС	- частота сердечных сокращений
ЭКГ	- электрокардиография
ЭПК	- эндотелиальные прогениторные клетки
ЭхоКГ	- эхокардиография
АЕС (CD146+CD105+)	- эндотелиоциты, несущие на своей мембране эндоглин
AV5 (Ann V)	- аннексин 5
ЕСР (CD146+CD34+)	- специализированные прогениторные эндотелиоциты
IL	- интерлейкины
INF γ	- интерферон гамма
Ig	- иммуноглобулины
Hcy	- гомоцистеин
Hcy-T	- гомоцистеин-тиолактон
HNP1-3	- альфа дефензимы
HSP	- белки теплового шока
LL-37	- кателицидин
NK	- натуральные киллеры
PI	- пропидиум иодид
CD	- кластер дифференцировки
CD14+	- моноциты
СЕС (CD146+CD45-)	- циркулирующие эндотелиоциты
CRP	- С-реактивный белок
SCORE (Systematic COronary Risk Evaluation)	- шкала оценки абсолютного суммарного сердечно-сосудистого риска – риска фатальных сердечно-сосудистых осложнений в течение предстоящих 10 лет

TNF α	- фактор некроза опухолей альфа
TF	- тканевой фактор
MCP-1	- Моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1
FAS-рецептор	- APO-1/CD95 относится к семейству рецепторов TNF, индуцирующий программу апоптоза в клетке
NMDA-рецептор	- ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Проблема гипергомоцистеинемии (ГГЦ) в последнее время привлекает все большее внимание исследователей, так как является одним из ведущих факторов риска развития и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний [37, 42, 57, 69, 72, 144, 176, 232, 234, 368]. По данным эпидемиологических исследований превышение уровня гомоцистеина более 15 мкмоль/л встречается примерно у 5-7% общей популяции, а у лиц с атеротромботическим поражением артерий – в 30% случаев [144, 234].

Физиологическая роль гомоцистеина (Hcy) заключается в поддержании на постоянном уровне содержания метионина, необходимого в реакциях метилирования, а также для синтеза цистеина, являющегося структурным компонентом глутатиона и источником сульфидов. Кроме этого, Hcy участвует в реакциях синтеза α -кетобутирата, предшественника сукцинил КоА – интермедиата цикла Кребса [22].

Патологическое накопление Hcy чаще развивается на фоне генетически детерминированных дефектов ферментов фолатного цикла [207, 312, 358, 396], либо недостатка витаминов группы В и фолиевой кислоты в пищевом рационе [230, 231, 303]. Большинство авторов придерживается той точки зрения, что избыток Hcy оказывает прямое повреждающее действие на сосудистую стенку [392]. Предположительных механизмов повреждающего действия ГГЦ довольно много. Так, показано, что данное состояние сопровождается активацией окислительного стресса [20, 36, 344]. Образование свободных радикалов вызывает повреждение эндотелиоцитов [254, 275, 296], инактивацию оксида азота, модификацию различных структур организма [57, 288, 367], в том числе и ЛПНП [141, 172, 235, 306], что приводит к развитию воспалительного процесса, и как следствие этого атеросклерозу и гипертонической болезни [379].

Так, в эксперименте на мышах, имеющих генетический дефект ферментов фолатного цикла, обнаружено, что на фоне стандартного рациона питания, у

животных образуются атеросклеротические бляшки в течение 60 дней. У нелинейных мышей диета богатая метионином и обедненная витаминами группы В сопровождается образованием фиброзных бляшек с более тяжелыми поражениями сосудов [231]. Наряду с этим было показано, что в нейронах и астроцитах Hcy оказывал антиоксидантный эффект [243]. Такие противоположные данные можно объяснить только тем, что механизмы активации окислительного стресса под влиянием ГГЦ изучены не достаточно. Описаны следующие пути накопления активных форм кислорода: аутоокисление Hcy [332] или эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) [228, 367], ингибирование глутатионпероксидазы 1 (GPx-1) и супероксиддисмутазы (SOD), образование пероксинитрита [210] и снижение выработки эндотелиоцитами сероводорода [342]. В то же время, источниками свободных радикалов являются и некоторые виды лейкоцитов, влияние на которые аминотиолов практически не изучено.

Кроме того, Hcy изменяет активность факторов XII и V [166, 167, 260, 377], угнетает образование протеина С [118], снижает экспрессию тромбомодулина [335] и гепаран-сульфатов [347], повышает синтез тромбоксана A₂ в тромбоцитах, увеличивает экспрессию Р-селектина и снижает образование оксида азота тромбоцитами [169, 263], вызывает развитие гиперкоагуляции [160, 214, 277]. Однако, J. Ray (2008) [343], проанализировав все полученные к 2008 году данные о влиянии Hcy на функционирование системы гемостаза, пришел к выводу об отсутствии самостоятельной роли ГГЦ в тромбообразовании. С ним согласился ряд исследователей, считающих, что протромботический потенциал Hcy реализуется только при наличии врожденных и/или приобретенных факторов риска [328, 363].

Hcy, активирует NF-κB – фактор транскрипции, который, как известно, стимулирует синтез цитокинов, хемокинов, молекул адгезии лейкоцитов, которые в свою очередь, усиливают миграцию лейкоцитов в стенку сосуда, тем самым увеличивая цитотоксичность лейкоцитов [104, 177]. Изменяется функциональная активность лимфоцитов за счет усиления их активации,

дифференцировки и апоптоза [280], в моноцитах и нейтрофилах возрастает продукция активных форм кислорода [21, 85]. Все это приводит к инициации процесса атерогенеза [353].

Кроме этого, показано, что Нсу способен вызывать повреждение различных структур организма путем гомоцистеинилирования белковых структур. Это такая посттрансляционная модификация белка, при которой аминокислоты включаются в полипептидную цепочку, что влечет изменение функциональной активности белковой структуры. Было показано, что некоторые гомоцистеинилированные белки плазмы, например альбумин, вызывают воспалительный ответ и усиливают адгезию моноцитов к эндотелию сосудов [182, 200, 265, 289]. Кроме того, такие измененные белки способствуют апоптозу [340]. Однако, в литературе описан процесс гомоцистилирования белков гомоцистеином-тиолактоном и не описана возможность модификации белка под влиянием Нсу.

В ряде исследований обнаружено, что мишенью действия гомоцистеина могут быть глутаматные рецепторы, в частности, NMDA-рецепторы [338]. Стимуляция NMDA-рецепторов инициирует вход кальция внутрь клетки, рост активных форм кислорода и, возможно, азота, что влечет за собой изменение функциональной активности клеток и активирует процесс апоптоза.

Таким образом, Нсу может активировать множественные пути, которые вместе способствуют прогрессированию сосудистых заболеваний.

Однако, основная масса исследований посвящена изучению последствий ГГЦ, развившейся вследствие нарушения метаболизма метионина, что приводит к повышению уровня этого аминокислоты первоначально внутри клетки. При этом, полученные результаты во многом противоречивы. Влияние экзогенной ГГЦ на функционирование различных клеток организма практически не изучено, что представляет несомненный интерес не только для теории, но и практической медицины.

Кроме этого, остается открытым вопрос: те изменения в организме, которые наблюдаются на фоне ГГЦ обусловлены непосредственным повреждающим

действием аминотиолов, либо это проявления системного ответа организма на данное повреждение.

Степень разработанности темы

Гипергомоцистеинемия является индуктором различных заболеваний, начиная от атеросклеротического повреждения сосудистой стенки до дефектов нервной трубки плода [42, 69, 155, 219, 278]. Гипотеза, что ГГЦ является причиной атеросклероза, была предложена McCully в 1969 году, когда он заметил, что дети, страдающие гомотеинурией, имели атеросклеротические бляшки практически во всех сосудах мышечного типа [308]. С 1976 года начались эпидемиологические исследования, поддерживающие эту гипотезу [236, 247, 248, 250]. Ретроспективные исследования случай-контроль показали, что 10% всех заболеваний ИБС связаны с высокими уровнями Hcy или, что повышение уровня Hcy в крови на 5 мкмоль/л повышает риск развития ИБС на 84% [352, 368, 397].

Взгляды на патогенетические механизмы возникновения и воздействия на организм гипергомоцистеинемии не однозначны. Hcy является продуктом метаболизма незаменимой аминокислоты метионина, которая используется как для синтеза различных белков, так и для образования S-аденозилметионина, необходимого для почти всех реакций трансметилирования, происходящих в клетке. Внутриклеточная концентрация Hcy находится под строгим контролем [99]. В плазме основная масса Hcy находится в дисульфидной форме, реагируя со свободными тиолсодержащими молекулами, такими как Hcy, цистеин, белки (например, альбумин) [16]. Только небольшая часть Hcy плазмы остается в восстановленной форме [16].

Одним из механизмов неблагоприятного действия Hcy является активация окислительного стресса, ведущая в первую очередь к повреждению эндотелия с развитием его дисфункции [20, 22, 36, 254, 344]. Проявлением, которой является: снижение, как выработки (разобщение эндотелиальной NO-синтазы приводит к образованию вместо оксида азота супероксидного аниона [254, 291, 367, 388,

396]), так и биодоступности оксида азота, повышенное образование эндотелина 1 [296, 353], экспрессия молекул адгезии и хемокинов [104, 300].

Нсу также может способствовать атерогенезу, опосредуя апоптотическую гибель эндотелиоцитов и клеток гладких мышц [225]. В физиологических условиях пролиферация и апоптоз клеток сбалансированы: их гибель запускает миграцию и пролиферацию в очаг повреждения новых. Однако в патогенных условиях происходит избирательное увеличение пролиферации клеток, что вызывает гиперплазию, а избирательное повышение апоптоза приводит к атрофии [95, 139]. Считается, что пролиферация гладкомышечных клеток в стенке артерий является ключевым событием в развитии атеросклероза [84, 130].

Кроме этого, Нсу инициируя активность моноцитов, Т-лимфоцитов, эндотелиоцитов вызывает развитие хронического воспаления в месте атеросклеротического поражения [3-4, 193, 381].

Дополнительные исследования с использованием эндотелиальных клеток человека показывают, что повышенный уровень АФК, стресс эндоплазматического ретикулума и образование Нсу-тиолактона способствуют развитию Нсу-индуцированному апоптозу [222, 256, 257].

Воздействие на эндотелиальные клетки ГГЦ вызывает увеличение экспрессии тканевого фактора, фактора V и активации фактора XII [377], что приводит к гиперкоагуляции [389, 394]. Кроме того, эффект Нсу усиливается за счет инактивации белка C и фактора свертывания крови XIV, а также за счет ингибирования фибринолитического процесса [118, 315].

Тем не менее, механизм, лежащий в основе патогенного действия повышенного уровня Нсу, остается до конца неясным.

Цель исследования

Целью исследования явилось изучение патогенетической роли гипергомоцистеинемии в инициации ответа единой клеточно-гуморальной системы защиты организма в эксперименте и клинике.

Задачи исследования

1. Оценить влияние ГГЦ на некоторые пораметры функции сердечно-сосудистой системы у больных ИБС и гипертонической болезнью.
2. Исследовать состояние систем иммунитета и гемостаза у больных ИБС и гипертонической болезнью с повышенным уровнем гомоцистеина.
3. Построить математическую модель вклада гипергомоцистеинемии в развитие артериальной гипертензии и атеросклероза.
4. Оценить общую реакцию организма при обострении местного воспалительного процесса (на примере хронических риносинуситов) на фоне ГГЦ.
5. Исследовать возможность модификации альбумина под воздействием Нсу и Нсу-Т с образованием конъюгатов и оценить уровень аутоантител различных классов к ним у животных и человека.
6. Изучить сдвиги в системах иммунитета, гемостаза, развитие дисфункции эндотелия у интактных и иммунодефицитных животных.
7. Изучить фенотип и представительство различных молекул на мембране лейкоцитов под влиянием высоких доз Нсу и Нсу-Т в краткосрочной культуре клеток периферической крови человека: CD25+, CD127+, CD162, CD62L, CD142+.
8. Исследовать влияние Нсу и Нсу-Т на экспрессию ранних и поздних маркеров апоптоза в общей популяции лейкоцитов, фагоцитов, Т- и В-лимфоцитов (CD95+, CD178+, Vcl-2, Apo 2.7, Ann-V).
9. Оценить влияние Нсу и Нсу-Т на формирование коагрегатов в общей популяции лейкоцитов, фагоцитов, лимфоцитов.
10. Оценить дозо-зависимое влияние Нсу на интенсивность роста фибробластов и синтез биологически активных веществ: цитокинов (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10), белков теплового шока (HSP 70 b, HSP 90 α).

Научная новизна

Впервые выполнено подробное комплексное исследование биологических эффектов гипергомоцистеинемии на культурах клеток человека, в экспериментах на животных и в клинике. Показано, что высокие концентрации Нсу и Нсу-Т вызывают снижение числа Т-хелперов и увеличение числа цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-НК в культуре периферической крови здоровых и больных ИБС.

Доказано, что ГГЦ вызывает увеличение количества клеток, несущих молекулы адгезии (CD162, CD62L, ICAM-1), а также увеличение CD25 и CD127 позитивных Т-хелперов как в культуре клеток здоровых, так и больных ИБС.

Впервые показана неравномерность активационного апоптоза в различных субпопуляциях лейкоцитов под влиянием аминотиолов. Так, ГГЦ в общей популяции лейкоцитов периферической крови вызывает в большей степени появление аннексин-V-позитивных клеток, чем глутамат. При этом, внесение в культуру клеток глутамата наблюдается максимальное количество лейкоцитов, экспрессирующих поверхностный рецептор FAS и клеток, содержащих Bcl-2. В моноцитах крови аминотиолы не вызывают активации апоптического процесса. Нейтрофилы и лимфоциты здоровых и больных ИБС реагируют не однотипно при контакте с Нсу и Нсу-Т.

В диапазоне концентраций Нсу от 12,5 до 25,0 мкмоль/л усиливается пролиферация фибробластов, в то время, как доза в 50,0 мкмоль/л вызывает их гибель, накопление в культуральной среде HSP70, IL-6 и резкое снижение IL-10.

Получен комплекс сывороточного альбумина с Нсу и Нсу-Т как у крысы, так и человека. Показано, что на фоне введения Нсу и Нсу-Т животным наблюдается резкое повышение концентрации аутоантител к модифицированному альбумину.

Доказано, что изменения в иммунограмме у интактных и иммунодефектных животных под влиянием повышенных доз аминотиолов носят однонаправленный характер: однократное введение Нсу сопровождается выраженным снижением числа Т-лимфоцитов и их субпопуляций. Постоянная ГГЦ на протяжении 9 суток

вызывает увеличение общего числа лимфоцитов, за счет цитотоксических Т-лимфоцитов.

Впервые продемонстрировано, что ГГЦ вызывает рост числа эндотелиоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, фибробластов несущих на своей поверхности тканевой фактор.

В противоположность существующему мнению, доказано, что наиболее высокий уровень окисленных липопротеидов и аутоантител к ним зафиксирован у здоровых людей в возрасте от 18 до 35 лет. Уровень таких аутоантител сопряжен с тяжестью ИБС и стадией гипертонической болезни.

Теоретическая и практическая значимость работы

Работа имеет фундаментальное значение для науки, так как расширяет существующие представления о биологических эффектах ГГЦ, являющейся одним из главных звеньев патогенеза таких социально значимых заболеваний, как ишемическая болезнь сердца и гипертоническая болезнь. Теоретическое значение работы состоит в расширении представлений о механизмах действия гомоцистеина и гомоцистеина-тиолактона, приводящих к изменению фенотипа, экспрессии молекул адгезии и активации клеток периферической крови; к стимулированию программированной гибели клеток, развитию гиперкоагуляции и иницированию аутоиммунного процесса.

Полученные результаты могут быть полезными для понимания механизмов возникновения и развития атеросклероза и гипертонической болезни, а также для выявления возможных механизмов защиты организма от токсического повреждения гипергомоцистеинемией. При соответствующей клинической апробации данные исследования могут являться основой для внесения дополнений в алгоритм диагностики атеросклеротического процесса, что позволит выявлять заболевание на ранних этапах его развития.

Результаты работы могут быть использованы в лекционных и практических занятиях для студентов биологических и медицинских факультетов университетов, академий и медицинских институтов.

Методология и методы исследования

Проведено комплексное обследование 111 пациентов с диагнозом ишемическая болезнь сердца и 60 с диагнозом гипертоническая болезнь, 23 человека, страдающих хроническим риносинуситом в стадии рецидива и ремиссии. Группу здоровых лиц составили 91 волонтер. В эксперимент *in vivo* включено 80 животных, у 20 из которых был индуцирован иммунодефицит. Изучался ответ клеток периферической крови 15 относительно здоровых, некурящих добровольцев – мужчин, средний возраст которых составил $35,4 \pm 4,7$ лет и 16 больных ишемической болезнью сердца (стабильная стенокардия 2 функционального класса) и фибробластов (культура фибробластов человека линии М-22) в экспериментах *in vitro*.

В работе применялись лабораторные (гемостазиологические, биохимические, иммунологические, морфологические, гистохимические) и статистические методы исследований. Для исследования использовались цельная кровь и ее сыворотка/плазма, культура клеток периферической крови, мононуклеаров и фибробластов, миокард экспериментальных животных.

Экзогенную гипергомоцистеинемию моделировали путем внутрибрюшинного введения Нсу или Нсу-Т в дозе 100 мкмоль на 1 мл ОЦК. Расчет ОЦК крысы проводили в соответствии с соотношением 5-7 мл/100 г веса. Спустя 6 часов после инъекций аминотиолов кровь забирали вновь. Далее изучаемые вещества вводили один раз в сутки, 4 раза в сутки в течение девяти дней, после чего проводился забор крови и животных выводили из эксперимента путем передозировки эфирного наркоза.

Для получения культуры клеток периферической крови осуществляли забор крови из локтевой вены в пробирки с добавлением гепарина Li. Затем, по 1 мл

крови помещали в 3 стерильные пластиковые пробирки, добавляли в каждую из них по 1 мл культуральной среды RPMI 1640 MACS^{CR} MCDIA (Германия). Затем, в две из них вносили растворы либо гомоцистеина в концентрации 50 мкмоль/л, NMDA в концентрации 50 мкмоль/л. В третью (контрольную) – эквивалентный объем физиологического раствора. После 4х часов инкубации при 37⁰С в 4,8% CO₂ определяли фенотип лейкоцитов, маркеры активации и экспрессию маркеров апоптоза и активации клеток.

Личное участие автора состоит в проведении анализа литературы, посвященной изучаемой проблеме, составление протокола исследования, выделение и работа с культурами клетками периферической крови, проведение экспериментов *in vivo*, подбор пациентов. Автором осуществлены статистическая обработка результатов и их интерпретация, выполнен научный анализ полученных данных, сформированы научные положения и выводы, проводилась подготовка основных публикаций по теме диссертации, внедрение результатов диссертации в учебный процесс.

Положения, выносимые на защиту

1. У лиц с риском развития сосудистых катастроф, больных ИБС, гипертонической болезнью развивается эндогенная ГГЦ, сопровождающаяся увеличением уровня окисленных ЛПНП и аутоантител к ним, изменением баланса про- и противовоспалительных цитокинов, увеличением уровня циркулирующих иммунных комплексов, развитием дисфункции эндотелия и сдвигами в системе гемостаза. Выявленные сдвиги укладываются в математическую модель расчета толщины комплекса интима-медиа.

2. Конъюгаты Нсу и Нсу-Т с альбумином человека и крысы обладают иммуностимулирующим эффектом и вызывающего образование аутоантител класса IgG, участвующих в их элиминации. У иммунодефектных животных аутоантитела к комплексу альбумин- Нсу образуются в меньшей степени, что

сопровождается снижением эффективности элиминации Нсу с последующим повышением уровня данного тиола в кровотоке животных.

3. Экзогенная ГГЦ сопровождается изменениями в системе иммунитета, развитием коагулопатии у экспериментальных животных, обусловленной усилением экспрессии тканевого фактора на эндотелиоцитах, лейкоцитах, фибробластах, формированием коагрегатов клеток крови, а также интенсификацией процессов некроза и апоптоза миокардиоцитов крысы.

4. Под влиянием высоких доз Нсу и Нсу-Т в краткосрочной культуре клеток периферической крови человека происходит изменение фенотипа и степени представительства различных молекул (CD25+, CD127+, CD162, CD62L, CD142+) на мембране лейкоцитов. На поверхности фагоцитов, Т- и В-лимфоцитах экспрессируются ранние и поздние маркеры апоптоза (CD95+, CD178+, Bcl-2, Apo 2.7, Ann-V). Увеличивается число лейкоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов.

Внесение Нсу в концентрациях от 12,5 до 25 мкмоль/л в культуру фибробластов вызывает усиление их пролиферации, при концентрации 50 мкмоль/л развивается гибель клеток с накоплением в культуральной среде HPS70, IL-6 и снижением уровня IL-10.

Апробация работы

Основные результаты работы представлены на III Международной научно-практической конференции «Молодежь и наука: реальность и будущее (Невинномысск, 2010); научно-практической конференции с международным участием «Развитие традиционной медицины в России: опыт, научные исследования, перспективы (Улан-Удэ, 2010); III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Вопросы патогенеза типовых патологических процессов» (Новосибирск, 2011); VII Международной научно-практической конференции «Научные достижения европейской науки» (София, 2011); Международной научно-практической конференции, посвященной Всемирному дню здоровья (Киев, 2011); III Международной научно-практической

конференции «Здоровье для всех». (Пинск (республика Беларусь); III Международной научно-практической конференции «Иммунофизиология: аутоиммунитет в норме и патологии и вопросы предиктивно-превентивной медицины (Москва, 2012); IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Вопросы патогенеза типовых патологических процессов» (Новосибирск, 2012); V Санкт-Петербургском венозном форуме «Диагностика и лечение острых венозных тромбозов и хронической венозной недостаточности» (Санкт-Петербург, 2012); I, II, III, V съезде терапевтов Забайкальского края (Чита, 2013, 2014, 2015, 2017); VII Всероссийской конференции «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии» (с международным участием) (Москва, 29-31 января, 2015); XV Всероссийском научном Форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» 1-4 июня 2015 г.; VIII Всероссийской конференции по клинической гемостазиологии и геморреологии (Москва, 2016), «Scientific research of the SCO countries: synergy and integration» (Пекин, 2019).

Публикации

Основное содержание, положения диссертационной работы отражены в 44 печатной работе, общим объемом 17,03 п.л., в том числе 21 в ведущих рецензируемых научных журналах, входящих в список, определенный ВАК Минобрнауки России для публикации результатов работ на соискание ученой степени доктора наук, 3 из которых находятся в международных базах цитирования (SCOPUS, Pubmed, Springer, WoS. Q3-4), 2 публикации в зарубежных журналах (SCOPUS, Pubmed Q2).

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 272 страницах печатного текста, включает введение, 4 главы: «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение полученных результатов», выводы, список литературы. Диссертация содержит 66 таблиц и 29 рисунков. Список литературы включает 161 отечественных и 194 зарубежных источников.

Глава 1

1.1. Патологическое влияние гомоцистеина на организм (Обзор литературы)

Гомоцистеин (Hcy) – это серосодержащая аминокислота, образующаяся только в клетках организма животных как промежуточный продукт превращения метионина. В большей степени, в процессе деметилирования метионина *S*-аденозилметионином, с образованием *S*-аденозилгомоцистеина [358, 354], который в последующем гидролизуется ферментом аденозилгомоцистеиназой до аденозина и гомоцистеина (рис. 1).



Рисунок 1. Схема метаболизма Hcy [100].

Известно что, транс-сульфурирование Hcy, а также его реметилирование являются основными механизмами метаболизма данного аминотиола, что позволяет организму поддерживать его концентрацию на относительно постоянном уровне в плазме крови [100, 287].

Источниками Нсу в плазме крови в большей степени являются пролиферирующие клетки, так как при регенерации и росте тканей резко усиливается потребление метильных групп. При этом, лишь его малая часть попадает в кровоток, так как он практически весь метаболизируется внутри клеток [155].

В плазме Нсу присутствует в основном в связи с белками (70-80%), кроме этого он циркулирует в виде свободной восстановленной (менее 1%) и свободной окисленной формы [16] (рис. 2).

Структуры различных видов гомоцистеина

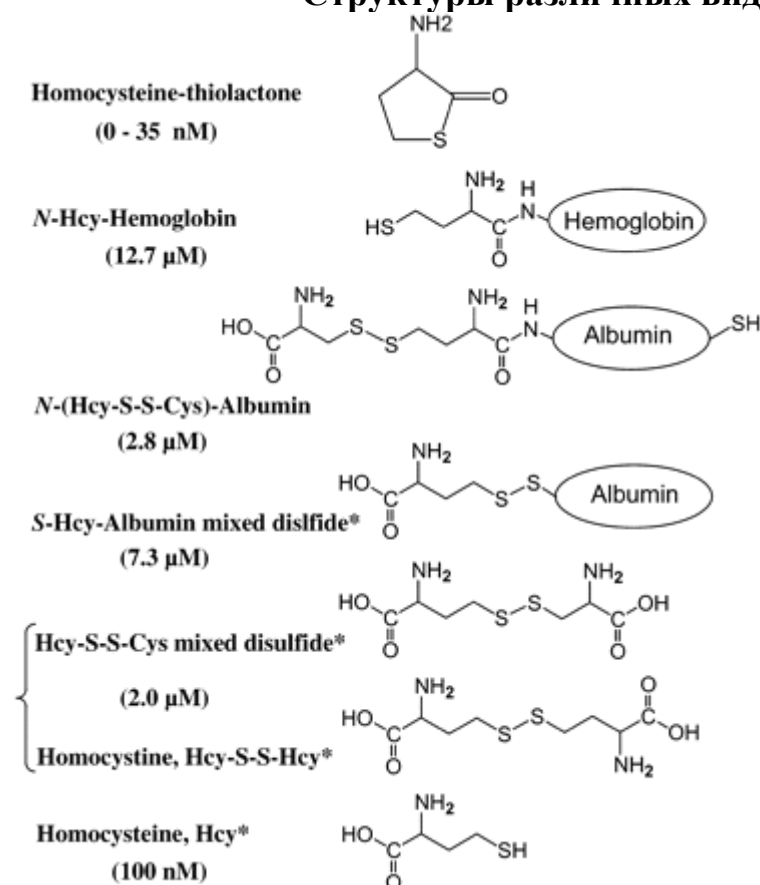


Рисунок 2. Структуры различных видов Нсу, циркулирующих в кровотоке. Концентрации указанных видов Нсу в нормальной человеческой крови указаны в скобках [287].

Уровень Нсу в плазме крови в течение жизни колеблется. Так, до периода полового созревания, концентрация этого аминотиола у мальчиков и девочек примерно одинакова, и составляет в среднем 5 мкмоль/л. В период полового

созревания, содержание Нсу повышается, причем у мальчиков в большей степени, чем у девочек. У взрослых, в возрасте до 40 лет его уровень у мужчин так же выше и находится в пределах 5-10 мкмоль/л [99, 157]. ГГЦ диагностируют в случае превышения его уровня более 15 мкмоль/л. Выделяют несколько групп ГГЦ по степени тяжести: умеренная (содержание Нсу в плазме крови 15-30 мкмоль/л), средняя (30-100 мкмоль/л) и тяжелая (свыше 100 мкмоль/л) [37, 325]. Однако, если у человека есть хроническая ИБС, артериальная гипертензия, патология почек, опухолевые заболевания и др., то в этом случае уровень Нсу 10-12 мкмоль/л уже следует признавать как за умеренную ГГЦ [155, 383].

Генетический дефект ферментов (цистатионин- β -синтазы, метионин-синтазы, 5,10-метилентетрагидрофолат редуктазы), либо снижение уровня их кофакторов (фолатов, витаминов В₆ и В₁₂) приводит к сниженной активности энзимов, что приводит к повышению уровня гомоцистеина. Так, например, при дефиците цистатион- β -синтазы развивается тяжелая ГГЦ (>100 мкмоль/л), сопровождающаяся осложнениями, приводящими к смертельному исходу. Умеренная ГГЦ в популяции распространена в большей степени и вызванна либо поломкой в гене метилентетрагидрофолат редуктазы (MTHFR), либо пищевым недостатком фолатов и витаминов группы В [207, 230, 251], либо на фоне какого-либо пролиферативного заболевания, либо при нарушении процесса выведения его из организма почками.

Повышение концентрации Нсу является фактором риска развития атеросклероза, венозных тромбозов, нарушением репродукции и т.д. [26, 37-38, 42, 69, 72, 99, 155, 211, 246, 262, 351, 370, 374].

Большинство авторов придерживается той точки зрения, что избыток Нсу оказывает прямое повреждающее действие на сосудистую стенку кровеносных сосудов [168, 203, 256, 375].

Описано несколько предположительных механизмов повреждающего действия ГГЦ. Рассмотрим некоторые из них.

1.1.1. Окислительный стресс

Неотъемлемой частью метаболизма живых организмов является окисление и продукция свободных радикалов [17]. В норме свободные радикалы необходимы для выполнения различных физиологических процессов в организме [386]. Так, супероксид-анион, гидроксид-радикал и перекись водорода участвуют в поддержании тонуса микрососудов, обуславливающего органный кровоток. Они используются фагоцитами для элиминации таких патогенных факторов, как бактерии и вирусы [15]. Кроме этого, активные формы кислорода способны регулировать клеточный рост и участвовать во внеклеточной сигнальной системе, где свободные радикалы играют роль внутриклеточных сигнальных молекул [222]. Кроме этого, благодаря свободнорадикальному окислению осуществляется естественный механизм модификации липидного состава клеточных мембран, необходимый для поддержания текучести мембраны.

При нарушении баланса между продукцией свободных радикалов и механизмов антиоксидантной защиты [344] развивается окислительный стресс, приводящий к активации процессов перекисного окисления липидов, увеличению уровня насыщенных жирных кислот в мембране клетки, что в свою очередь, приводит к повышению ее проницаемости и гибели клетки путем осмозиса [15, 17, 40].

Одним из возможных вариантов развития окислительного стресса на фоне ГГЦ, возможно, является снижение активности ферментов антиоксидантов: глутатионпероксидазы [304], супероксиддисмутазы, тиоредоксина [210]. Кроме этого, из-за ингибирования фермента ($N^G N^G$ -диметиларгинин диметиламиногидролазы), расщепляющего асимметричный диметиларгинин, избыток которого приводит к нарушению работы NO-синтаз и способствует выработке большого количества свободных радикалов [254, 268, 396].

Также, вероятно развитие «аутоокисления» избытка Hcy а с образованием свободных радикалов, что сопровождается повышением НАДФН-оксидазной продукцией супероксида [108, 258, 280].

Свободные радикалы, в свою очередь, запускают ряд патологических процессов – это и инактивация оксида азота [367], приводящая к снижению его биодоступности [268], и окисление липидов [303], и окислительная модификация белков [314, 315], и нарушение работы митохондрий [86, 333, 361], активацию проапоптозного каскада семейства каспаз, и в итоге – апоптоз/некроз клетки [8, 40, 257].

Развившийся окислительный стресс вызывает развитие дисфункции эндотелия, торможение эндотелий-зависимой вазодилатации, увеличение синтеза адгезивных молекул и факторов роста, усиление агрегации тромбоцитов и тромбообразованию, повышение апоптоза [157, 339]. Кроме этого, он вносит вклад в усиление процессов пролиферации гладкомышечных клеток, что, в свою очередь, вызывает развитие гипертрофии и ремоделирования сосудистой стенки [160, 177].

В тоже время, было продемонстрировано, что в эпителиальных клетках, ГГЦ вызывает развитие окислительного стресса [172], а в таких структурах, как нейроны и астроциты – восстанавливающий эффект [243].

Болдырев А.А. (2009) показано, что патогенное действие окислительного стресса проявляется только в концентрациях Hcy более 1 мМ [20].

1.1.2. Повреждающее действие гомоцистеина-тиолактона

Показано, что возможно превращение Hcy в реакционноспособный тиолактон-гомоцистеина при активации гомоцистеин-тиолактоназы или параоксоназы-1 (PON1) [331, 359]. Данный фермент химически связан с ЛПВП. Вероятно, именно благодаря этому ЛПВП и обладают антиатерогенным эффектом. Недостаточность же его функционирования индуцирует развитие заболеваний сердечно-сосудистой системы, обусловленных ГГЦ [14]. Кроме этого, Hcy-T в неизменном виде выводится из организма, а может, соединяясь с протеинами посредством азота модифицировать клеточные и внеклеточные белки [200, 288, 289].

Нсу-Т является ацилирующим агентом и при нормальных условиях предпочтительнее реагирует с ε-аминогруппой бокового радикала лизина [240, 269], в результате чего образуются *N*-гомоцистеинилированные белки (рис. 3) [288], что существенно изменяет работу различных белков.

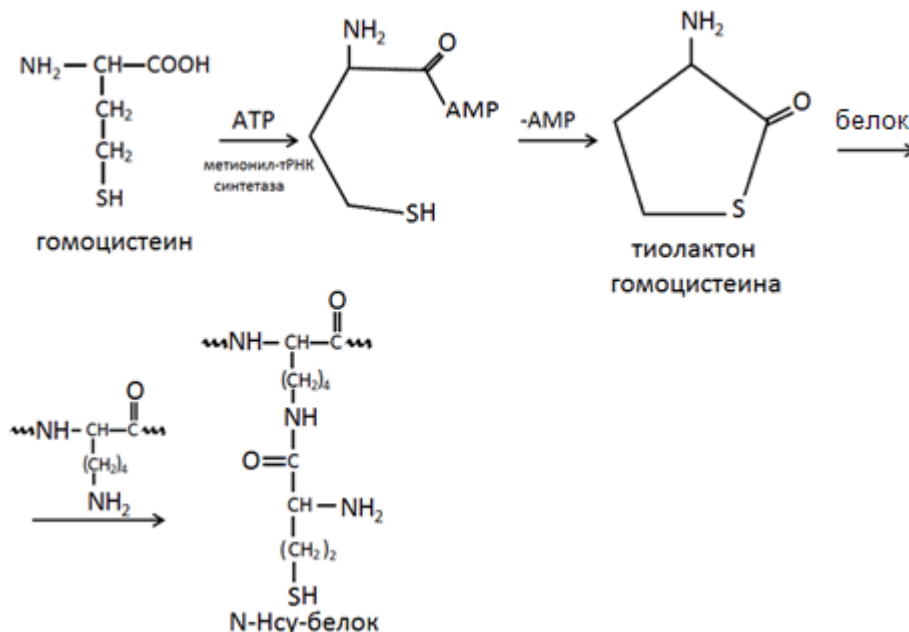


Рисунок 3. *N*-гомоцистеинилирование белка в организме (*N*-Нсу-белок) [288].

Так, Брюшковой Е.А. на «примере трипсина и метионил-тРНК-синтетазы было показано, что множественное гомоцистеинилирование по остаткам лизина вызывает формирование большого числа межмолекулярных сшивок, что приводит к утрате активности и денатурации этих ферментов [21]. В ряде других экспериментов показано, что возможно гомоцистеинилирование таких белков, как сывороточный альбумин, фибриноген, трансферрин, миоглобин, цитохром С и других» [201, 293, 328, 340, 361].

В 1974 году Harker L. и соавт. продемонстрировали наличие грубых изменений в строении эндотелиальных клеток, развитие дисфункции эндотелия и появление артериальных тромбозов при длительном введении Нсу-Т экспериментальным животным.

В более поздних исследованиях на культуре клеток эндотелия человека, был подтвержден более выраженный повреждающий эффект Hcy-T, чем у Hcy, вызывающий развитие каспаз-независимой гибели клеток эндотелия [379].

Кроме этого, гомоцистеинилирование представляет собой еще один вариант образования неоантигенов [182, 288] и активацию аутоиммунных процессов. Кроме этого, N-Hcy-Lys-альбумины по сравнению с нативными белками, более предрасположены протеолитическому воздействию и окислению [289].

Начиная со второй половины восьмидесятых годов XX века, различные исследователи отмечают корреляционные взаимоотношения между состоянием иммунной системы и концентрацией аминотиолов [131, 155, 234, 392]. Аутоантитела против модифицированных ЛПНП гомоцистеином-тиолактоном были обнаружены еще в 1998 году [24]. В последующем, IgG и IgM против N-гомоцистилированных белков были зафиксированы как у здоровых людей, так и у пациентов с сосудистыми катастрофами, причем у больных с ишемическим инсультом их титр был значимо выше [55, 141, 239]. Этот факт можно объяснить тем, что аутоантитела, изначально являясь защитным механизмом избавляющим организм от измененных белков, при фиксации измененных белковых структур на мембране эндотелиальных клетках, приводит к активации аутоиммунных процессов уже против эндотелиоцитов, и как следствие – к их повреждению. Присутствие нео-антигена длительное время, индуцирует развитие хронического воспалительного процесса и формирование в этой зоне атеросклеротической бляшки [94, 111].

Содержание общего Hcy и титр аутоантител к N-Hcy-альбумину у больных хронической ИБС в 5 раз выше, чем у здоровых [55]. При этом, у лиц, страдающих атеросклерозом с уровнем общего гомоцистеина не выходящего за пределы нормы, аутоантитела к модифицированному аминотиолами альбумину выявляются лишь у 25,5%, в то время как, среди пациентов с высокой концентрацией ГЦ 41,2% из них являются серопозитивными [89]. В группе больных ишемическим инсультом на 50% выше как средний уровень гомоцистеина плазмы, так и аутоантител к N-Hcy-Lys-белкам класса IgG, по

сравнению с группой здоровых испытуемых [252]. Исходя из этого, наличие аутоантител к N-Нсу-альбумину является независимым предиктором раннего развития ИБС [249]. Кроме этого образуется N-Нсу-фибриноген. Изменение структуры фибриногена приводит к увеличению у него протромбогенных свойств, и как следствие – увеличению риска тромбозов у лиц с гипергомоцистеинемией [315, 341, 369].

1.1.3. Механизмы развития гиперкоагуляции при гипергомоцистеинемии

Роль ГГЦ в развитии тромбоэмболических осложнений в настоящее время активно изучается [26, 98, 115, 124, 160, 186, 211, 267, 270, 363]. Одними учеными избытку гомоцистеина придается ведущее значение в развитии тромбозов [248, 277, 293], другими – напротив, отрицается роль ГГЦ в развитии каких-либо тромботических осложнений [283, 328]. Аргументы против значимой роли ГГЦ в развитии венозных тромбозов появились при анализе результатов ретроспективных и проспективных наблюдений, в ходе которого было выявлено несоответствие. Так, в мета-анализе M. den Heijer с соавт., 2005 года [211], включившем 24 ретроспективных (3289 случаев) и 3 проспективных исследования (476 случаев), показано, что увеличение концентрации Нсу на 5 мкмоль/л увеличивает риск развития венозных тромбозов на 27% в проспективных исследованиях (OR=1,27 95% CI: 1,01-1,59) и на 60% в ретроспективных исследованиях (OR= 1,6 95% CI: 1,1-1,34). В то же время, J. Ray [343], обобщив и проанализировав все известные к 2008 году данные о гипергомоцистеинемии, заявил о том, что в индукции венозных тромбозов отсутствует самостоятельная роль ГГЦ. К этим данным присоединился целый ряд авторов, считающих, что только при наличии наследственных и/или приобретенных факторов риска развития тромбозов реализуется протромботический потенциал Нсу [114, 145, 220, 250, 255, 394].

Тем не менее, полученные результаты В.М. Шмелевой убедительно свидетельствуют о том, что ГГЦ является наиболее частым обстоятельством в

развитии тромбоэмболических осложнений, действуя в 13% случаев в сочетании с такими факторами риска как дефицит антитромбина, циркуляции волчаночного антикоагулянта, мутации G1691A в гене фактора V и G20210A в гене протромбина, и в 27% случаев – самостоятельно [122, 160]. Кроме этого, наилучшим подтверждением самостоятельной роли ГГЦ в развитии тромбозов является реканализация тромбированных сосудов при коррекции ГГЦ [220].

Предлагаются различные варианты активации системы свертывания крови под воздействием повышенных концентраций Нсу.

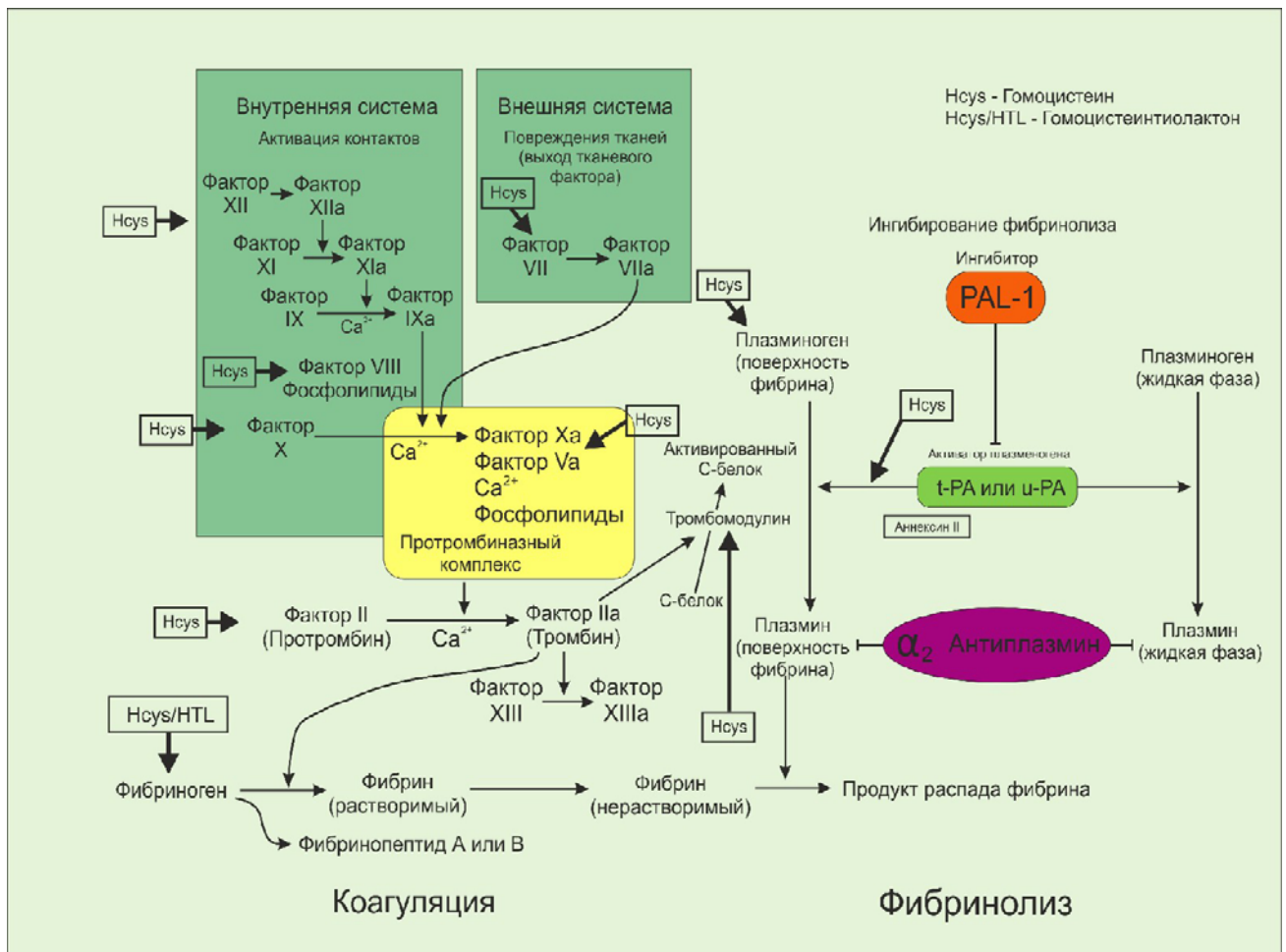


Рисунок 4. Влияние Нсу и Нсу-Т на системы гемостаза и фибринолиза [389].

Так, существуют данные о том, что при ГГЦ происходит увеличение прокоагулянтной активности плазмы крови за счет подавления экспрессии поверхностного тромбомодулина и активации протеина С [227, 335], уменьшение

экспрессии гепаран-сульфата с параллельным снижением активности антитромбина III [347], повышения активации V фактора и снижения инактивации его активной формы [166, 260], уменьшения числа рецепторов для активатора тканевого плазминогена [201], усиление экспрессии эндотелиоцитами тканевого фактора [106, 184, 293], рост активности VII фактора [299], окислительная модификации фибриногена [315, 369], нарастание связывания липопротеинов с фибрином [118] и активности фактора ингибитора тканевого пути (TFPI) [313], снижения связывания тканевого активатора плазминогена (tPa) и выработки плазмина [201].

Параллельно, со сдвигами коагуляционного звена гемостаза, наблюдается повышенная агрегация тромбоцитов, являющаяся следствием как снижения синтеза поврежденными Hcy эндотелиоцитами оксида азота [367, 396], простациклина PGI₂ [98], и усиленным высвобождением ими фактора фон Виллибранда [396]. Так и усиления биосинтеза тромбоцитами тромбосана A₂ [46, 274], экспрессии ими молекул адгезии [169, 226].

Повышенная агрегация тромбоцитов может быть объяснена также активацией NMDA рецепторов тромбоцитов избытком Hcy [292].

1.1.4. Активация NMDA-рецепторов гомоцистеином

До конца прошлого столетия считалось, что NMDA-рецепторы находятся только на нейронах и необходимы для их активации [129, 196]. Природным лигандом NMDA-рецепторов является L-глутамат, а ко-агонистом – глицин или D-серин. Уменьшение количества этих рецепторов приводит к нарушению функционирования синаптических контактов и развитию эксайтотоксического эффекта [92], вследствие резкого увеличения концентрации внутриклеточного Ca²⁺ в цитоплазме нейронов, что приводит к накоплению свободных радикалов, активации перекисного окисления липидов и клеточной смерти [196, 350].

Абушик П.А. считает, что «NMDA рецептор включает в свой состав: сайт специфического связывания медиатора (глутамин) в лиганд-связывающем домене, сайт связывания коагониста (глицина) и аллостерические модуляторные

сайты, расположенные во внеклеточной области рецептора и в ионном канале (сайты связывания двухвалентных катионов и потенциалзависимый Mg^{2+} -связывающий участок) и является гетеромерной структурой, состоящий из субъединиц трех типов: GluN1, GluN2A – GluN2D, GluN3A – 3B. Один рецептор всегда состоит из четырех субъединиц, при этом GluN1 субъединица является необходимой для формирования рецептора, так как при ее отсутствии рецептор не способен активироваться. Структурные различия GluN2 субъединиц определяют функциональную гетерогенность NMDA рецепторов в различных клетках.» [1]. Соотношение субъединиц, которые входят в состав рецепторного комплекса, зависит от степени активности синапсов и изменяется с возрастом.

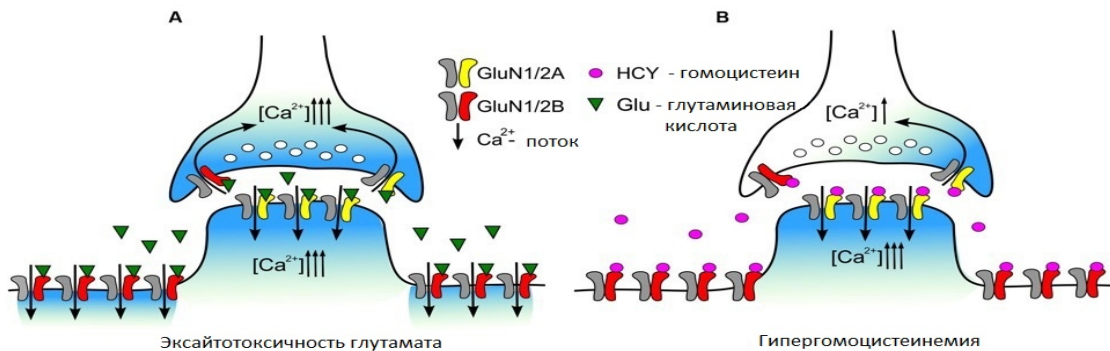
Показано, что NMDA рецепторы способны пропускать ток только в результате деполяризации постсинаптической мембраны, которая в физиологических условиях следует за стимуляцией АМПА рецепторов и приводит к разблокированию NMDA канала. Эта уникальная особенность NMDA рецепторов и их высокая проницаемость для Ca^{2+} позволяют рецепторам Glu NMDA типа играть важную задачу в работе центральной нервной системы [241]. Активированные глутаматом рецепторы открывают ассоциированные с ними ионные каналы, через которые в нейрон поступают ионы Na^+ и Ca^{2+} , а в межклеточное пространство выходят ионы K^+ . Вход Na^+ в нейроны приводит к деполяризации мембраны и Ca^{2+} начинает поступать в клетки через потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы [92]. При активации рецепторов глутаматом Ca^{2+} поступает в цитоплазму также из эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и митохондрий [129]. Выход Ca^{2+} из ЭПР, в частности, вызывается и инозитолтрифосфатом [317], который образуется в результате активации фосфоинозитидного обмена под влиянием взаимодействия Glu с метаботропным рецептором пятого типа (mGluP5) [272].

В 1997 г. И.А.Костанян и соавторы обнаружили, что глутамат хорошо связывается с мембранами лимфоцитов человека [76]. Позже было показано, что глутаматные рецепторы присутствуют на лимфоцитах крыс. Их активация сопровождается ростом концентрации свободных ионов кальция и активных форм

кислорода в клетке, что в свою очередь активирует каспазу 3 [20]. Это демонстрирует необходимость глутаматной регуляции работы иммунной системы.

В некоторых электрофизиологических исследованиях, показано взаимодействие гомоцистеина с Glu-связывающим сайтом NMDA рецептора [8, 285, 364]. Поэтому, этот подтип рецепторов может являться потенциальной мишенью для ГГЦ [364]. Кроме этого показано, что Hcy также может взаимодействовать и с I группой метаботропных глутаматных рецепторов [18].

Эффект, вызванный активацией NMDA рецепторов гомоцистеином сходен с таковым у глутамата [рис. 5].



Интерпретация данных схемы. (A) В течение эксайтотоксического эпизода глутаминовая кислота активирует внесинаптические GluN2B - содержащие NMDAR и синаптические GluN2A-содержащие NMDAR. Вход внешнего Ca²⁺ в нейроны через открытые каналы NMDAR вызывает внутриклеточную перегрузку Ca²⁺. (B) В течение гипергомоцистеинемии гомоцистеин уменьшает чувствительность внесинаптических GluN2B-содержащие NMDAR, происходит ограничение накопления внутриклеточного Ca²⁺ во внесинаптической зоне. Синаптические GluN2A-содержащие NMDAR, активируются гомоцистеином, что позволяет накапливать внутриклеточный Ca²⁺ в постсинаптических областях и пресинаптическом терминале, индуцируя синаптические колебания Ca²⁺.
* NMDA-рецептор (NMDAR)— ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат (NMDA).

Рисунок 5. Активация Hcy NMDA рецептора [338].

В исследованиях, посвященных оценке эксайтотоксического влияния Hcy на лейкоциты и нейроны, было показано, что антагонисты глутаматных рецепторов – МК-801 и D-AP5 тормозят эффект Hcy [18]. Таким образом, предполагается, что

одним из путей воздействия Нсу на данные клетки является его влияние в качестве агониста ионотропных глутаматных рецепторов NMDA-класса [18, 292].

Е.А. Владыченской и соавторами было показано, что активация NMDA-рецепторов лимфоцитов крысы приводит к повышению концентрации внутриклеточного кальция и следующее за ним увеличение уровня свободных радикалов, источником которых являются НАДФН-оксидаза и NO-синтаза. При этом изменяется синтез IFN- γ и TNF- α [29]. Машкина А.П. показала, что Т-лимфоциты оказались субпопуляцией, более чувствительной к NMDA по сравнению с NK-клетками, в то время как на продукцию АФК В-лимфоцитами NMDA действия не оказывал [85]: «в условиях индуцированного воспаления спинного мозга *in vivo*» было показано, что Т-лимфоциты, мигрировавшие в очаг воспаления, презентуют NMDA-рецепторы на своей мембране. NMDA отрицательно влияет на реактивную способность лимфоцитов, препятствуя синтезу интерферона γ (IFN- γ) в субпопуляциях NK-клеток и Т-лимфоцитов». Зайнуллина Л.Ф. идентифицировала субъединицы NMDA-рецепторов на Т-лимфоцитах и доказала изменение субъединичного состава NMDA-рецепторов: GluN1/GluN2B и/или GluN2D в нестимулированных клетках на GluN1/GluN2A и/или GluN2B в TCR-стимулированных Т-лимфоцитах [56].

Брюшкова Е.А. (2011) обнаружила, что интактные и активированные *in vivo* нейтрофилы по-разному реагируют на повышенные концентрации Нсу – у интактных клеток Нсу выступает в роли умеренного супрессора уровня АФК (за счет ингибирования миелопероксидазы), а в условиях воспаления – индуктора продукции АФК [32].

1.1.5. Системная эндотелиальная дисфункция

Пласт эпителиальных клеток, располагающихся в монослое и отделяющий кровоток от более глубоких слоев стенки сосуда называется эндотелий. Клетки эндотелия выполняют с одной стороны функцию барьера, с другой – являются одним из самых крупных паракринных органов, поддерживающим тонус и анатомическую структуру сосудистой стенки, сосудистый гомеостаз, местное

воспаление [35]. В настоящее время он признан диссеминированной, гетерогенной и динамичной структурой, обладающей иммунологическими, синтетическими, метаболическими, секреторными функциями, которые направлены на поддержание гомеостаза [161]. Кроме этого эндотелиоциты выполняют транспортную функцию, осуществляя перенос газов, питательных веществ и метаболитов между кровью и тканями и рецепторную, обеспечивающую миграцию лейкоцитов в ткани [170]. Нарушение баланса продукции этих веществ или/и механизмов их взаимодействия понимается как эндотелиальная дисфункция (ЭД) [49, 375].

Возникшая ЭД приводит к вазоконстрикции, повышенному клеточному росту, пролиферации гладкомышечных клеток, накоплению в них липидов, тромбообразованию в сосудах, что способствует развитию атеросклероза, гипертонической болезни, венозным тромбозам и т.д. [23, 30, 50-51, 88, 236, 379].

При этом, несмотря на большое количество исследований, посвященных развитию дисфункции эндотелия, ее механизмы развития до конца не изучены. По мнению А.П. Поляковой [117], «она полиэтиологична, так как большое количество факторов оказывает влияние на целостность и функциональную активность эндотелия. Считается, что дисфункция эндотелия развивается вследствие повреждения эндотелиальных клеток, в том числе механически при повышенном артериальном давлении, свободными радикалами, образующимися при гипергомоцистеинемии, иммунной системой на фоне их модификации гомоцистеином-тиолактоном, факторами агрессии лимфоцитов при активации NMDA-рецепторов гомоцистеином и т.д.

Это приводит к снижению продукции и/или биодоступности NO и повышенной активности PAC, увеличению синтеза эндотелина-1, и как следствие – к нарушению регуляции процессов вазоконстрикции и вазодилатации; активации локального иммунного ответа и формированию провоспалительного статуса, формированию дисбаланса про- и антикоагулянтных факторов и гиперкоагуляции». Оксид азота кроме сосудорасширяющего эффекта оказывает противовоспалительный, антиагрегантный и антиоксидантный эффекты, способен

уменьшать проницаемость сосудистой стенки [367], изменять деформабельность эритроцитов [382].

В качестве признанного прямого маркера дисфункции эндотелия выступают циркулирующие эндотелиальные клетки (ЦЭК). Это зрелые дифференцированные клетки, отделяющиеся от стенки эндотелия в процессе его повреждения [396]. Число ЦЭК в периферической крови у здоровых людей мало, что обусловлено медленным процессом обновления эндотелия при отсутствии патологических состояний и быстрым удалением нежизнеспособные ЦЭК из кровотока ретикулоэндотелиальной системой [132]. Однако, при различных патологических состояниях (инфекционные заболевания, злокачественные новообразования, иммуноопосредованные васкулиты, артериальные гипертензии и др.) наблюдается увеличение числа этих клеток [127, 198]. Рост ЦЭК у больных с острым инфарктом миокарда (в первые сутки) заболевания является независимым предиктом развития осложнений [2, 134, 137].

Восстановление поврежденного эндотелия осуществляется исключительно эндотелиальным прогениторным клеткам (ЭПК) [5, 127, 279]. К факторам, способствующим привлечению их в область повреждения и повышению их плазменного титра, относятся липопротеиды высокой плотности, оксид азота, эстрогены, сосудистые эндотелиальные факторы роста (VEGF) [178].

ГГЦ, по мнению разных ученых, может являться как независимым фактором вызывающим развитие дисфункции эндотелия (чаще всего за чет активации свободно-радикальных процессов), так и обстоятельством, усиливающим уже имеющееся повреждение эндотелия [181, 256, 265, 296, 352]. Однако по сегодняшний день четкое представление о взаимосвязях между гипергомоцистеинемией и развитием дисфункции эндотелия нет.

1.1.6. Нарушение процессов метилирования ДНК

Гипометилирование связывают с обменом Hcy. Эту аминокислоту называют «физиологическим регулятором уровня метилирования» [165, 181]. В основе процесса метилирования лежит присоединение метильной группы к цитозину, что

приводит к конформационным изменениям спирали ДНК и, как следствие, нарушению эффективного взаимодействия белков с этим участком ДНК [238, 276].

Повышенные концентрации Hcy нарушают процесс метилирования ДНК, что, в свою очередь, приводит к измененной экспрессии генов (в том числе эндотелия, гладкомышечных клеток сосудистой стенки) и нарушению обмена биологически активных молекул (таких как фосфолипиды, полисахариды, холин, катехоламины и др.). Некоторые исследователи предполагают, что Hcy, с одной стороны ингибирует рост клеток сосудистого эндотелия, с другой – вызывает пролиферацию гладкомышечных клеток, и как следствие этого вызывает внутриполостное сужение сосудов [223, 302, 312, 372].

При проведении исследований на культурах клеток печени и микроглии было убедительно показано, что повреждение ДНК Hcy опосредованное – через активацию свободнорадикального окисления липидов, а действие S-аденозилметионина прямое [266, 281].

1.1.7. Индукция апоптоза

Активация процесса апоптоза возможна двумя основными путями. Первый путь – обусловлен возбуждением рецепторов, воспринимающих информацию извне клетки. Поэтому его называют рецепторным, путем «рецепторов смерти», или внешним путем запуска программы апоптоза. Второй – митохондриальный, или внутренний, так как он начинается на внутренней мембране митохондрии и включается при внутренних изменениях или повреждении клетки [40, 158] (рис. 6).

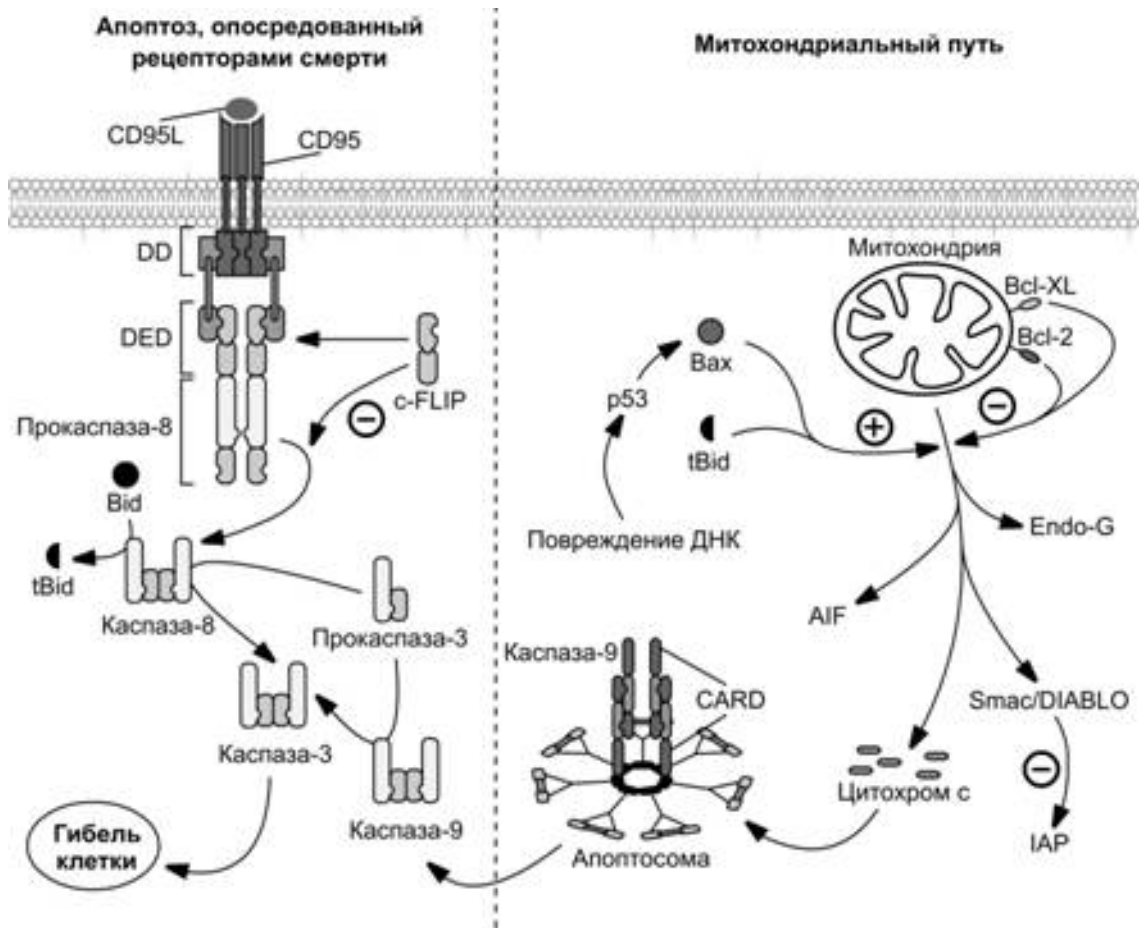


Рисунок 6. Пути активации процесса апоптоза [158].

К «рецепторам смерти» относятся такие рецепторы, как Fas (CD95; APO-1), TNFR (tumor necrosis factor receptor) и т.д. Активируются они только после взаимодействия к ним специфического лиганда – FasL (Fas-лиганд), TNF (tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли).

Далее, проактивированный рецептор в цитоплазме клетки присоединяет к себе домен клеточной смерти (для Fas – это домен смерти ассоциированный с рецептором Fas, для TNFR – TNF receptor associated death domain). Затем, этот вновь образовавшийся комплекс, активируя прокаспазу 8, превращает ее в каспазу 8, инициирующую каспазу 3, что приводит к необратимой программируемой гибели клетки [6].

Во втором механизме запуск апоптоза индуцируется снижением мембранного потенциала митохондрии. Это, в свою очередь, вызывает развитие отека митохондриального матрикса и раскрытие пор внутренней мембраны. Как

следствие этого нарастает окислительно-восстановительный коллапс и появляются разрывы внешней мембраны митохондрии и выходу митохондриальных белков в цитоплазму (в том числе и цитохрома С). Последний вызывает активацию каспазы 9, растормаживающей в свою очередь каспазы 3 и 7.

Таким образом, оба сигнальные пути апоптоза соприкасаются на этапе активации каспазы 3. В дальнейшем путь апоптоза у них протекает одинаково.

Вызывание апоптоза возможно так же в том случае, если так называемые «рецепторы зависимости» по какой-то причине не связались со своими специфическими лигандами. К ним относят рецепторы: DCC, UNC5H1-4, RET, MET, неогенин, EphA4, patched, ALK, TrkA, TrkC, рецептор нейтрофина p75NTR, рецептор андрогена, avb3- и a5b1-интегрины [11, 68]. Все они, имея совершенно разную структуру, обладают свойством вызывать апоптоз, находясь в инертном состоянии и блокировать его после взаимодействия со своим лигандом [40].

Кроме двух основных путей индукции апоптоза существует, например, сигнальный путь эндоплазматического ретикулума, обусловленный стимуляцией прокаспазы 12 [158, 222].

Особое внимание в последнее время уделяется процессам регуляции апоптоза в клетке. В настоящее время описан ряд веществ, регулирующих процессы апоптоза и способных, как стимулировать, так и ингибировать его.

К одному из основных стимуляторов апоптоза относится белок p53, участвующем в распознавании и проведении внутриклеточных сигналов, регуляции как деления, так и смерти клетки, координации в ней метаболических процессов, а также обеспечивающем регуляцию межклеточных взаимодействий. Причем его основной ролью является обеспечение стабильности генома [11].

Решающим ингибитором апоптоза является белок Bcl-2, предотвращающий митохондриальный сигнальный путь путем восстановления ионного потенциала внутренней мембраны митохондрий, снижая повреждающий эффект АФК и стабилизации цитохрома С [202].

Доказано, что ГГЦ активирует апоптотический процесс. Так, Kruman I.I. и соавторы в 2000 году продемонстрировали, что концентрация Hsu влияет на

величину и скорость развития апоптоза в эксперименте. Например, концентрация аминотиола 250 мкМ вызывала апоптоз практически всех нейронов гиппокампа в культуре клеток в течение 28 ч, а концентрация 0,5 мкМ (что является нормой *in vivo*) в том же эксперименте приводила к апоптозу лишь у 40% нейронов в течение 96-144 часов [253].

Немецкие ученые обнаружили, что Hcy способен связывать ионы Cu^{2+} , являющиеся кофактором цитохром-С-оксидазы, что вызывает инактивацию этого энзима, развитию окислительного стресса и апоптотической гибели нейронов [257].

Рае Y.S. и соавторы убедительно показали дозозависимую токсичность Hcy на культуре гранулярных нейронов мозжечка. Hcy в дозе более 300 мкМ в течение 16-22 ч активируя NMDA-рецепторы, вызывает усиленную продукцию свободных радикалов и запуск процесса апоптоза [294].

Другие ученые продемонстрировали ингибирование активности нейрональных сетей Hcy и его окисленными производными. Причем, показано, что сам Hcy блокирует спонтанную активность нейросети только при достаточно больших его концентрациях, а вот его окисленные производные, например гомоцистеиновая кислота, оказывают этот эффект даже в очень малых концентрациях [20]. Эффект обусловлен воздействием аминотиолов на NMDA-рецепторы нейронов [92].

1.1.8. Роль гипергомоцистеинемии в патогенезе атеросклероза и гипертонической болезни

В 1996 году, в ходе Фремингемского исследования были установлены корреляционные взаимоотношения между высокими концентрациями гомоцистеина в плазме крови и ростом ишемической болезни сердца. Эти взаимоотношения оказались настолько значимыми, что легли в основу гомоцистеиновой теории атеросклероза [7, 131, 178]. В ходе таких проспективных когортных исследований, как Physicians Health Study, British United Provident

Study, Trombo Study, British Regional Heart Study было получено подтверждение этой теории.

C. Bousheu и соавт. [163], в крупном метаанализе обнаружили, что повышение концентрации Hcy на 5 мкмоль/л, так же как увеличение уровня холестерина на 0,5 мкмоль/л приводит к росту риска развития инфаркта миокарда и инсульта на 30%.

Hcy в плазме окисляется с образованием Hcy-T, смешанных дисульфидов Hcy и гомоцистина [287]. В ходе этого процесса образуются активные формы кислорода, активирующие процессы перекисного окисления липидов, ингибирование оксида азота, и снижению его биодоступности [20, 254, 268]. Кроме этого, Hcy способствует окислению и модификации липопротеинов низкой и очень низкой плотности [89, 109, 182, 235], что активирует иммунные механизмы развития атеросклероза и гипертонической болезни [247]. ГГЦ вызывает уменьшение синтеза серосодержащих гликозаминогликанов. Следствием этих процессов является снижение эластичности сосудов и их способности к дилатации. Это, в свою очередь, приводит к повреждению эндотелиоцитов [178, 232] и формированию дисфункции эндотелия [236, 296, 307, 375, 392]. Ответ эндотелия на повреждение всегда одинаков: экспрессируется тканевой фактор, активируются некоторые факторы гемостаза, ингибируется экспрессия тромбомодулина на поверхности клеток, что приводит к развитию дисбаланса в работе системы свертывания крови, фибринолиза и антикоагулянтной системы [49, 214, 395].

Таким образом, доказано, что ГГЦ является одним из основных факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, аллергических и аутоиммунных процессов, нарушения репродукции и т.д. Однако, основная масса исследований посвящена изучению последствий ГГЦ, развившейся вследствие нарушения метаболизма метионина, что приводит в повышению уровня этого аминотиола первоначально внутри клетки. Влияние же экзогенной ГГЦ на функционирование различных клеток организма практически не изучено.

1.2. Единая клеточно-гуморальная система защиты организма

В восьмидесятых годах прошлого столетия учеными Читинской государственной медицинской академии была выдвинута и подтверждена научная концепция, представляющая системы иммунитета, гемостаза, фибринолиза, калликреин-кининовую, ренин-ангиотензин-альдестероновую и неспецифическую резистентность (в том числе, синтез белков острой фазы воспаления), процессы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в единой клеточно-гуморальной защитной системе организма [79].

Так, в экспериментах *in vivo* показано, что у тимэктомированных животных развивается гиперкоагуляция [78]. Аналогичные изменения развивались у птиц при удалении сумки Фабрициуса [153]. Введение же тималина в одном случае и бурсилина – в другом, нивелировали как недостаточность иммунного ответа, так и склонность к тромбозам [80].

Эти данные подтвердились в клинической практике. Так у людей с тяжелыми патологическими процессами наблюдалось развитие, как иммунодефицита, так и развитие синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови [81], купирующиеся введением иммуномодуляторов [78].

При изучении этого феномена, было показано, что иммунная система участвует в регуляции системы гемостаза дуалистично – как активируя сосудисто-тромбоцитарное и коагуляционное звенья, фибринолиз и антикоагулянтные системы [153], так и их, ингибируя [154]. Механизмов, объясняющих полученные данные несколько. Рассмотрим основные из них.

1.2.1. Роль аутоантител к факторам свертывания крови в поддержании гемостатического потенциала организма

Большая часть иммуноглобулинов, циркулирующих в составе крови, представляют собой аутоантитела к собственным антигенным детерминантам организма, которые играют важную роль в поддержании гомеостаза организма [321].

Boyden S.V. (1966) ввел понятие «естественные антитела» для определения иммуноглобулинов, присутствующих в биологических жидкостях практически здоровых неиммунизированных людей, полагая, что они являются первичным неспецифическим естественным барьером на пути внешних патогенных агентов [188]. В дальнейшем Jerne N. (1985) создал идиотип-антиидиотипическую теорию регуляции иммунного ответа. Согласно данной теории в организме здорового человека обязательно образуются антитела к любым антигенным компонентам собственного организма, то есть аутоантитела [295].

В настоящее время получено множество доказательств наличия в кровотоке здоровых лиц аутоантител, реагирующих со всевозможными антигенами, такими как: гормоны и рецепторы к ним, факторы свертывания крови, цитокины, белки цитоскелета, ДНК и т.д. [55, 153, 321].

Однако, реакция между антигеном и антителом, может иметь различные последствия, зависящие от таких показателей как, концентрация участников реакции, локализация процесса, специфичность и роль антигена. Основная функция любых антител состоит в их способности связывать потенциально опасное вещество, и затем транспортировать его в то место, где оно может быть разрушено, либо использовано, при диссоциации иммунного комплекса [9, 237]. Тем самым, аутоантитела в условиях нормы, поддерживают иммунный гомеостаз, регулируют иммунный ответ, транспорт и функциональную модуляцию биологически активных молекул.

В процессе активации любых факторов свёртывания крови и фибринолиза расщепляется пептидная связь, удерживающая ту часть белка, которая закрывает активный сайт, что позволяет ферменту начать свою работу. При этом,

открывшиеся активные детерминанты, становятся антигенами и стимулируют синтез к ним аутоантител (аАт), обладающих антикоагулянтными свойствами [339].

Кроме этого, показано, что у здоровых людей в плазме содержатся аАТ и к неактивным факторам свертывания крови [78, 154]. Авторы объясняют это тем, что при иммобилизации проферментов изменяется конформация белка и частично обнажаются скрытые Аг детерминанты. Наличие аАт позволяет регулировать нормальную работу системы свертывания крови и предупреждать как гиперкоагуляцию, так и гипокоагуляцию. В патологии избыток или недостаток аАт приводит к разбалансировке систем и развитию либо тромбозов, либо излишней кровоточивости [30, 81].

1.2.2. Врожденный иммунный ответ и система гемостаза

Врожденный иммунный ответ – это генетически закрепленный ответ против любых микроорганизмов и эндогенных продуктов деструкции тканей организма. Причем элиминация патогена, в отличие от адаптивного звена иммунной системы, происходит в течение нескольких минут, часов. К эффекторам неспецифической защиты относятся моноциты/макрофаги, дендритные клетки, гранулоциты, натуральные киллеры, НКТ, лаброциты, $\gamma\delta$ Т-клетки [245, 322]. Их действие проявляется в первую очередь в реакциях фагоцитоза и цитолиза, активации ответа острой фазы воспаления, презентации антигена и инициации адаптивного звена иммунной системы [142-143, 173]. Эти все реакции возможны только при участии цитокинов (рис. 7). При этом, интерлейкины 1, 6, 8, 11, 12, 18, фактор некроза опухолей стимулируют, как сосудисто-тромбоцитарное звено, так и коагуляционное звено системы гемостаза с одновременным торможением фибринолиза [69, 82-83, 154, 271].

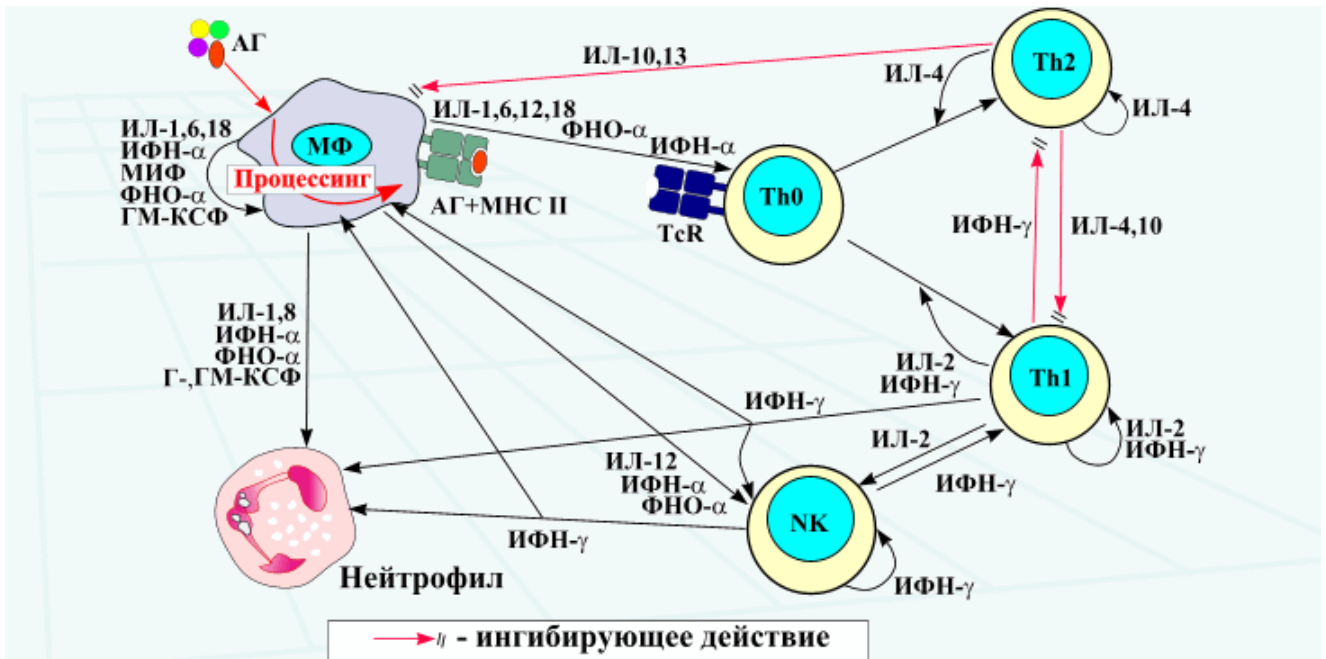


Рисунок 7. Роль цитокинов в иммунном ответе [78].

Их эффект чаще всего развивается опосредованно, за счет активации фибробластов, гладких миоцитов и эндотелиоцитов в очаге воспаления, что сопровождается усилением синтеза ими тканевого фактора, биологически активных веществ, появлению на поверхности вовлеченных в процесс клеток молекул адгезии. Стимулированные эндотелиоциты экспрессируют фактор фон Виллебранда, TF, активаторы и ингибиторы фибринолиза.

Прямым влиянием обладает, IL 12, за счет связывания им гепарина [83].

Параллельно с этим, интерлейкины 1 и 6, а также фактор некроза опухолей стимулируют в гепатоцитах синтез белков острой фазы воспаления. В частности – С-реактивного белка (CRP), амилоида P, фибриногена, оромукоида, α_2 -макроглобулина, оказывающих свое влияние на функционирование системы гемостаза.

Противовоспалительные свойства CRP обусловлены его следующим способностями:

- индуцировать экспрессию антагониста рецептора интерлейкина-1 в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC) [204];

- вызывать усиление секреции цитокина IL-10 и подавление выработки IL-12 иммунокомпетентными клетками [83, 366];
- ингибировать респираторной взрыв нейтрофилов [217];
- способствовать высвобождению провоспалительных цитокинов из эндотелиальных клеток (VCAM-1, ICAM-1 и E-селектин) и моноцитов (MCP-1) и усилению адгезии моноцитов к ним [116, 185].

Однако, его высокие концентрации вызывают торможение всех этих реакций [204]. Связываясь с фактором активации тромбоцитов, он усиливает агрегацию тромбоцитов и секрецию ими серотонина и тромбоксана A₂ [384]. Кроме этого, он блокирует эффекты гепарина, что приводит к ускоренному образованию фибрина [376].

Кроме того, CRP подавляет синтез простаглицина (PGI₂) в эндотелиоцитах [205, 385].

Амилоид P, в свою очередь, способен отменить действие CRP, а также он усиливает эффект низких концентраций гепарина, тем самым вызывая гипокоагуляцию [116].

Орозомукоид, напротив, блокирует антикоагулянтные свойства гепарина и стимулирует агрегацию тромбоцитов [82-83].

Альфа-2 макроглобулин является ингибитором без прямой блокировки активного сайта протеиназ (сериновую, цистеиновую, аспарагиновую и металлопротеиназную), металлопротеиназ 2 и 9 [343]. Способен образовывать устойчивый комплекс со следующими цитокинами: интерлейкинами (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10), а также с TNF α , INF α и β , фактором роста фибробластов, тромбоцитов (PDGF), нервов (NGF) [345], трансферрином и его поверхностным рецептором, дефенсином и основным белком миелина, рядом гормонов [190].

Его участие в регуляции работы системы гемостаза заключается в ингибировании им коагуляции путем инактивации тромбина, калликреина, и плазмина [348].

Таким образом, можно сделать вывод, что врожденное звено иммунной системы оказывает выраженное влияние на функционирование системы гемостаза.

1.2.3. Тромбоциты и феномен образования лейкоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов

Адгезия относится к жизненно необходимым процессам, так как при этом образуются контакты между клеточными элементами, что обеспечивает целостность ткани, осуществляется миграция лейкоцитов, развивается иммунный ответ. Необходимым условием ее развития является наличие молекул адгезии. При этом эффект взаимодействия клеток с ними многогранный – это и обеспечение плотного межклеточного контакта, и стимуляция рецепторов (при условии взаимодействия через лиганд), а также изменение самого рецептора (в том случае, если сигнал передается изнутри клетки), что влечет за собой изменение функциональной активности всех составляющих ткани.

Тромбоциты, являются участниками, как иммунного ответа, так и системы гемостаза [78]. Эти их способности обусловлены спектром биологически активных веществ, синтезируемых и секретируемых ими, а также их способностью вступать во взаимодействие, как с форменными элементами крови, так и эндотелиоцитами [28].

При секреции БАВ из α -гранула тромбоцитов в окружающую среду выделяются:

- ✓ фактор P4 – хемоаттрактант для нейтрофилов, моноцитов, фибробластов; индуктор высвобождения гистамина из базофилов; стимулирует адгезию нейтрофилов и эозинофилов [81];
- ✓ В-тромбомодулин – ингибирует деятельность полиморфноядерных лейкоцитов [336];
- ✓ RANTES – фактор, регулирующий активацию Т-клеток – инициирует выброс гистамина тучными клетками и секрецию катионных белком эозинофилами [27];

- ✓ макрофагальный воспалительный пептид-1 α (MIP-1 α , macrophage inflammatory protein-1 α) – усиливает выброс гистамина базофилами, вызывает хемотаксис лимфоцитов CD8+, повышает агрегацию тромбоцитов [169];
- ✓ все классы иммуноглобулинов – IgG, IgM, IgA и IgE [393];
- ✓ фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) – инициирует ангиогенез, способствует выходу белков в интерстиций и развитию отека [177];
- ✓ тромбоцитарный фактор роста – PDGF – вызывает с одной стороны, пролиферацию фибробластов и гладких мышечных клеток, с другой – является хемоаттрактантом для фагоцитов [187];
- ✓ трансформирующий фактор роста β (TGF β) – активирует заживление ран, вызывает хемотаксис и стимуляцию клеток миелоидного ряда [322];
- ✓ фактор роста фибробластов (FGF – fibroblast growth factor) – активирует пролиферацию фибробластов и эндотелиоцитов [282];
- ✓ эпидермальный фактор роста (EGF) – принимает участие в росте эпителиоцитов, фибробластов [69].

БАВ плотных гранул так же влияют на формирование защиты ткани при повреждении. Так, аденозиндифосфат увеличивает кислородную реакцию в полиморфноядерных лейкоцитах, серотонин и гистамин, некоторые метаболиты арахидоновой кислоты повышают проницаемость сосудистой стенки. Активированные тромбоциты синтезируют IL-1 β [393].

Таким образом, благодаря содержимому гранул, тромбоциты принимают участие в процессе воспаления на всех его стадиях, необходимыми участниками которого являются лимфоциты. Однако, в условиях нормы, лимфоциты на своей поверхности имеют малое число молекул адгезии, что не позволяет им мигрировать в субэндотелий. Кроме этого, в них отсутствует актомиозиновый комплекс, что не позволяет этим клеткам самостоятельно проходить через повреждённую сосудистую стенку в ткани. Тромбоциты необходимы для того, чтобы, во-первых, позволить лимфоцитам вступить во взаимодействие с поврежденной сосудистой стенкой, при этом, тромбоциты, адгезированные на коллагене уменьшают реакцию лимфоцитов на коллаген как на антиген.

Во-вторых, кровяные пластинки, благодаря своей ретракции продвигают лимфоциты в очаг воспаления и позволяют тем самым выполнить ими свою основную функцию. В ходе данного процесса, тромбоциты секретируют факторы роста, что влияет на репарацию тканей [28], тканевой фактор, необходимый для локализации очага воспаления [184].

Влияние гипергомоцистеинемии на формирование лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов практически не изучено.

1.2.4. Роль эндотелиоцитов, лейкоцитов, фибробластов в гемостатических реакциях организма

Совокупность эндотелиоцитов – это динамический орган, который координирует гомеостатические реакции организма и реагирует на внешние стрессы [395].

Эндотелиальные клетки имеют множество функций, специфичных для их местоположения; они проявляют значительную фенотипическую гетерогенность у разных видов и обладают особенностями, которые различны для каждого сосудистого русла [170]. Основной его функцией является регулирование системного кровотока и перфузии тканей посредством изменений диаметра и тонуса сосудов. Кроме этого, эндотелий действует как барьер, который избирательно контролирует движение жидкости, ионов и других макромолекул между циркулирующей кровью и окружающими тканями [180]. Служа в качестве селективного барьера, эндотелий также регулирует рекрутирование и экстравазацию провоспалительных лейкоцитов в ответ на повреждение ткани и инфекцию посредством экспрессии молекул клеточной адгезии и цитокинов [216]. Эндотелиальные клетки выступают в качестве вектора ангиогенеза, образования новых кровеносных сосудов, что необходимо для правильного формирования грануляционной ткани и восстановления тканей. Кроме этого, они на своей поверхности экспрессируют молекулы, регулирующие активацию тромбоцитов и каскад коагуляционного звена системы гемостаза, тем самым

поддерживая кровоток и предотвращая образование тромба после повреждения сосуда [161].

В настоящее время в процессе свертывания крови выделяют три фазы: инициация, амплификация и распространение. Иницирование происходит при повреждении сосудов с последующей активацией эндотелия и воздействием субэндотелиальных клеток, которые включают, среди прочего, гладкомышечные клетки и фибробласты. Субэндотелиальный коллаген подвергается воздействию крови и обеспечивает начальную адгезию циркулирующих тромбоцитов к открытой поверхности коллагена через фактор фон Виллебранда. VWF – играет двойную роль в гемостатических реакциях. С одной стороны, он необходим для адгезии тромбоцитов к коллагену в местах повреждения сосудов, с другой – стабилизирует fVIII [323]. Образующийся тромбоцитарный агрегат отвечает за остановку кровопотери. Параллельно с этими событиями активированные эндотелиальные клетки и клетки гладких мышц экспрессируют мощную прокоагулянтную молекулу тканевого фактора (TF), запускающего каскад коагуляции [189] и образованию тромбина. В фазе амплификации циркулирующие тромбоциты, которые прилипли к месту повреждения, активируются тромбином и образуют тромбоцитарную пробку. Это обеспечивает поверхность для активации других прокоагулянтных факторов. Взятые вместе, агрегаты тромбоцитов и сшитый фибрин образуют стабильный сгусток, который изолирует место повреждения и предотвращает чрезмерную потерю крови.

Поскольку система свертывания крови является мощным, высокоэффективным процессом, жесткое регулирование системы свертывания крови имеет важное значение для предотвращения ненужного образования сгустка [323]. Соответственно, любые нарушения регуляторных путей могут привести к развитию тромбозов (Рис. 8).

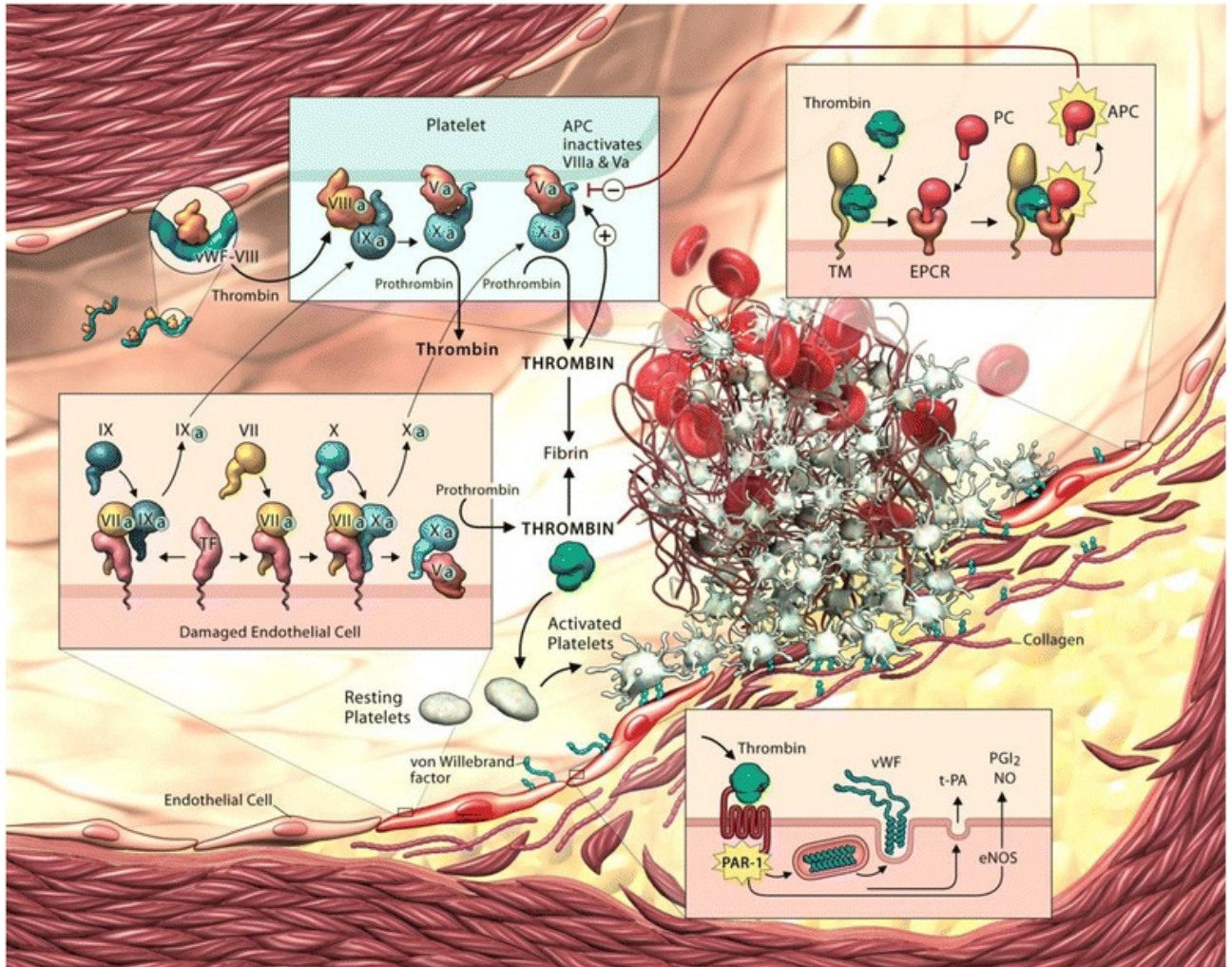


Рисунок 8. Вклад эндотелия в свертывание крови [395].

В каскаде свертывания крови генерация тромбина инициируется активацией внешнего пути, запускаемой активацией fVII с образованием fVIIa, или активацией внутреннего пути, запускаемой активацией fXII с образованием fXIIa. Во внешнем пути, активированные эндотелиальные клетки экспрессируют TF на клеточной поверхности. TF конститутивно экспрессируется также во внесосудистых тканях, таких как фибробласты и клетки гладких мышц [186] и некоторых форменных элементах крови [81].

Однако, если культивируемые эндотелиальные клетки экспрессируют ТФ в присутствии провоспалительных молекул, таких как липополисахарид, фактор некроза опухоли- α (TNF- α), интерлейкин- 1β (IL- 1β), тромбоксан А2, рост эндотелия сосудов фактор и тромбин [161], то в эксперименте на животных на поверхности эндотелиоцитов ТФ обнаруживается крайне редко [225]. Причем эффекты ТФ, происходящего из эндотелиальных клеток, могут не ограничиваться системой коагуляции. Так, комплекс ТФ/fVIIa активирует протеазоактивированный рецептор (PAR)-2 [184], который вызывает провоспалительный ответ, микрососудистые эндотелиальные клетки индуцируют ангиогенез и образование коллатеральных сосудов посредством высвобождения богатых ТФ микровезикул [175].

Интактный эндотелий экспрессирует различные антикоагулянты, такие как TFPI, тромбомодулин, EPCR и гепарин-подобные протеогликаны [242, 347]. Эндотелиальные клетки также секретируют эктонуклеотидазу CD39 / NTPDase1, которая метаболизирует агонист тромбоцитов АДФ, и ингибиторы адгезии тромбоцитов, такие как оксид азота и простаглицлин [395].

Как только раневой дефект восстановлен, эндотелиальные клетки высвобождают про-фибринолитические молекулы, чтобы разрушить сгусток и металлопротеазы, чтобы расщепить агрегаты тромбоцитов. Растворение сгустка индуцируется фибринолитическими агентами, такими как t-PA и PA урокиназного типа (u-PA). t-PA – это белок весом 70 кДа, который активирует фибринолитическую систему путем преобразования плазминогена в плазмин [380].

Эндотелий представляет собой динамическую структуру, которая регулирует сложное взаимодействие системы свертывания с окружающими клетками и тканями. Когда стресс превышает определенный порог, покоящийся эндотелий запускает многочисленные механизмы, вызывающие свертывание (например, посредством экспрессии ТФ) и антикоагуляцию (например, посредством экспрессии рецепторов тромбомодулина, EPCR и PAR-типа). Одновременно, активированные эндотелиальные клетки адгезируют тромбоциты

в месте повреждения (например, путем экспрессии VWF), где он служит в качестве опорной поверхности для формирования про-коагулянт комплексов и агрегацию кровяных пластинок.

Вклад белых кровяных телец в процесс коагуляции является предметом давнего интереса ученых. В нормальных физиологических условиях лейкоциты способствуют поддержанию текучести крови. Например, циркулирующие моноциты экспрессируют антикоагулянтные факторы: эндотелиальный рецептор протеина С (EPCR), тромбомодулин, и ингибитор пути тканевого фактора (TFPI) [323]. Однако, в провоспалительных или апоптотических условиях лейкоциты могут быстро подвергаться фенотипической трансформации, синтезировать и секретировать прокоагулянтные факторы или агенты, которые активируют коагуляцию. Кроме того, клеточная поверхность лейкоцитов может служить местом для сборки и активации фактора свертывания [81, 125].

Моноциты являются крупнейшим внутрисосудистым источником TF [184]. Показано, что в покоящихся моноцитах наблюдается низкий уровень TF, быстро нарастающий при их активации различными агентами [375].

Активированные моноциты также выделяют микровезикулы, богатые гликопротеиновым лигандом 1 (PSGL-1) P-селектина, которые несут TF, фосфатидилсерин и другие регуляторы коагуляции [173]. Экспрессия TF другими подтипами лейкоцитов является более спорной. Показано, что покоящиеся нейтрофилы не экспрессируют тканевой фактор [187], Однако, в моделях *in vitro* [319] и на животных моделях [208] на мембране полиморфноядерных лейкоцитов обнаруживают TF. Это может быть результатом захвата нейтрофилом TF из микровезикул моноцитов [244].

Кроме этого, нейтрофилы и, в меньшей степени, моноциты и базофилы высвобождают матричные металлопротеиназы и сериновые протеазы, такие как катепсин G и эластаза, из цитоплазматических гранул в ответ на стимуляцию [183], которые способствуют активации коагуляции с помощью многочисленных механизмов, включая непосредственную активацию кофакторов фактора V (FV)

[171], FVIII, зимогена FX [371]. Они также могут разрушать антикоагулянтные факторы, такие как антитромбин, гепарин-кофактор II и / или TFPI [218].

Внеклеточные нейтрофильные ловушки (NET) также способствуют активации процесса свертывания крови. Интактные сети действуют как каркас, который концентрирует прокоагулянтные эффекторы, включая тромбоциты, эритроциты, фактор фон Виллебранда (VWF), TF, катепсин G, эластазу, фибриноген и фибронектин [221, 233]. Внеклеточная ДНК запускает активацию пути контакта через FXI и FXII. Гистон H4 связывается с протромбином и генерирует тромбин путем автоактивации. Митохондриальная ДНК также может ингибировать антикоагулянтные пути, защищая тромбин от антитромбин-опосредованной инактивации [297], нарушая активацию протеина C тромбин-ТМ [227].

Высвобождаемые лейкоцитами антимикробные ферменты, цитокины и фрагменты митохондрий могут модулировать антикоагулянтную активность эндотелиальных клеток. Цитокины, такие как TNF α и IL -1 β , могут подавлять экспрессию протеина C и тромбомодулина [83]. Гистоны цитотоксичны для эндотелиальных клеток [193] и стимулируют экзоцитоз эндотелиальных тел Вейбеля-Палада, вызывая высвобождение VWF и / или P-селектина [216].

Активированные базофилы высвобождают гистамин, мощный стимулятор секреции VWF [82]. Кроме того, как цитокины, так и генерируемые нейтрофилами окислители, такие как HOCl, ухудшают расщепление VWF протеазой ADAMTS13, потенциально увеличивая долю циркулирующих мультимедиантов VWF с улучшенными способностями связывания тромбоцитов [371].

Активированные лейкоциты могут также вызывать активацию и агрегацию тромбоцитов, высвобождая мощные активаторы тромбоцитов, включая эластазу, катепсин G и фактор активации тромбоцитов [169, 273].

Как моноциты, так и нейтрофилы могут модулировать активность фибринолиза за счет экспрессии урокиназного активатора плазминогена (uPA) и его рецептора, а также рецептора плазминогена, а также енолазы, аннексина II и

гистона H₂B, которые локализуют плазминоген на поверхности лейкоцитов, и тем самым усиливая активацию тканевым активатором плазминогена (tPA) и / или uPA [87].

Кроме того, было показано, что эластаза инактивирует ингибитор активатора плазминогена и активирует плазмин в отсутствие tPA / uPA [187].

Таким образом, стимуляция лейкоцитов может модифицировать свертывание крови, при этом, активные факторы свертывания и тромбоциты также могут регулировать провоспалительную активность лейкоцитов. В контексте тромбоза эта взаимосвязь взаимной активации может служить для привлечения лейкоцитов в формирующийся тромб. И моноциты, и макрофаги экспрессируют активированный протеазой рецептор-1 (PAR-1), рецептор, связанный с G-белком, который активируется протеазами фактора свертывания крови [301]. Тромбин, посредством PAR-зависимых и -независимых механизмов, может индуцировать хемотаксис как нейтрофилов [387], так и моноцитов [195]. Наоборот, активированный протеин С ингибирует хемотаксис лейкоцитов посредством расщепления PAR и взаимодействия с интегринами $\beta 1$ и $\beta 3$ [227]. Активные факторы коагуляции также могут опосредовать высвобождение прокоагулянтных веществ и воспалительных агентов лейкоцитами. Тромбин может регулировать выработку провоспалительных цитокинов, включая интерлейкин-6 и фактор некроза опухоли- α , моноцитами посредством передачи сигналов PAR. Продукты распада фибрина и фибрина могут стимулировать высвобождение провоспалительных цитокинов из моноцитов и макрофагов путем передачи сигналов через TLR₄ [81]. Растворимый фибриноген является мощным индуктором дегрануляции нейтрофилов благодаря взаимодействию с интегрином $\alpha M\beta 2$ и может усиливать фагоцитарную активность, одновременно задерживая апоптоз нейтрофилов [82]. Кроме того, активированные тромбоциты могут взаимодействовать с нейтрофилами, вызывая дегрануляцию и образование NET [322].

Таким образом, гомоцистеин вызывая повреждение различных структур организма должен инициировать развитие единого клеточно-гуморального ответа

организма. Однако, данных о формировании такого ответа нами в доступной нам литературе не найдено.

Материалы и методы исследования

Лабораторные исследования выполнялись на базе НИИ «Молекулярной медицины» ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» (ректор – заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор А.В. Говорин). Набор клинического материала осуществлялся на базе НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Чита-2 ОАО «РЖД» (директор – к.м.н. П.В. Громов).

2.1. Исследование влияния экзогенной гипергомоцистеинемии на функциональную активность клеток***2.1.2. Культура клеток периферической крови***

Материалом для исследования являлась венозная кровь, полученная у 15 относительно здоровых, некурящих добровольцев – мужчин, средний возраст которых составил $35,4 \pm 4,7$ лет и 16 больных ишемической болезнью сердца (стабильная стенокардия 2 функционального класса). Кровь забирали из локтевой вены в пробирки с добавлением антикоагулянта – гепарина Li. Затем, по 1 мл крови помещали в 3 стерильные пластиковые пробирки, добавляли в каждую из них по 1 мл культуральной среды RPMI 1640 MACS^{CR} MCDIA (Германия). Затем, в две из них вносили растворы либо гомоцистеина в концентрации 50 мкмоль/л, NMDA в концентрации 50 мкмоль/л. В третью (контрольную) – эквивалентный объем физиологического раствора. После 4х часов инкубации при 37⁰С в 4,8% CO₂ определяли фенотип лейкоцитов, маркеры активации и экспрессию маркеров апоптоза и активации клеток.

Клетки периферической крови окрашивали пятицветной комбинацией моноклональных антител (Beckman Coulter, США) к CD4/CD19 конъюгированные с флуоресцентным красителем FITC (изотиоцианат флуоресцеина), CD162 – PE

(фикоэритрин), CD8/CD14 – ECD (комплекс PE с тexasским красным), CD62L – PC5 (комплекс PE с цианином-5) и к CD3 – PC7 (комплекс PE с цианином-7). Для удаления эритроцитов пробоподготовку проводили с использованием лизирующего раствора OptiLyse C (Beckman Coulter, США) по безотмывочной технологии. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлюориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США).

Для корректного исключения из зоны анализа всех частиц, которые не соответствовали по размерам и гранулярности живым лимфоцитам и моноцитам вводили необходимые логические ограничения в гистограммы распределения частиц по малоугловому, боковому светорассеянию, CD3 и CD14. В каждой пробе анализировали не менее 10^4 клеток.

Математическую обработку цитометрических данных проводили при помощи программ CXP v. 2.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США).

2.1.2. *Культура мононуклеаров*

Получение мононуклеарных лейкоцитов проводили с помощью осаждения клеток на градиенте плотности фиколла – 1,077 (Histopaque®-1077, Sigma, США). 1 мл разведенной крови наслаивали на 1 мл раствора фиколла-1,077 и центрифугировали в горизонтальном роторе при 400g в течение 30 минут. Мононуклеарные лейкоциты отбирали из интерфазного кольца, образовавшегося на границе смеси фиколла и разведенной крови, и отмывали 3 раза в культуральной среде. Количество клеток определяли на проточном цитофлюориметре "Cytomics FC-500" (Beckman Coulter, USA) используя панель моноклональных антител к CD14/CD45 конъюгированных с флуоресцентными красителями PC5/PC7, к панели добавляли ионный краситель 7-AAD (7-аминоактиномицин-D) для выявления живых клеток. В 1 мкл фракции содержалось 10000 клеток. Чистота мононуклеаров, полученных на градиенте плотности, составляла 96-98%. Затем фракцию мононуклеаров замораживали.

В культуральной жидкости и лизатах клеток ИФА методом исследовали молекулы адгезии ICAM-1, VCAM-1 и P-селектина, уровень тканевого активатора

плазминогена и ингибитора активатора плазминогена с использованием тест-наборов «eBioscience» (Австрия).

2.1.3. *Культура фибробластов*

Исследование проводилось на культуре фибробластов человека линии М-22. Клетки выращивали в среде DMEM (Германия) с добавлением 20% телячьей сыворотки, 20 мкг/мл гентамицина, 2 mM L-глутамин и 10 mM HEPES. Для исследования использовали культуру 4-6 пассажа с исходной концентрацией 20000 клеток на 1 см³. Затем, заседали 96-луночные плоскодонные планшеты для культивирования, предварительно ресуспендированными путем трипсинизации клетками в количестве 20 тысяч фибробластов на лунку в 100 мкл среды, прибавляли по 50 мкл раствора Hcy, разведенного в среде, в дозах от 3,5 мкг/мл до 100 мкг/мл и культивировали в течение суток в CO₂-инкубаторе «Sanyo» (Япония) при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности. Каждую дозу Hcy и контрольную среду вносили не менее чем в 8 лунок (1 вертикальный ряд). Затем клетки фотографировали при увеличении x1500. Пробы культуральной среды из каждой лунки разливали в микропробирки и замораживали при -80°C для последующих исследований. Фибробласты фиксировали 1% глутаровым альдегидом 30 минут, промывали раствором Хенкса и окрашивали кристаллическим фиолетовым. После отмывания и высушивания добавляли в каждую лунку по 100 мкл 50% этанола для элюции красителя из клеток. Оценку интенсивности окрашивания лунок проводили через 15–20 мин. на фотометре «DigiScan 400» (Австрия) при длине волны 620 нм. Для того чтобы исключить какое-либо влияние гомоцистеина на способность клеток к прилипанию, их добавляли к культурам клеток через 4 часа инкубации.

Интенсивность перекисного окисления липидов определяли по накоплению малонового диальдегида (МДА) по методу Л.И. Андреевой с соавт. (1988).

Уровни интерлейкинов (IL) и белков теплового шока (HSP) определяли в среде роста иммуноферментным методом с использованием диагностических наборов производства ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ» (Россия).

2.2. Конъюгирование гомоцистеина с сывороточным альбумином человека *in vitro*

Гомоцистеин в концентрации 150 мкмоль/л инкубировали в течение суток при температуре 4°C и 60 минут – 37°C с 5% раствором сывороточного альбумина человека. Затем проводили ультрацентрифугирование с порогом разделения 50 КДа, достигая тем самым отделения свободного Hcy от его конъюгатов с альбумином с помощью набора для центрифужной микрофльтрации Amicon Ultra, 0.5 мл, 50 КДа (Millipore, USA) на ультрацентрифуге Sigma 3-30K, ротор 12100, 15 мин при 14.000 g. Уровень Hcy до фильтрации, после фильтрации и в фильтрате определяли методом ВЭЖХ с ультрафиолетовой детекцией при 330 нм, и разделением на колонке Chromolith 100 × 4,6 мм, с использованием в качестве элюента ацетонитрил – 0,05 М, лимонную кислоту (10:90, v/v) [52].

2.3. Изучение влияния экзогенной гипергомоцистеинемии на организм животного

Животные всех исследуемых групп содержались в стандартных идентичных условиях. Экспериментальное исследование проводилось в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются в исследовательских и других научных целях» (Strasbourg, 18.03.1986 г.).

2.3.1. Моделирование гипергомоцистеинемии у интактных крыс и животных с иммунодефицитом

В эксперимент были включены сорок белых беспородных крыс-самцов, средней массой 150 г. У двадцати крыс вызывали иммунодефицит, другие двадцать составили контрольную группу.

Модель иммунодефицита получали путем внутрибрюшинного введения раствора циклофосфана быстрорастворимого (ООО «ЛЭНС-фарм».

Регистрационный номер: Р N 000459/01) в дозе 100 мг/м² 2 раза в неделю. Расчет площади поверхности тела животных производили по формуле Миха: $S \text{ (см}^2\text{)} = K^3 \sqrt{m^2} \text{ (г)}$, где K – коэффициент, равный для крысы – 9,13–11,05 [61].

Наличие иммунодефицита подтверждали определением иммунограммы методом проточной цитофлуориметрии с использованием коммерческого лизирующего/фиксирующего раствора VERSALYZE/IOTest3 (Beckman Coulter) и панели моноклональных антител IOTest (Beckman Coulter): первая панель – CD3-FITC/CD4-PC7/CD8-APC; вторая панель – CD3-FITC/CD45RA-PC7/CD161a-APC. Контрольные пробы инкубировали с иммуноглобулинами, мечеными флуорохромами (FITC, PC7, APC) соответствующего изотипа – мышинные IgG1, IgG2a IOTest (Beckman Coulter). Кровь забирали из подключичной вены в vacutainer, содержащий динатриевую соль ЭДТА, объемом 0,5 мл.

В последующем, десяти интактным и десяти крысам с иммунодефицитом вводили внутрибрюшинно гомоцистеин в концентрации 100 мкмоль на 1 мл ОЦК [102]. Другим десяти интактным и десяти иммунодефектным крысам вводили гомоцистеин-тиолактон в той же дозе. Расчет ОЦК крысы проводили в соответствии с соотношением 5-7 мл/100 г веса. Спустя 6 часов после инъекций аминотиолов кровь забирали вновь. Далее изучаемые вещества вводили один раз в сутки в течение девяти дней, после чего проводился забор крови и животных выводили из эксперимента путем передозировки эфирного наркоза.

2.3.1.1. Изучение ответа животного на модифицированный альбумин крысы

Получение крысиного альбумина осуществляли центрифугированием сыворотки крови с ультрафильтрацией с порогом разделения 100 кДа для отделения крупнодисперсных белков, а затем ультрафильтрацией с порогом 60 кДа с целью отделить белки меньшей молекулярной массы.

Далее получали модифицированный крысиный альбумин (по той же схеме, что и человеческий) и конъюгировали его 1% раствором глутарового альдегида с эритроцитами крысы. Для этого, трижды отмытые физиологическим раствором

эритроциты охлаждали до 0°C и разводили 1% глутаровым альдегидом до 5% суспензии, затем инкубировали 30 мин при 0°C при периодическом перемешивании. Фиксированные эритроциты отмывали 5 раз 0,15 М NaCl и 5 раз дистиллированной водой.

Отмытый осадок фиксированных эритроцитов в объеме 0,5 мл добавляли к 2,5 мл раствора модифицированного альбумина в 0,15 М фосфатном буфере с pH 7,4. Смесь инкубировали 1 час при комнатной температуре. После трехкратной отмывки эритроциты, конъюгированные модифицированным альбумином, использовали для проведения РПГА.

РПГА проводили в двух вариантах: с определением всех классов Ig и с определением цистеин-устойчивых антител (класса IgG) согласно методическим рекомендациям по постановке реакции пассивной гемагглютинации с цистеиновой пробой с целью диагностики сальмонеллезов (Центральный НИИ эпидемиологии Министерства здравоохранения СССР, 1980). С.В. Измествьев считает, что «основанием для подобного дифференцированного определения иммуноглобулинов является то, что при обработке сыворотки некоторыми редуцирующими веществами, в частности цистеином, IgG-антитела относительно устойчивы, тогда как IgM и IgA-антитела не специфически инактивируются, выпадая в осадок, что связано с большей молекулярной массой их по сравнению с IgG. Это позволяет определить удельное содержание IgG в сыворотке» [62].

Цистеин в соотношении 15 мг на 1 мл растворяли 0,1 М раствором NaOH и при значении pH 7,0-7,2 доводили до нужного объема 0,85% раствором NaCl. Одну часть сыворотки экспериментальных крыс, разведенную 1:5 физиологическим раствором, смешивали с равным объемом раствора цистеина, помещали в пробирку и заливали слоем стерильного вазелинового масла, вторую часть сыворотки (без цистеина) также заливали слоем вазелинового масла. Пробирки с сыворотками, обработанными и необработанными цистеином, выдерживали в термостате при 37°C в течение 18 часов.

Далее обе части сыворотки титровали в нескольких парных рядах соответственно числу эритроцитарных диагностикумов, начиная с разведения

1:30, в планшетах для иммунологических реакций однократного применения. Для разведения использовали забуференный 0,85% раствор NaCl (фосфатный буфер с рН 7,0-7,2). Эритроциты, конъюгированные глутаровым альдегидом с альбумином, модифицированным гомоцистеином и гомоцистеин-тиолактоном, в 2,5% разведении вносили в каждую лунку разведения сыворотки в равном объеме (0,1 мл). Каждый эритроцитарный диагностикум вносили в два ряда разведений сыворотки (обработанной и необработанной цистеином). В одну из лунок, содержащую растворитель без испытуемой сыворотки, вносили равный объем диагностикума для контроля спонтанной агглютинации. Контролем служили разведения исследуемых сывороток с несенсибилизированными эритроцитами, а также с эритроцитами, сенсибилизированными немодифицированным альбумином. Через 2 часа учитывали результаты по обычной для РПГА методике. Положительной считали реакцию в случае образования ровного слоя агглютинированных эритроцитов по всей поверхности лунки («зонтик»), отрицательной – компактный осадок эритроцитов в центре лунки («пуговка»). Количественную оценку проводили через отрицательный десятичный логарифм от титра разведения сыворотки, при котором регистрировалась положительная реакция».

2.3.1.2. Определение концентрации гомоцистеина

Уровень гомоцистеина у экспериментальных животных определяли методом ВЭЖХ по методу Дутова А.А. и соавторов (2010 г.) [52]. Результат пересчитывали в мкмоль/л [58].

2.3.1.3. Определение циркулирующих иммунных комплексов

«Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) у вышеописанных групп лабораторных животных определяли методом преципитации с раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ) (Sigma, США) в концентрации 3,5%; 7% и 10%. Показано, что линейный незаряженный полимер ПЭГ-6000 избирательно осаждает иммунные комплексы в зависимости от их молекулярной массы, сводя к

минимуму преципитацию свободных сывороточных белков. При концентрации 3,5% ПЭГ-6000 осаждает крупные комплексы. 7% ПЭГ-6000 осаждает ЦИК со средней молекулярной массой, 10% ПЭГ-6000 – низкомолекулярные комплексы.

Раствор полиэтиленгликоля готовили на 0,1 М боратном буфере pH 8,4. 20 мкл исследуемой сыворотки смешивали с 0,5 мл боратного буфера указанной концентрации; 0,4 мл этой смеси приливали к 0,4 мл 7%, 14% и 20% раствора полиэтиленгликоля (конечная концентрация 3,5%, 7% и 10%).

2.3.1.4. Изучение морфологических изменений тканей миокарда и показателей периферической крови

Данный эксперимент поставлен на сорока белых лабораторных крысах – самцах средней массой 150 г, одного возраста. Животные были разделены на четыре группы (n=10). Крысам первой и второй группы внутривенно вводили физиологический раствор, а животным третьей и четвертой группы – гомоцистеин в дозе 0,001 мг на 1 мл ОЦК. Крысы первой и третьей группы были выведены из эксперимента на 7 сутки, а второй и четвертой – на 14 сутки. Уровень гомоцистеина определяли методом ВЭЖХ, описанным выше.

Для гистологического исследования ткани сердца фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Серийные парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм изготавливали по стандартной методике. С целью обзорной окраски гистологические срезы окрашивали гематоксилин-эозином; для выявления компонентов соединительной ткани окрашивали пикрофуксином по Ван Гизону.

Исследование и морфометрический анализ тканей проводили с помощью микроскопа «Opticam PRO5» с использованием цифровой фотокамеры «Olympus CX-41» и программы анализа изображений «Optika Vision Pro»ver. 2.7.

Количественные изменения в периферической крови оценивали с помощью автоматического гематологического анализатора PENTRA 120 Retic согласно прилагаемой инструкции.

2.3.1.5. Изучение механизмов гибели кардиомиоцитов

Цитометрический анализ проводили в гомогенате миокарда крыс на проточном цитофлуориметре "Cytomics FC-500" (Beckman Coulter, USA), при этом регистрировали суммарно не менее 10000 событий. В образцах оценивали интенсивность флуоресценции Annexin V и PI. Сбор данных и компьютерную обработку осуществляли с использованием программы CXP Beckman Coulter, USA.

2.3.1.6. Изучение влияния экзогенной гипергомоцистеинемии на состояние эндотелия сосудов

Содержание оксида азота (NO) в плазме крови оценивали по количеству его стабильных конечных метаболитов– $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ с помощью реактива Грисса при длине волны 520,0 нм. За 7 суток до данного определения животных содержали на низконитратной диете.

Определение уровня эндотелина-1 в плазме крови проводили ИФА методом с использованием набора Endotelin (1-21), фирмы «Biomedica» (Австрия).

2.3.1.7. Изучение влияния экзогенной гипергомоцистеинемии на состояние систем иммунитета и гемостаза in vivo

Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов осуществляли стандартным методом прямого трех параметрического иммунофлуоресцентного окрашивания цельной крови с использованием коммерческого лизирующего/фиксирующего раствора VERSALYSE/IOTest 3 (Beckman Coulter) и панели моноклональных антител IOTest (Beckman Coulter): 1-ая панель – CD3-FITC/CD4-PC7/CD8-APC; 2-ая панель – CD3-FITC/CD45RA-PC7/CD161a-APC. Контрольные пробы инкубировали с иммуноглобулинами мечеными флуорохромами (FITC, PC7, APC) соответствующего изотипа – мышинные IgG1, IgM IOTest (Beckman Coulter). Цитофлуориметрию осуществляли на проточном цитофлуориметре "Cytomics FC-500" (Beckman Coulter, USA), при этом

регистрировали суммарно не менее 10.000 событий. Данные анализировали с помощью программы CXP Cytometer (Beckman Coulter).

Для получения мононуклеарной фракции клеток, кровь крысы фракционировали в 63%-ном растворе Перколла (GE Healthcare), центрифугируя при 400g в течение 30 мин. Фракцию собирали и отмывали от Перколла в растворе PBS pH 7,4. Клетки считали на проточном цитофлюориметре "Cytomics FC-500" (Beckman Coulter, USA) используя 1-ю панель моноклональных антител IOtest (Beckman Coulter) для крысы. Чистота мононуклеаров, полученных на градиенте плотности, составляла 96–98%.

Определение концентрации цитокинов (IL 1 α , IL 17 α , IL 4, MCP1, TNF α , INF γ) в плазме крови крыс проводили с помощью системы мультиплексного анализа FlowCytomix 5 plex (BMS826FF) в комбинации с Simplex Kit (BMS8635FF) соответствующих аналитов для крыс компании «Bender Medsystems» (Австрия). Полученные пробы анализировали на проточном цитофлюориметре Cytomics FC 500 («Beckman Coulter», США). Обработку цитометрических файлов осуществляли в программном обеспечении FlowCytomixPro 3.0 («Bender Medsystems», Австрия).

Уровни HNP 1-3 и LL-37 определяли иммуноферментным способом с диагностическими наборами производства «Нусcult biotech».

Содержание СРБ определяли методом иммунотурбидиметрии с латексным усилением.

Концентрацию церулоплазмина определяли путем оценки его ферроксидазной активности в сыворотке крови.

Коагулогические показатели определяли в крови, взятой из подключичной вены. Кровь стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Исследование проводили на программируемом оптико-механическом коагулометре – Минилаб 701 с использованием наборов для определения тромбин-теста (ТВ), активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), растворимого фибрин мономерного комплекса (РФМК) (производство НПО РЕНАМ, Россия).

Экспрессию тканевого фактора (TF) оценивали иммуногистохимическим методом. Исследование было выполнено с использованием парафиновых срезов миокарда экспериментальных животных биотин-стрептавидиновым иммунопероксидазным методом с крысиными моноклональными антителами к тканевому фактору производства Santa Cruz biotechnology (USA). Результат оценивали полуколичественно: как отрицательный, если окрашенных клеток определялось менее чем 10%; в остальных случаях, положительный результат оценивался количественно по шкале от 1 до 4 баллов. Шкала была построена следующим образом: 1 балл – 10-25% окрашенных клеток; 2 балла – 25-50% окрашенных клеток; 3 балла – 50-75% окрашенных клеток; 4 балла – более 75% окрашенных клеток, с расчетом критерия χ^2 (Chi-квадрат).

2.4. Влияние гипергомоцистеинемии на организм человека

2.4.1. Характеристика исследуемых групп

У исследуемых лиц осуществляли забор венозной крови системой Vacutainer натошак. В работе с обследуемыми людьми соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2000 ред.). Проведена экспертиза исследования в локальном этическом комитете ФГБОУ ВО ЧГМА. Все исследования проводились с информированного согласия испытуемых, после подписания ими формы добровольного информированного согласия.

2.4.1.1. Характеристика контрольной группы

Обследованы 76 практически здоровых добровольцев, не курящих в возрасте от 18 до 60 лет. Деление на группы происходило в зависимости от возраста: от 18 до 35 лет (30 человек) и от 36 до 59 лет (46 человек) – лица, проходившие ежегодное диспансерное обследование на базе НУЗ "Дорожная клиническая больница на станции Чита-2 ОАО "РЖД".

2.4.1.2. Характеристика группы больных

В исследование влияния экзогенной гипергомоцистеинемии на течение системной воспалительной реакции приняли участие кардиологические больные, мужского пола в возрасте от 40 до 60 лет, находившихся на стационарном лечении. В зависимости от диагноза больные были распределены на группы:

Первая группа (45 человек) – пациенты с риском развития сосудистых катастроф. В ее состав вошли лица в возрасте от 18 до 35 лет, относительно здоровые, с умеренным абсолютным суммарным сердечно сосудистым риском по шкале SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation). Систолическое артериальное давление (АД) составило 132,50 (127,25; 134,25) мм рт. ст. Уровень общего холестерина – 4,37 (3,50; 4,92) моль/л. Средний показатель индекса курения – 4,9 пачка/лет.

Вторая группа с диагнозом гипертоническая болезнь I стадии, 1 – 2 степени подъема артериального давления, со степенью риска 2 (20 человек). Диагноз выставлен на основании синдрома артериальной гипертензии, отсутствия признаков поражения органов мишеней, с исключением артериальных гипертензий другого генеза: нефрогенных, эндокринных, нейрогенных, гемодинамических, лекарственных.

Третья группа – пациенты с гипертонической болезнью II стадии, 2 – 3 степени подъема артериального давления, со степенью риска 3 (20 человек). Диагноз выставлен на основании синдрома артериальной гипертензии и наличия признаков поражения в органах-мишенях: гипертрофия левого желудочка; сужение артерий сетчатки; протеинурия или небольшое повышение концентрации креатинина в плазме крови; признаки атеросклероза аорты, крупных артерий.

Четвертую группу составили больные с диагнозом гипертонической болезни III стадии, 2-3 степенью подъема АД, 4-й степенью риска (очень высокий), с наличием ХСН, НК I-II А, I – II ФК по NYHA (20 человек). Диагноз выставлен на основании: синдрома артериальной гипертензии, наличия признаков поражения органов мишеней, наличия ассоциированных состояний (иличие

ХСН, подтвержденной по ЭхоКГ – диастолическая дисфункция левого желудочка по гипертрофическому типу).

Пятая группа – ИБС: стабильная стенокардия III ФК, осложнения: НК II А, III ФК (28 человек). Диагноз выставлен на основании синдрома ангинозных болей (сжимающего, давящего характера, локализованных за грудиной, связанных с небольшой физической нагрузкой, купирующихся приемом нитратов), синдрома хронической сердечной недостаточности (одышка смешанного характера при небольшой физической нагрузке – ходьба до 100 м, подъем на 1 этаж), данных ЭКГ и коронароангиографии.

Шестая группа – ИБС: острый коронарный синдром без подъема сегмента ST, осложнения: НК II А, III ФК (20 человек). Диагноз выставлен на основании отрицательной динамики ангинозного синдрома (учащение и усиление ангинозных болей, увеличение дозы потребляемых нитратов, снижение толерантности к физической нагрузке, данных ЭКГ), с исключением острого инфаркта миокарда.

Седьмая группа – больные с Q-инфарктом миокарда в острую стадию (20 человек). Диагноз выставлен на основании синдрома ангинозных болей, синдрома ЭКГ-изменений, резорбционно-некротического синдрома, синдрома острой левожелудочковой недостаточности, аритмического синдрома. У данной группы материал забирали в первые и седьмые сутки госпитализации.

Средний возраст пациентов первой и второй группы составил 21,7 лет, третьей, четвертой, пятой, шестой и седьмой – 45,9 лет.

Критериями исключения из исследования служили: острый пиелонефрит, гломерулонефрит, острая патология желудочно-кишечного тракта, органов дыхания, патология щитовидной железы, сахарный диабет, онкозаболевания, псориаз, прием лекарственных препаратов, повышающих уровень гомоцистеина, курение, вегетарианство.

Стационарное обследование всех пациентов проводилось по единому алгоритму, который включал в себя стандартные клинико-лабораторные исследования (липидный спектр (табл. 1), коагулограмму, общий анализ крови,

биохимические показатели крови, общий анализ мочи), дуплексное сканирование брахиоцефальных сосудов на аппарате «MEDISON EKO 7» (табл. 2).

Таблица 1

Показатели липидного спектра в исследуемых группах

Показатели/ группы	ОХ, ммоль/л	ЛПВП, ммоль/л	ТАГ, ммоль/л	ЛПНП, ммоль/л	ЛПОНП, ммоль/л	ИА
Первая контрольная, (n=30)	3,61 (3,13; 4,35)	1,23 (1,17; 1,51)	1,20 (0,89; 1,29)	1,75 (1,54; 2,13)	0,31 (0,24; 0,53)	2,01 (1,52; 2,22)
Вторая контрольная, (n=46)	4,21 (3,46; 4,71)	1,20 (1,15; 1,48)	1,30 (0,88; 1,81)	2,11 (1,67; 2,73)	0,35 (0,28; 0,55)	2,34 (1,93; 2,61)
Первая, (n=45)	4,37 (3,50; 4,92)	1,16 (1,08; 1,46)	1,30 (0,97; 2,16)	2,01 (1,58; 2,47)	0,29 (0,23; 0,46)	2,11 (1,70; 2,32)
Вторая, (n=20)	4,03 (3,60; 5,05)	1,26 (1,01; 1,74)	1,26 (1,01; 1,74)	2,27 (1,74; 3,00)	0,35 (0,26; 0,42)	2,34 (2,11; 2,56)
Третья, (n=20)	5,21 (4,76; 6,00)	1,84 (1,40; 2,08)	1,75 (1,17; 2,08)	3,10 (2,37; 3,75)	0,41 (0,35; 0,52)	2,95 (2,60; 3,20)
Четвертая, (n=20)	5,68 (5,19; 6,67)	1,34 (1,17; 1,61)	1,89 (1,40; 2,24)	3,55 (2,95; 4,22)	0,60 (0,45; 0,88)	3,51 (3,30; 3,96)
Пятая, (n=28)	5,22 (4,86; 5,82)	1,34 (1,13; 1,88)	1,60 (1,13; 1,88)	3,78 (3,24; 4,16)	0,48 (0,42; 0,57)	3,55 (3,38; 3,83)
Шестая, (n=20)	5,87 (5,24; 6,28)	1,09 (0,98; 1,35)	1,93 (1,48; 2,52)	3,95 (3,31; 4,50)	0,51 (0,43; 0,64)	4,06 (3,58; 4,92)
Седьмая, (n=20)	6,61 (6,17; 7,39)	1,12 (1,08; 1,14)	1,90 (1,56; 2,54)	4,29 (3,89; 5,21)	0,73 (0,60; 1,06)	4,97 (4,45; 5,73)

Показатели дуплексного сканирования брахиоцефальных сосудов у пациентов исследуемых групп

Группы / показатели	Первая контрольная	Вторая контрольная	Первая	Вторая	Третья	Четвертая	Пятая	Шестая	Седьмая
Тощина комплекса интима-медиа	0,55 (0,50;0,64)	0,64 (0,50; 0,70)	0,80 (0,71; 0,80)	0,80 (0,68; 0,87)	0,97 (0,89; 1,10)	1,10 (0,95; 1,20)	1,11 (0,94; 1,14)	1,12 (1,00; 1,30)	1,20 (1,11; 1,40)
Диаметр левой ОСА, мм	65,70 (61,00; 67,10)	54,00 (50,00; 58,70)	53,00 (49,80; 58,00)	52,50 (49,50; 56,00)	52,00 (48,00; 56,30)	60,50 (51,11; 66,00)	52,00 (49,10; 63,30)	50,00 (47,80; 54,50)	23,00 (19,00; 37,80)
Диаметр правой ОСА, мм	58,10 (56,10; 70,80)	58,00 (49,80; 63,10)	57,20 (50,80; 68,00)	55,60 (52,00; 68,50)	54,50 (52,00; 57,80)	54,00 (51,80; 57,30)	53,00 (51,00; 59,30)	53,00 (50,80; 57,30)	28,00 (20,80; 43,00)
Пиковая систолическая скорость кровотока левой ОСА, см/сек	82,00 (75,00; 85,50)	78,50 (71,75; 86,25)	81,00 (73,00; 87,00)	76,00 (66,75; 85,00)	74,00 (58,00; 83,00)	76,50 (56,75; 89,50)	68,00 (45,00; 85,00)	76,50 (46,53; 80,00)	78,00 (61,00; 80,00)
Пиковая систолическая скорость кровотока правой ОСА, см/сек	82,00 (77,25; 86,08)	81,00 (69,00; 85,25)	76,55 (64,00; 81,00)	75,45 (57,78; 98,03)	73,00 (60,00; 81,00)	70,50 (54,38; 80,00)	66,50 (51,00; 76,25)	57,75 (48,75; 71,25)	75,50 (67,75; 89,25)
Стенозы, %	-	-	-	-	12,45 (0,00; 21,25)	28,50 (7,50; 34,50)	28,00 (18,75; 35,25)	39,50 (35,00; 46,25)	38,50 (27,00; 48,50)

Значения систолического и диастолического артериального давления, полученные при утреннем измерении в соответствии с общепринятыми требованиями (табл. 3).

Таблица 3

Показатели артериального давления в исследуемых группах

Показатели/ группы	Систолическое АД, мм рт. ст.	Диастолическое АД, мм рт. ст.	ЧСС, ударов в минуту
Первая контрольная, (n=30)	122,50 (117,25; 124,25)	65,00 (62,75; 68,25)	69,00 (56,00; 75,25)
Вторая контрольная, (n=46)	123,50 (118,25; 125,25)	64,50 (59,75; 69,25)	70,6 (55,90; 78,25)
Первая, (n=45)	132,50 (127,25; 134,25)	83,50 (74,75; 88,00)	79,00 (66,00; 85,25)
Вторая, (n=20)	131,00 (126,75; 138,25)	75,00 (73,75; 82,00)	69,5 (62,00; 75,50)
Третья, (n=20)	179,00 (161,75; 189,75)	101,00 (100,00; 117,25)	70,00 (63,25; 77,00)
Четвертая, (n=20)	183,00 (174,00; 214,25)	110,00 (90,00; 126,25)	66,50 (59,75; 72,50)
Пятая, (n=28)	131,50 (124,75; 138,25)	77,50 (74,75; 85,25)	63,50 (57,75; 74,75)
Шестая, (n=20)	131,00 (123,25; 136,25)	80,50 (74,00; 86,25)	67,00 (59,00; 75,25)
Седьмая, (n=20)	124,50 (122,00; 128,25)	65,00 (62,75; 67,25)	72,50 (65,50; 77,25)

В исследовании влияния экзогенной гипергомоцистеинемии на общие проявления местной воспалительной реакции приняли больные мужчины хроническими риносинуситами (N= 23) в стадии обострения и ремиссии. Средний возраст пациентов составил $34,1 \pm 12,3$ лет.

Всем обследуемым проводилось стандартное оториноларингологическое обследование, включающее в себя наружный осмотр, переднюю и заднюю риноскопию, фаринго- и ларингоскопию, отоскопию, а также рентгенологические методы исследования околоносовых пазух, бактериологическое исследование отделяемого слизистых носа.

В данный фрагмент исследования не включались пациенты с артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца, сахарным диабетом, злокачественными новообразованиями, аллергическими и аутоиммунными заболеваниями, хроническим алкоголизмом, курящие, больные с патологией щитовидной железы, болезнями крови, хроническими заболеваниями внутренних органов, риносинуситами вирусной и грибковой природы, полипозом полости носа.

Забор крови на исследования производили из локтевой вены.

2.4.2. Концентрацию гомоцистеина в образцах определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией при 330 нм и разделением на колонке Chromolith 100 × 4,6 мм с использованием в качестве элюента ацетонитрил – 0,05 М лимонную кислоту (10:90, v/v) [52].

2.4.3. Количество циркулирующих эндотелиоцитов (СЕС, ЦЭК) определяли методом проточной цитофлуориметрии на аппарате FC (BC) 500. Использовались антитела, меченные флуорисцентными красителями: CD146+, CD45-, CD 34+, CD 105+, также использовался ионный краситель 7AAD для выявления живых и мертвых клеток эндотелия. Определялось количество CD146+CD45- клеток на 500 000 клеток белой крови (реактивы фирмы Beckman Coulter).

2.4.4. Уровни цитокинов определяли иммуноферментным способом с диагностическими наборами производства ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ» (Россия).

2.4.5. Абсолютное число тромбоцитов определяли на гематологическом анализаторе PENTRA 120 Retic-.

2.4.6. Исследование агрегации тромбоцитов производили на модели отечественного агрегометра марки «Биола» с использованием АДФ и ристомицина. При анализе агрегатограмм учитывались параметры по кривой среднего размера агрегатов (СРА): степень агрегации – максимальное значение среднего размера агрегатов (Ед); скорость агрегации – максимальный наклон кривой среднего размера (Ед/мин).

2.4.7. Оценка характера изменений параметров коагуляционного гемостаза проведена по общепринятым показателям: протромбиновое время, международное нормализованное отношение, тромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время, уровень фибриногена.

Пространственный рост фибринового сгустка наблюдали с помощью прибора «Регистратор Тромбодинамики Т-2» («Гемакор», Москва). При этом сгусток формируется и растет от иммобилизованного на поверхности тканевого фактора (TF) в не перемешиваемом тонком слое свободной от тромбоцитов плазмы, содержащей ингибитор контактной активации. Одновременно автоматически программой анализируются следующие параметры: T_{lag} – задержка роста сгустка, V_i – начальная скорость его роста, V_s – стационарная скорость роста, D – его плотность, T_{sp} – время начала спонтанного роста, $C_1, 15, 30$ – размер основного сгустка на 1, 15 и 30 минуте. Кроме того, программой предусмотрена фоторегистрация роста сгустка через 5, 15 и 30 мин.

2.4.8. Уровень аутоантител к тромбину определялся по методу, описанному ранее Цыбиковым Н.Н. [153]. Детекцию аутоантител осуществляли анти-G-антителами (для образцов плазмы крови) мечеными пероксидазой хрена ("Вектор-бест", Новосибирск). Уровень антител оценивали по разнице экстинкции между лунками, сенсibilизированными и несенсibilизированными тромбином. Полученный результат выражали в единицах оптической плотности (OD450).

2.4.9. В сыворотке крови всех обследуемых определяли содержание окисленных ЛПНП и антител к ним методом ИФА (иммуноглобулины класса G), с использованием тест-наборов «Biomedica» (Германия), параметры липидного спектра – с помощью коммерческих наборов реактивов компании «HUMAN» (Германия).

2.4.10. Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) – методом преципитации с 3,5% раствором полиэтиленгликоля (молекулярный вес 6000) (В.В. Меньшиков, 1987).

2.4.11. Иммунные комплексы, содержащие холестерин и триглицериды, определялись по методу Б.Б. Шойбонова [119].

2.5. Статистический анализ Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакетов прикладных программ Microsoft Excel и Statistica 6. Так как в работе представлены в основном малые выборки, что приводит к существенному отличию t -распределение от нормального, для сравнения данных использовали непараметрические методы — U -тест Манна-Уитни для двух независимых выборок, критерий Вилкоксона для сравнения двух зависимых выборок, критерий χ^2 (хи-квадрат) для проверки статистической гипотезы о наличии связи между двумя качественными признаками. При нормальном распределении признака использовали t -критерий Стьюдента.

Корреляционный анализ проводили по методу Спирмена, позволяющий определить изменения переменных в одном направлении и сравнением рангов. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r), может принимать значения от -1 до +1 (нулевое его значение свидетельствует об отсутствии корреляции). При этом, значения коэффициента корреляции близкие к плюс единице или к минус единице свидетельствуют лишь о силе взаимосвязи переменных прямой или обратной, но ничего не говорят о причинно-следственных отношениях между ними.

Показатели приведены в виде медианы и 25 и 75 перцентиля – $Me(25; 75)$.

Статистически достоверными считались данные при количественной характеристике случайностей (p -значение) не более 0,05.

Для изучения вклада изучаемых показателей и их взаимосвязи на формирование дисфункции эндотелия, развития гиперкоагуляции у экспериментальных животных использовался метод главных компонентов.

В исследованиях живого организма всегда присутствует большое общее количество исследуемых связей. Однако многие из них являются статистически не значимыми, что позволяет не принимать их во внимание и интерпретировать. Кроме того, многие показатели имеют между собой различно выраженные зависимости. Факторный анализ дает возможность конструирования на основе этих признаков более сложные, интегрированные признаки (индексы, факторы). При этом число таких комплексов будет значительно меньше, нежели число

исходных признаков. В результате этого мы получаем новые признаки, которые компактно несут в себе гораздо больший объем информации, нежели каждый из исходных признаков в отдельности и появляется возможность отфильтровать случайную составляющую, получить более надёжную информацию о структуре как самих исходных признаков, так и о структуре исследуемых групп пациентов.

Первый этап анализа заключается в получении матрицы смещения, а на ее основе – корреляционной матрицы. Затем проводится собственно факторизация матрицы корреляций, что позволяет выделить первоначальные факторы и тем самым уменьшить размерность объема данных.

Корреляционная матрица представлена в виде таблицы:

Переменные	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Фактор 4	Фактор 5
V 1	показатель корреляции	показатель корреляции	показатель корреляции	показатель корреляции	показатель корреляции
V 2	показатель корреляции	показатель корреляции	показатель корреляции	показатель корреляции	показатель корреляции
V 3	показатель корреляции	показатель корреляции	показатель корреляции	показатель корреляции	показатель корреляции
V 4 и т.д.	показатель корреляции	показатель корреляции	показатель корреляции	показатель корреляции	показатель корреляции

В дальнейшем определяются величины собственного значения факторов, характеризующие значимость (вес) каждого фактора. В таблице они располагаются по ее убыванию. Кроме анализа табличных величин всегда полезно оценить динамику величины собственного значения по графику. Выделение факторов заканчивается, когда график практически превращается в прямую линию.

Так, например, на рисунке 9 видно, что значимыми являются практически только 3 фактора. Начиная с четвертого, линия становится горизонтальной.

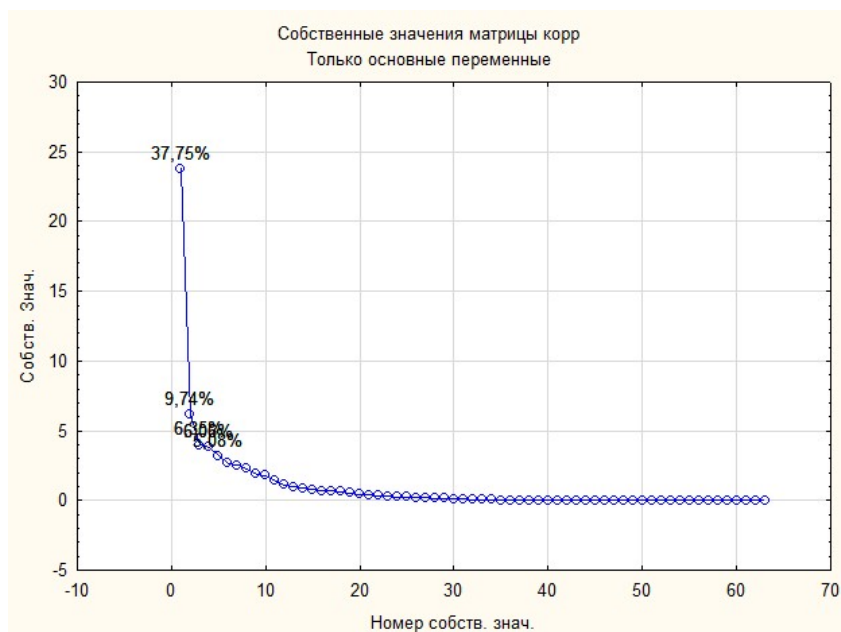


Рисунок 9.
Точечная диаграмма
значимости факторных
моделей.

Третий этап анализа заключается в поиске оптимального расположения в переменных в факторном анализе. Графически переменные отображаются в виде векторов, а факторная нагрузка – в виде проекции данного вектора на соответствующую ось координат (рис. 10).

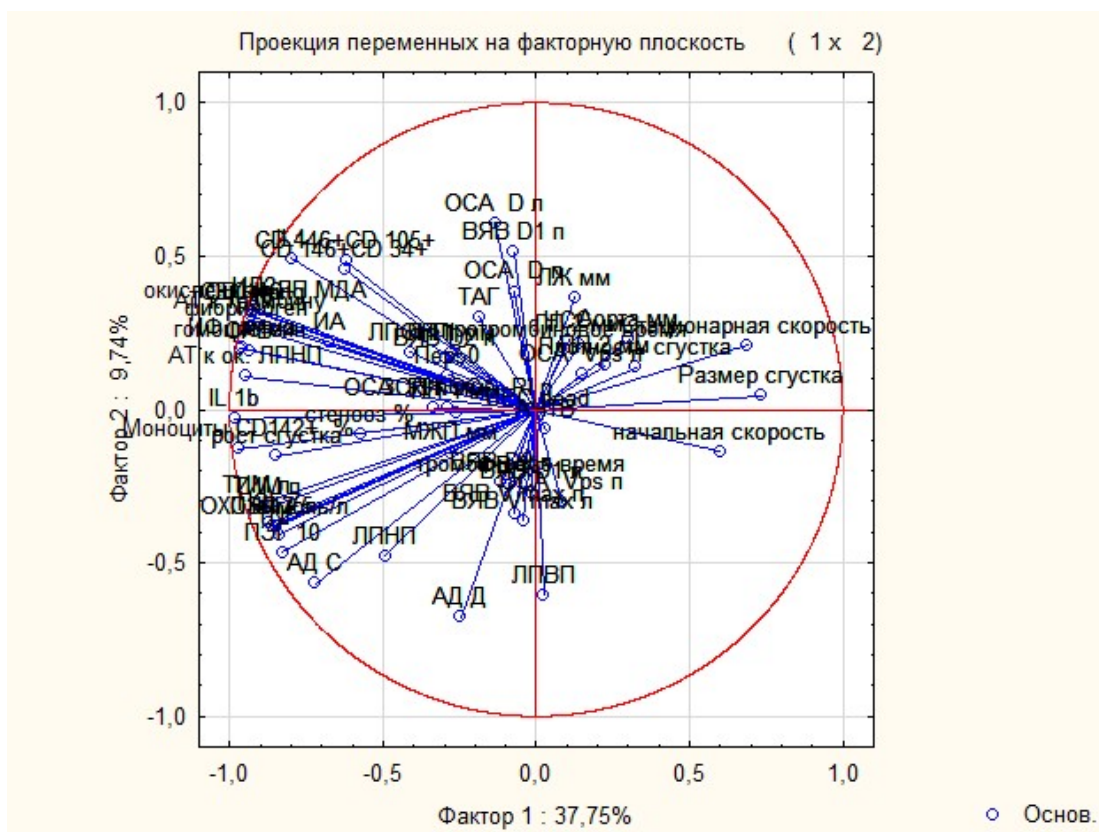


Рисунок 10. Факторное пространство изучаемых переменных.

Цель данного этапа заключается в получении объяснения влияния одной группы переменных одними факторами, а другой – другими.

При построении математической модели для оценки влияния различных факторов в изменение поперечного размера сосудистой стенки использовался метод множественной пошаговой регрессии, позволяющий не только выявить наличие зависимости между независимой переменной и одной или несколькими зависимыми переменными, но и определить эту зависимость количественно.

Глава 3

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Влияние гипергомоцистеинемии на состояние организма человека

3.1.1. Роль гипергомоцистеинемии в развитии системной воспалительной реакции

Накапливающиеся в современной литературе данные демонстрируют, что атеросклероз является иммунологически опосредованной болезнью [7, 111, 212, 247, 373]. Одним из основных факторов риска развития атеросклероза является повышенный уровень гомоцистеина [69, 72, 203, 234]. Влияние же гомоцистеинемии на функционирование иммунной системы, как в норме, так и патологии описано не достаточно. В то же время, показана способность Нсу конкурентно связывается с глутаматными рецепторами, имеющимися на мембранах не только нейронов, а и ряда других клеток – мегакариоцитах, тромбоцитах, эритроцитах, лимфоцитах, нейтрофилах, миокардиоцитах, что вызывает их гиперактивацию и развитие целого ряда цитотоксических эффектов [18, 29, 56, 273].

Целью данного этапа нашего исследования явилось оценка изменений функциональной активности некоторых систем организма под влиянием повышенных концентраций гомоцистеина.

В первой фазе были обследованы 76 практически здоровых лиц в возрасте от 18 до 75 лет, разделенные на две группы в зависимости от возраста: от 18 до 35 лет (средний возраст 21,7); от 36 до 59 лет (45,9 года). На второй – первую исследуемую группу разбили на 2 подгруппы: здоровые добровольцы и лица, с риском развития сосудистой катастрофы. В качестве фактора, вызывающего развитие риска, была выбрана такая вредная привычка, как курение. Согласно этому подгруппа была разбита на 3 части: 1 – стаж курения до 5 лет, 2 – стаж курения от 5 до 10 лет, 3 – стаж курения 10 и более лет. Во всех группах здоровых

лиц параметры липидного спектра не выходили за пределы референсных значений, во второй группе значения холестерина ЛПОНП, триглицеридов и индекса атерогенности были максимальными (табл. 1). Полученные нами данные согласуются с литературными [55, 130, 349]. Концентрация Нсу в сыворотке крови контрольной и первой исследуемых групп приведена в таблице 4.

Таблица 4

**Содержание общего гомоцистеина в сыворотке крови (мкмоль/л)
(Ме (25-й; 75-й))**

Группа	Уровень Нсу
Первая контрольная группа (n=46)	5,988 (5,079; 7,876)
Вторая контрольная группа (n=30)	7,971 (6,771; 10,92)
Первая исследуемая группа	
Стаж курения до 5 лет (n=15)	11,20(10,49; 17,18) p<0,001
Стаж курения 5-10 лет (n=15)	13,40(12,94; 13,40) p<0,001
Стаж курения 10 и более лет (n=15)	14,30(11,50; 17,18) p<0,001

Примечание: n – число обследованных; p – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой.

Уровень Нсу в крови никотинзависимых лиц повышен, но при этом значимых различий в группах с различным стажем курения не зафиксировано.

В свою очередь, содержание окисленных липопротеидов зависело от стажа курения, и было максимально в группе со стажем курения 10 и более лет (табл. 5). В этой же группе была зафиксирована и максимальная концентрация окисленных липопротеидов малоновым диальдегидом – около 80% от всех оЛПНП. Параллельно наблюдалось повышение количества иммунных комплексов средних размеров в 8 раз у лиц со стажем курения более 10 лет (p=0,000089). При этом, уровень аутоантител к окисленным ЛПНП возрастал только при стаже курения от 5 до 10 лет – в 1,5 раза (p=0,0072), и в группе более 10 лет – в 6 раз (p=0,00089).

Выявлены статистически значимые корреляционные связи между содержанием гомоцистеина и окисленными ЛПНП (r=-0,485; p<0,05),

окисленными ЛПНП малоновым диальдегидом ($r=-0,836$; $p<0,05$) и иммунными комплексами, осажденными 10 % полиэтиленгликолем. В первой и второй подгруппе данные корреляционные взаимосвязи исчезают и появляются вновь в подгруппе со стажем курения более 10 лет. При этом изменяется их направленность и сила. Так, отмечается прямая связь между окисленными ЛПНП в целом и малоновым диальдегидом в частности и насыщенностью крови Нсу ($r=0,79$, $r=0,8$, соответственно, $p<0,05$). Кроме этого, корреляционный анализ выявил также прямую зависимость между уровнем Нсу и содержанием иммунных комплексов, осажденных 3,5% ПЭГ ($r=0,8$; $p<0,05$), 5% ПЭГ ($r=0,74$; $p<0,05$) и обратную – с 10% ПЭГ ($r=-0,81$; $p<0,05$).

Таблица 5

Содержание окисленных липопротеидов и аутоантител к ним, иммунных комплексов в сыворотке крови у лиц первой исследуемой группы в зависимости от стажа курения (Ме (25-й; 75-й))

Параметры	оЛПНП мкг/мл	МДА ЛПНП, мкг/мл	Соотношение МДА ЛПНП / оЛПНП, %	3,5% ПЭГ	АТ к оЛПНП, МЕд/мл
Первая контрольная группа (n=10)	0,36 (0,25; 0,37)	0,00 (0,00; 0,12)	0,0085 (0,0026; 32,61)	0,005 (90,001; 0,0080)	243,40 (9143,40; 348,800)
Первая исследуемая группа					
Стаж курения до 5 лет (n=15)	2,493 (2,41; 2,50) $p1<0,001$	0,4 (0,4; 0,578) $p1<0,001$	16,40 (12,21; 17,23) $p1=0,55$	0,022 (90,017; 0,0360) $p1<0,001$	203,2 (9198,9; 855,20) $p1=0,025$
Стаж курения 5-10 лет (n=15)	8,537 (6,47; 9,04) $p1<0,001$ $p2<0,001$	4,819 (3,94; 4,84) $p1<0,001$ $p2<0,001$	56,68 (50,22; 74,45) $p1<0,001$ $p2<0,001$	0,017 (90,001; 0,0170) $p1=0,0043$ $p2<0,001$	373,90 (9373,90; 594,500) $p1=0,0072$ $p2=0,06$
Стаж курения 10 и более лет (n=15)	74,19 (38,81; 77,49) $p1<0,001$ $p2<0,001$ $p3<0,001$	60,08 (20,25; 70,90) $p1<0,001$ $p2<0,001$ $p3<0,001$	77,53 (57,99; 95,56) $p1<0,001$ $p2<0,001$ $p3=0,016$	0,040 (90,035; 0,0460) $p1<0,001$ $p2<0,001$ $p3<0,001$	1434,00 (9885, 1674,000) $p1<0,001$ $p2<0,001$ $p3<0,001$

Примечание: n – число обследованных; $p1$ – уровень статистической значимости различий подгрупп первой исследуемой группы по сравнению с контрольной

группой, p_2 – уровень статистической значимости различий 1 подгруппы со второй и третьей, p_3 – уровень статистической значимости различий второй подгруппы по сравнению с третьей.

Одним из маркеров дисфункции эндотелия является увеличение циркулирующих эндотелиальных клеток (СЕС) [132]. Нами было зарегистрировано семикратное повышение СЕС в первой исследуемой группе ($p < 0,001$), при этом со значительным увеличением процента мертвых СЕС (таблица 6).

Таблица 6

**Содержание циркулирующих эндотелиоцитов
у лиц первой исследуемой группы (Ме (25-й; 75-й))**

Параметры	Первая контрольная группа (n=10)	Первая исследуемая группа (n=10)
СЕС (CD146+CD45-), (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	5,00 (4,00; 6,00)	36,00 (32,50; 43,00) $p < 0,001$
СЕС-Living, %.	92,54 (92,44; 93,78)	57,33 (56,38; 61,37) $p = 0,005$
СЕС-Dead, %.	7,46 (6,22; 7,46)	42,67 (38,63; 43,62) $p < 0,001$

Примечание: n – число обследованных; p – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой.

Повреждение эндотелиоцитов косвенно подтверждало и изменение спектра цитокинов. Так, в этой группе уровень интерлейкина 10 увеличивался более чем в 25 раз ($p < 0,001$), интерлейкина 8 – в 3,5 раз ($p = 0,001$). Менее значимо возросли концентрации интерлейкина 4 и TNF α – их концентрация составила у курильщиков 0,48 ($p < 0,001$) и 1,0 ($p = 0,09$) пкг/мл соответственно.

Полученные данные, свидетельствуют, что в норме иммунная система организма поддерживает уровень Hсу и окисленных им ЛПНП, путем образования аутоантител. У никотинзависимых лиц со стажем курения до 10 лет механизмы адаптации работают, но в не полном объеме. В то время как у людей со стажем курения более 10 лет наблюдается срыв механизмов адаптации, приводящий к ускорению развития атеросклероза [33, 41, 67].

Уровень общего Нсу в сыворотке крови у больных, страдающих гипертонической болезнью, был увеличен только в группе ГБ III стадии, но при этом имел статистически значимое различие между контрольной группой и больными гипертонической болезнью первой и второй стадией. Данный факт можно объяснить тем, что на начальных стадиях гипертонической болезни наблюдается скрытая гипергомоцистеинемия, выявляемая лишь при проведении метионинового теста [146]. Содержание общего Нсу в сыворотке крови во всех группах больных, страдающих различными формами ИБС, было выше по сравнению с показателями группы контроля. Максимальные значения аминотиола наблюдались у лиц с Q-инфарктом миокарда в острую стадию (табл. 7).

Гомоцистеин в свою очередь, обладая повреждающим действием, вызывает образование в организме неоантигенов – это и обломки мембран погибших клеток, и окисленные им белковые структуры. Физиологическим механизмом защиты организма от антигенов является образование циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК).

Таблица 7

Содержание общего гомоцистеина в сыворотке крови у больных ИБС и гипертонической болезнью (Ме (25-й; 75-й))

Показатели/ группы	Уровень гомоцистеина (мкмоль/л)
Первая контрольная	5,03 (4,58; 5,95)
Вторая контрольная	6,75 (5,77; 7,55)
Первая	12,70 (11,28; 13,63) p<0,001
Вторая	7,14 (5,86; 7,73)
Третья	7,04 (6,31; 7,71)
Четвертая	10,50 (9,42; 12,13) p<0,001
Пятая	11,94 (11,01; 13,20) p<0,001
Показатели/ группы	Уровень гомоцистеина (мкмоль/л)
Шестая	15,85 (14,14; 17,81) p<0,001
Седьмая	26,20 (23,00; 29,77) p<0,001

Примечание: n – число обследованных; p – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой.

У больных гипертонической болезнью I стадии наблюдалось снижение уровня ЦИКов средних размеров (осажденные 7% раствором ПЭГ) и увеличение количества ЦИКов мелких размеров (образовавшиеся при добавлении 10% раствора ПЭГ). При II стадии гипертонической болезни значимо увеличивались ЦИКи как средние, так и мелкие, а при III стадии – крупные, средние и мелкие.

У больных стабильной стенокардией и острым коронарным синдромом без подъема сегмента ST наблюдался рост уровня ЦИК средней молекулярной массы на 40% (p=0,001) по сравнению с донорами, тогда как у пациентов с острым инфарктом миокарда наблюдалось снижение этого показателя (табл. 8). Содержание ЦИК низкой молекулярной массой было максимально у страдающих стабильной стенокардией и не отличалось от показателей сыворотки крови лиц с III стадией ГБ.

У пациентов с острым коронарным синдромом число ЦИК мелких размеров не отличалось от значений контрольной группы, а при остром инфаркте миокарда в первые сутки заболевания снижалось на 56 % по сравнению со второй группой контроля (табл. 8).

Таблица 8

Уровень ЦИК в сыворотке крови у больных ишемической болезнью сердца и гипертонической болезнью
(ед. оп. пл. OD450), (Me (25-й; 75-й))

Показатели/ группы	3,5% ПЭГ	7% ПЭГ	10% ПЭГ
Первая контрольная, (n=30)	0 (0,00; 0,00)	0,138 (0,101; 0,138)	0,079 (0; 0,106)
Вторая контрольная, (n=46)	0,00 (0,00; 0,26)	0,173 (0,173; 0,193)	0,151 (0,129; 0,173)
Первая, (n=45)	0 (0,00; 0,00)	0,084 (0,084; 0,088) P ₁ =0,001	0,173 (0,146; 0,272) P ₁ =0,001

Вторая, (n=20)	0 (0,00; 0,00)	0,277 (0,249; 0,341) P ₂ =0,001	0,289 (0,261; 0,309) P ₂ =0,001
Третья, (n=20)	0 (0; 0,005) P ₂ =0,001	0,431 (0,321; 0,509) P ₂ =0,001	0,316 (0,283; 0,327) P ₂ =0,001
Четвертая, (n=20)	0,31 (0,20; 0,88) P ₂ =0,001	0,73 (0,60; 0,88) P ₂ =0,001	0,59 (0,32; 0,78) P ₂ =0,001
Пятая, (n=28)	0 (0,00; 0,00)	0,284 (0,197; 0,312) P ₂ =0,0001	0,275 (0,275; 0,383) P ₂ =0,001
Шестая, (n=20)	0 (0,00; 0,00)	0,282 (0,169; 0,324) P ₂ =0,003	0,174 (0,138; 0,266)
Седьмая, (n=20)	0 (0,00; 0,00)	0,125 (0,075; 0,16) P ₂ =0,001	0,1 (0,07; 0,11) P ₂ =0,004

Примечание: n – число обследованных; p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой 1, p₂ – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой 2.

Проведенный сравнительный анализ концентрации о-ЛПНП и аутоантител к ним при сердечно-сосудистых заболеваниях, показал что, при гипертонической болезни (табл. 9), значения о-ЛПНП существенно не отличались от контрольных, однако при этом содержание антител у больных оказалось ниже контроля на 48,9% (p<0,05). Данный факт может быть обусловлен, либо снижением иммунной реакции на о-ЛПНП, либо усилением потребления антител из-за связывания их с антигенами на ранних стадиях атеросклероза. У лиц с ИБС наблюдалось повышение концентрации о-ЛПНП, причем с усилением тяжести заболевания их величины возрастали.

При стабильной стенокардии цифры о-ЛПНП были на 15,5% (p<0,05) выше контроля, а антител – ниже на 57,1% (p=0.006). При остром коронарном синдроме концентрация о-ЛПНП превышала контроль на 60,6% (p<0,001), и таковую у пациентов со стабильным течением заболевания – на 39,0% (p<0,05),

регистрировался существенный разброс в значениях антител. У пациентов с ИМ величины о-ЛПНП еще более увеличились и составляли 403,1% ($p < 0,001$) от контроля. Однако уровень антител был ниже контроля на 35,6% ($p = 0,047$), но выше, чем при стабильной стенокардии на 50,0% ($p < 0,05$), и при нестабильной – на 71,4% ($p < 0,05$).

Таким образом, при ишемической болезни сердца прослеживается взаимосвязь между уровнем о-ЛПНП, содержанием гомоцистеина и тяжестью патологического процесса [135].

Таблица 9

Уровень окисленных ЛПНП и антител к ним в сыворотке крови у лиц с гипертонической болезнью и с ИБС (Ме (25-й; 75-й))

Группы / Параметры	о-ЛПНП, мкг/мл	Ат к о-ЛПНП, мМЕ/мл
Вторая контрольная, (n=46)	0,61 (0,41; 0,66)	348,35 (216,75; 448,35)
Вторая, (n=20)	0,48 (0,28; 0,54)	187,00 (147,50; 207,63) $p = 0,03$
Третья, (n=20)	0,25 (0,17; 0,38) $p = 0,04$	159,50 (138,75; 173,48) $p = 0,0027$
Четвертая, (n=20)	0,68 (0,62; 0,86)	369,10 (190,75; 458,78)
Пятая, (n=28)	0,71 (0,52; 0,84) $p = 0,048$	149,45 (81,43; 212,28) $p = 0,006$
Шестая, (n=20)	0,98 (0,73; 1,06) $p < 0,001$ $p_1 = 0,040$	130,75 (114,90; 442,55)
Седьмая, (n=20)	2,46 (2,41; 2,67) $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	224,15 (219,48; 1238,40) $p = 0,047$ $p_1 = 0,029$ $p_2 = 0,036$

Примечание. p – уровень статистически значимых различий с показателями контрольной группы; p_1 – уровень статистически значимых различий с показателями пятой группы; p_2 – уровень статистически значимых различий с показателями шестой группы.

Полученные нами данные о росте окисленных липопротеидов и аутоантител к ним на фоне высоких цифр гомоцистеина могут свидетельствовать о недостаточности механизмов элиминации повреждающих факторов посредством

аутоантител, и как следствие, о развитии дисфункции эндотелия и инициации атеросклеротического процесса.

Признанным прямым маркером дисфункции эндотелия выступают циркулирующие эндотелиальные клетки (ЦЭК): зрелые дифференцированные клетки, отделяющиеся от стенки сосуда в процессе его повреждения [35, 161]. Число ЦЭК в периферической крови у здоровых людей мало, что обусловлено медленным процессом обновления эндотелия при отсутствии патологических состояний и быстрым удалением нежизнеспособные ЦЭК из кровотока ретикулоэндотелиальной системой [132].

Число циркулирующих эндотелиоцитов у больных ГБ превышало значения в группе контроля и зависело от степени тяжести страдания. При этом практически все эндотелиальные клетки были живы (табл. 10). Состав, циркулирующих эндотелиоцитов (СЕС) гетерогенен. В него входят не только десквамированные эндотелиоциты – апоптические и митотические, а также специализированные прогениторные клетки (ЕСР). Маркером активации эндотелия может служить эндоглин (CD105), так как он необходим для связывания лигандов и передачи сигналов активизирующих ангиогенез независимо от фактора роста эндотелия [134]. В нашем исследовании наблюдалось увеличение числа как ЕСР, так и клеток, несущих CD105 (АЕС) у больных второй и третьей стадией ГБ (табл. 10), что отображает наличие активных компенсаторных процессов, направленных на восстановление поврежденной сосудистой стенки. При проведении корреляционного анализа обнаружена связь слабой силы ($0,287$, $p < 0,05$) у больных первой стадией ГБ между уровнем гомоцистеина и эндотелиоцитами, несущими CD34+ антиген. Во вторую и третью стадию связь становится отрицательной и более сильной – $-0,396$ и $-0,488$ ($p < 0,05$) соответственно. Кроме этого появляется также отрицательная связь с АЕС – $-0,381$ и $-0,452$ ($p < 0,05$) соответственно.

Содержание циркулирующих эндотелиоцитов у больных гипертонической болезнью, (Ме (25-й; 75-й))

Показатели/ группы	Контрольная группа	Больные ГБ		
		I стадия (n=12)	II стадия (n=18)	III стадия (n=18)
СЕС (CD146+CD45-), (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	3,0 (3,0; 4,0)	6,0 (4,0; 6,0) p1=0,00009	17,0 (13,0; 23,0) p1=0,00001 p2=0,00001	37,0 (30,0; 49,0) p1=0,00001 p2=0,00001 p3=0,00001
СЕС-Living, абс.	3,0 (3,0; 4,0)	5,0 (3,0; 6,0)	17,0 (12,0; 23,0)	32,0 (30,0; 44,0)
СЕС-Dead, абс.	0,0 (0,0; 0,0)	1,0 (0,0; 1,0)	1,0 (0,0; 1,0)	1,0 (0,0; 6,0)
ЕСР (CD146+CD34+), (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	1,0 (0,0; 2,0)	1,0 (1,0; 2,0)	3,0 (2,0; 5,0) p1=0,00003 p2=0,00003	10,0 (1,0; 16,0) p1=0,000002 p2=0,000000 p3=0,00027
АЕС (CD146+CD105+), (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	0,0 (0,0; 0,0)	1,0 (0,0; 2,0)	2,0 (0,0; 4,0) p1=0,0079 p2=0,026	10,0 (1,0; 12,0) p1=0,000000 p2=0,000000 p3=0,000000

Примечание: p1 – уровень статистической значимости различий групп больных ГБ по сравнению с контрольной группой, p2 – уровень статистической значимости различий больных ГБ I стадии со второй и третьей, p3 – уровень статистической значимости различий больных ГБ II стадии по сравнению с третьей.

Изменения сосудистой стенки в свою очередь сопровождаются сдвигами в балансе цитокинов (табл. 11). Так, минимальное повышение уровней цитокинов в сыворотке крови выявлено у больных гипертонической болезнью I стадии. Более значимое повышение исследуемых показателей наблюдалось у больных со второй и третьей стадией заболевания, что свидетельствует с одной стороны о текущем хроническом воспалении, а с другой – об активации аутоиммунных процессов.

**Уровни цитокинов у больных гипертонической болезнью
(Me (25%; 75%))**

Группы / Параметры	IL-1 β , пкг/мл	IL-2, пкг/мл	IL-4, пкг/мл	IL-6, пкг/мл	IL-10, пкг/мл	IL-17 α , пкг/мл	IFN- γ , пкг/мл	TNF α , пкг/мл
Вторая контрольная, (n=46)	5,09 (4,09;5,89)	6,23 (5,18; 6,82)	0,6 (0,38;0,82)	2,25 (1,11;3,55)	10,32 (9,30; 11,55)	3,19 (1,47; 4,58)	10,69 (6,96;9,66)	2,78 (1,81; 3,94)
Вторая, (n=20)	6,84 (6,08; 7,49) p1=0,034	7,00 (6,43; 7,57)	0,63 (0,32;0,84)	5,97 (3,86; 7,12) p1=0,0012	9,68 (8,29; 10,81)	4,1 (2,97; 5,33)	8,15 (6,60;9,85)	5,66 (4,79; 7,02) p1=0,01
Третья, (n=20)	10,86 (10,09;11,54) p1=0,0001 p2=0,00001	9,78 (9,08;10,46) p1=0,0001 p2=0,00001	1,65 (1,15; 1,93) p1=0,00001 p2=0,000001	9,83 (6,05; 12,46) p1=0,000001 p2=0,000001	13,18 (12,22; 13,95) p1=0,0001 p2=0,0001	9,96 (9,12; 11,35) p1=0,000001 p2=0,000001	14,31 (12,28;14,97) p2=0,01	4,95 (3,68; 6,17) p1=0,037
Четвертая, (n=20)	13,84 (13,02;14,48) p1=0,000001 p2=0,000001 p3=0,00014	26,68 (15,49;19,25) p1=0,0001 p2=0,0001 p3=0,0014	11,65 (11,15; 11,92) p1=0,000001 p2=0,000001 p3=0,000001	16,75 (15,42; 19,50) p1=0,000001 p2=0,000001 p3=0,000001	12,42 (11,40; 13,30) p1=0,04 p2=0,01	10,62 (9,67; 11,59) p1=0,000001 p2=0,000001 p3=0,000001	17,99 (16,99;19,75) p1=0,0001 p2=0,00001 p3=0,000001	7,93 (6,68; 9,33) p1=0,001 p2=0,003

Примечание: n – число обследованных; p1 – уровень статистической значимости различий групп больных ГБ по сравнению с контрольной группой, p2 – уровень статистической значимости различий показателями больных ГБ II и III стадии и I стадией ГБ, p3 – уровень статистической значимости различий больных ГБ II стадии по сравнению с третьей.

Достоверное повышение уровня Нсу только в группе больных гипертонической болезнью третьей стадии объясняется наличием скрытой ГГЦ, выявляемой лишь при проведении метионинового теста [146], однако, наши данные демонстрируют вовлеченность иммунной системы в патологический процесс уже на I стадии заболевания и свидетельствуют о вовлеченности Т-клеточного звена иммунной системы.

Накоплено большое количество клинических наблюдений, свидетельствующих в пользу гиперкоагуляции на фоне гипергомоцистеинемии [66, 98, 148, 160, 211, 214, 277]. Тем не менее, тонкие механизмы, приводящие к тромбообразованию под воздействием этого тиола, до конца неизвестны. Так, ряд авторов, считает, что протромботический потенциал Нсу реализуется только при наличии других наследственных и/или приобретенных факторов риска [250, 255, 343].

При изучении стандартной коагулограммы больных гипертонической болезнью разница обнаружена только в содержании фибриногена – наблюдался его рост у больных II и III стадией ГБ (табл. 12), что с одной стороны подтверждает наличие повреждения стенки сосуда, а с другой – свидетельствует о гиперкоагуляции.

Таблица 12

Основные показатели коагулограммы у больных гипертонической болезнью, (Me (25-й; 75-й))

Параметры	Контроль	ГБ I стадии	ГБ II стадии	ГБ III стадии
АЧТВ, сек	30,6 (28,8;31,1)	31,7 (30,3; 32,1)	29,9 (29,1; 31,4)	29,7 (29,1; 31,1)
Протромбиновое время, сек	14,9 (14,6;15,2)	14,74 (14,6; 15,1)	14,8 (13,5; 15,4)	14,6 (13,1; 16,6)
Тромбиновое время, сек	18,4 (15,7;18,5)	18,5 (14,1; 19,5)	18,2 (16,2; 19,4)	18,3 (16,8; 18,6)
Фибриноген, мг/мл	2,06 (2,05;2,54)	2,1 (2,03; 2,83)	3,29 (3,19; 3,4) p1=0,000000 p2=0,000000	4,39 (3,91; 4,5) p1=0,008 p2=0,0036 p3=0,018

Примечание: p1 – уровень статистической значимости различий групп больных ГБ по сравнению с контрольной группой, p2 – уровень статистической значимости различий 1 группы со второй и третьей, p3 – уровень статистической значимости различий второй группы по сравнению с третьей.

Так как нами не найдено различий в показателях стандартной коагулограммы, нами проведено исследование изучения функционирования системы гемостаза методом тромбодинамики (табл. 13).

Показатели пространственного роста сгустка у больных гипертонической болезнью начали меняться уже у больных с I стадией заболевания – увеличилась стационарная скорость тромбообразования на 15,7 % ($p < 0,0001$) и размер фибринового сгустка на 11 % ($p=0,013$). Во вторую и третью стадию зафиксированы более выраженные сдвиги, свидетельствующие о наличии гиперкоагуляции (табл. 13) [121].

Таблица 13

Показатели пространственного роста сгустка у больных гипертонической болезнью, (Ме (25-й; 75-й))

Параметры	Контроль	ГБ I стадии	ГБ II стадии	ГБ III стадии
Время задержки начала роста сгустка, мин	0,80 (0,80;0,90)	0,90 (0,80; 1,00)	0,80 (0,80; 1,00)	0,80 (0,70; 0,90)
Начальная скорость тромбообразования, мкм/мин	49,40 (47,00;50,30)	48,10 (47,80;51,70)	53,05 (50,30;54,30) p1=0,001 p2=0,00005	57,90 (54,80;59,70) p1=0,001 p2=0,0001 p3=0,001
Стационарная скорость тромбообразования, мкм/мин	26,80 (26,30;27,30)	31,00 (30,10; 34,30) p1=0,001	34,70 (30,90;36,10) p1=0,002 p2=0,029	50,50 (50,50;50,50) p1=0,000000 p2=0,000000 p3=0,000000
Размер фибринового сгустка через 30 мин, мкм	1060,00 (1058,00;1142,00)	1169,00 (1141,00;1227,00) p1=0,013	1261,00 (1175,00;1309,00) p1=0,00036 p2=0,000000	1650,00 (1626,00;1700,00) p1=0,000000 p2=0,000000 p3=0,000000

Параметры	Контроль	ГБ I стадии	ГБ II стадии	ГБ III стадии
Плотность фибринового сгустка через 30 мин, ус/ед	19791,00 (18274,00; 20181,00)	19558,00 (17487,00; 19805,00)	19456,00 (18012,00; 20143,00)	20438,00 (19171,00; 20504,00)

Примечание: p1 – уровень статистической значимости различий групп больных ГБ по сравнению с контрольной группой, p2 – уровень статистической значимости различий 1 группы со второй и третьей, p3 – уровень статистической значимости различий второй группы по сравнению с третьей.

Состояние повышенной активности системы свертывания крови подтверждается и ростом аутоантител к тромбину у больных ГБ. Так, в первую стадию их уровень возрос в 2,5 раза ($p < 0,0001$), во вторую – 3,5 раза ($p < 0,0001$), в третью – 6 раз ($p < 0,0001$) по сравнению с показателями крови доноров.

Число ЦЭК у больных ИБС отличалось как от группы контроля, так и от их количества у лиц, страдающих гипертонической болезнью. Максимальное содержание ЦЭК наблюдалось у больных с острым коронарным синдромом. У лиц, страдающих Q-инфаркт миокарда, в первые сутки их величина в 1,6 раз была меньше по сравнению с острым коронарным синдромом, однако, практически половина этих клеток была мертва. Число эндотелиоцитов юных и активированных не отличалось от количества клеток в периферической крови здоровых добровольцев, что свидетельствует о срыве механизмов саногенеза у данной группы обследуемых (табл. 14).

При изучении параметров коагулограммы у пациентов с различными формами ИБС установлено, что у больных с острым коронарным синдромом и острым инфарктом миокарда наблюдается гипокоагуляция (табл. 15), которую можно отнести за счет введения достаточно высоких доз непрямых антикоагулянтов больным и на догоспитальном, и на госпитальном этапах. Вместе с тем, если у больных, страдающих стабильной стенокардией, наблюдается удлинение АЧТВ, то при остром коронарном синдроме этот показатель нормализуется, что свидетельствует о недостаточном количестве антикоагулянтов для коррекции гиперкоагуляции, развивающейся на фоне

повреждения миокарда. В то же время, концентрация фибриногена у всех больных ИБС, включенных в исследование была выше, чем у условно здоровых добровольцев и зависела от тяжести процесса (табл. 15).

Таблица 14

**Содержание циркулирующих эндотелиоцитов у больных ИБС,
(Ме (25-й; 75-й))**

Показатели/ группы	Контрольная группа	Больные ИБС		
		Стабильная стенокардия	Острый коронарный синдром	Q-инфаркт миокарда, 1 сутки
СЕС (CD146+CD45-), (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	3,0 (3,0; 4,0)	24,0 (15,0; 34,0) p1=0,0009	78,0 (63,0; 93,0) p1=0,00001 p2=0,0001	49,0 (36,0; 59,0) p1=0,00001 p2=0,00001 p3=0,00001
СЕС_Living, абс.	3,0 (3,0; 4,0)	8,0 (6,0; 11,0) p1=0,005	73,0 (62,0; 88,0) p1=0,0001	27,0 (20,0; 34,0) p1=0,0001
СЕС_Dead, абс/	0,0 (0,0; 0,0)	15,0 (5,0; 24,0) p1=0,00001	5,0 (3,0; 8,0) p1=0,0002 p2=0,005	22,0 (18,0; 29,0) p1=0,00001 p2=0,01 p3=0,00001
ЕСР (CD146+CD34+), (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	1,0 (0,0; 2,0)	2,0 (1,0; 4,0)	2,0 (1,0; 3,0)	2,0 (0,0; 4,0)
АЕС (CD146+CD105+), (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	0,0 (0,0; 0,0)	1,0 (0,0; 2,0)	0,0 (0,0; 2,0)	0,0 (0,0; 1,0)

Примечание: p1 – уровень статистической значимости различий групп больных ИБС по сравнению с контрольной группой, p2 – уровень статистической значимости различий больных стабильной стенокардией с острым коронарным синдромом и Q-инфаркт миокарда, 1 сутки, p3 – уровень статистической значимости различий больных острым коронарным синдромом по сравнению с Q-инфаркт миокарда, 1 сутки.

Основные показатели коагулограммы у больных ИБС, (Ме (25-й; 75-й))

Показатели/ группы	Здоровые	Больные ИБС		
		Стабильная стенокардия	Острый коронарный синдром без подъема сегмента ST	Острый инфаркт миокарда
АЧТВ, сек	28,5 (27,0;32,0)	43,5 (36,7; 47,9) p1=0,0006	29,9 (27,7; 32,1) p2=0,001	66,1 (41,7; 90,4) p1=0,0003 p2=0,01 p3>0,00001
Протромбиновое время, сек	10,5 (9,5; 11,6)	11,3 (10,0; 11,8)	10,7 (7,3; 11,3)	14,3 (14,1; 14,4) p1>0,00001 p2>0,00001 p3>0,00001
Тромбиновое время, сек	19,0 (17,0; 21,0)	18,6 (16,0; 20,7)	19,7 (19,3; 20,1)	30,95 (28,1; 33,8) p1>0,00001 p2>0,00001 p3>0,00001
Фибриноген, мг/мл	261,5 (205,0; 305,0)	323,0 (293,0; 332,0) p1=0,05	478,5 (332,0;503,0) p1>0,00001 p2=0,0004	523,0 (460,0;586,0) p1>0,00001 p2>0,00001 p3=0,029

Примечание: p1 – уровень статистической значимости различий групп больных ИБС по сравнению с контрольной группой, p2 – уровень статистической значимости различий 1 группы со второй и третьей, p3 – уровень статистической значимости различий второй группы по сравнению с третьей.

Исходя из этого, нами предпринята попытка более углубленного изучения функционирования системы гемостаза методом тромбодинамики. Так как при стабильной стенокардии и при остром инфаркте миокарда показатели коагулограммы зависят в большей степени от введенных антикоагулянтов, данный метод применен только в группе больных с острым коронарным синдромом без подъема сегмента ST.

Как видно из представленных данных, у пациентов этой группы отмечается увеличение времени задержки роста сгустка, его начальной и стационарной скорости. Одновременно с этим возрастает общий размер сгустка и его плотность, что свидетельствует о наклонности к тромбообразованию (табл. 16).

Таблица 16

Показатели пространственного роста сгустка у больных с острым коронарным синдромом, (Ме (25-й; 75-й))

Переменные	Здоровые	Больные ИБС
Время задержки начала роста сгустка, мин	0,65 (0,50; 0,80)	2,45 (1,60; 3,90) p=0,00001
Начальная скорость тромбообразования, мкм/мин	45,50 (44,00; 47,00)	49,00 (40,50; 57,00)
Стационарная скорость тромбообразования, мкм/мин	24,50 (23,00; 25,00)	62,50 (44,50; 83,50) p=0,00007
Размер фибринового сгустка через 30 мин, мкм	946,68 (922,44; 962,40)	1456,56 (1068,18; 1853,58) p=0,0004
Плотность фибринового сгустка через 30 мин, ус/ед	16040,00 (14258,00;16837,00)	31780,00 (30334,50;33616,00) p=0,000001

Примечание: p – уровень статистической значимости различий групп больных ИБС по сравнению с контрольной группой.

На следующем этапе нами определялись уровень аутоантител к тромбину и число моноцитов, несущих на своей поверхности TF. Показано, что изучаемые показатели выше у больных ИБС и зависят от тяжести процесса (табл. 17).

Уровень аутоантител к тромбину и CD142 позитивные моноциты при различных формах ИБС, (Ме (25-й; 75-й))

Показатели/ группы	Здоровые	Больные ИБС		
		Стабильная стенокардия	Острый коронарный синдром без подъема сегмента ST	Острый инфаркт миокарда
Аутоантитела к тромбину, ед. оп. плотности	0,064 (0,044; 0,081)	0,169 (0,163; 0,177) p1>0,00001	0,273 (0,244;0,293) p1>0,00001 p2>0,00001	0,529 (0,458;0,532) p1>0,00001 p2>0,00001 p3>0,00001
CD14 CD142+, % от общей популяции	12,00 (10,96; 16,13)	36,36 (30,77;41,67) p1>0,00001	50,24 (49,32;51,16) p1>0,00001	70,18 (51,16;80,91) p1>0,00001 p3=0,0009

Примечание: p1 – уровень статистической значимости различий групп больных ИБС по сравнению с контрольной группой, p2 – уровень статистической значимости различий 1 группы со второй и третьей, p3 – уровень статистической значимости различий второй группы по сравнению с третьей.

При проведении корреляционного анализа обнаружена прямая положительная связь средней силы между уровнями гомоцистеина и фибриногена: в контрольной группе (0,477, p<0,05), у пациентов, страдающих стабильной стенокардией – 0,659 (p<0,05), 0,768 – у больных с острым коронарным синдромом (p<0,05). У больных с острым инфарктом миокарда наблюдается прямая положительная связь между концентрацией Hcy и уровнем аутоантител к тромбину (0,494, p<0,05).

Таким образом, на основании проведенного исследования можно сделать вывод, что у больных ГБ и ИБС развивается гиперкоагуляция, одним из ведущих звеньев которой является ГГЦ, на фоне которой увеличивается экспрессия TF и инициируется внешний путь активации свертывания крови. Развивается тромбинемия, сопровождающаяся возрастанием уровня аутоантител к тромбину. В свою очередь появление тромбина приводит к активации факторов V, VIII и

других, что неминуемо ведёт к возникновению тромбозов, и как следствие развитию инфаркта миокарда.

Баланс цитокинов играет большую роль как в инициации и течении атеросклеротического процесса, так и в формировании осложнений, в том числе и развитии тромбозов. Поэтому, нами была проведена оценка цитокинового статуса у больных ишемической болезнью сердца (табл. 18.). Наиболее значимые изменения наблюдались в группе больных с острым инфарктом миокарда, что является подтверждением активного воспалительного процесса в этой группе, что соответствует литературным данным [2, 45].

**Уровни цитокинов у больных ишемической болезнью сердца
(Me (25%; 75%))**

Группы / Параметры	IL-1 β , пкг/мл	IL-2, пкг/мл	IL-4, пкг/мл	IL-6, пкг/мл	IL-10, пкг/мл	IL-17 α , пкг/мл	IFN- γ , пкг/мл	TNF α , пкг/мл
Вторая контрольная, (n=46)	5,09 (4,09;5,89)	6,23 (5,18;6,82)	0,6 (0,38;0,82)	3,25 (1,11;3,75)	10,32 (9,30;11,55)	3,19 (1,47;4,58)	10,69 (6,96;9,66)	2,78 (1,81;3,94)
Пятая, (n=28)	13,88 (13,09;14,49) p1=0,034	17,96 (16,49;20,25) p1=0,0012	21,65 (21,18;21,91) p1=0,000001	11,75 (10,49; 14,25) p1=0,00012	13,48 (12,78;13,57) p1=0,001	20,60 (18,41;23,17) p1=0,000001	19,00 (18,00;20,63) p1=0,000001	8,94 (7,68; 10,17) p1=0,0001
Шестая, (n=20)	19,88 (19,09;20,81) p1=0,000001 p2=0,000001	27,94 (26,41;30,35) p1=0,000001 p2=0,000001	31,65 (31,18; 31,91) p1=0,000001 p2=0,000001	21,75 (20,49; 24,25) p1=0,000001 p2=0,000001	18,41 (15,88; 22,35) p1=0,000001 p2=0,001	39,40 (30,10;48,88) p1=0,000001 p2=0,0001	29,00 (28,00;30,63) p1=0,000002 p2=0,0004	11,90 (10,28;13,01) p1=0,005 p2=0,02
Седьмая, (n=20)	26,41 (19,38;31,66) p1=0,000001 p2=0,000001 p3=0,000014	37,86 (36,23;40,54) p1=0,000001 p2=0,000001 p3=0,000001	38,66 (38,18; 38,91) p1=0,000001 p2=0,000001 p3=0,01	31,75 (30,49; 34,25) p1=0,000001 p2=0,000001 p3=0,000001	40,23 (29,49; 54,69) p1=0,000001 p2=0,000001 p3=0,000001	48,51 (31,75;70,93) p1=0,000001 p2=0,000001 p3=0,000001	39,00 (38,00;40,63) p1=0,0001 p2=0,000001 p3=0,000001	16,50 (15,28; 20,01) p1=0,000001 p2=0,003 p3=0,001

Примечание: n – число обследованных; p1 – уровень статистической значимости различий групп больных ИБС по сравнению с контрольной группой, p2 – уровень статистической значимости различий покателями больных стабильной стенокардией и острым коронарным синдромом и острым инфарктом миокарда, p3 – уровень статистической значимости различий больных острым коронарным синдромом и острым инфарктом миокарда.

3.1.1.1. Математическое отображение вклада гипергомоцистеинемии в развитие артериальной гипертензии и атеросклероза

Целью данного раздела работы явилось выделение групп взаимосвязанных показателей, обуславливающих развитие артериальной гипертензии и атеросклероза. С помощью метода главных компонент осуществлялось разделение параметров на отдельные группы, и проводился поиск весовых коэффициентов факторов, представленных в них.

Так, в группе условно здоровых лиц было получено, что содержание гомоцистеина влияет на липидный спектр, состояние системы гемостаза, состояние эндотелия сосудов и толщину комплекса интима-медиа (табл. 19).

Таблица 19

Факторное отображение показателей у условно здоровых добровольцев

Исходные переменные	Факторы				
	1	2	3	4	5
Концентрация гомоцистеина, мкмоль/л	-0,97106	-0,029222	-0,079112	0,101373	-0,162219
ОХ, ммоль/л	-0,976665	0,085059	-0,035219	0,140639	-0,070525
ЛПВП, ммоль/л	-0,450759	-0,068549	-0,383728	0,22962	0,155146
ТАГ, ммоль/л	-0,352043	0,563606	0,156634	-0,231234	-0,494939
ЛПНП, ммоль/л	-0,874024	-0,163701	-0,07955	0,225832	0,13467
ЛПОНП, ммоль/л	-0,243278	0,493569	0,04769	-0,240802	0,016176
ИА	-0,799686	0,371739	0,029876	-0,002323	0,03613
о-ЛПНП, ммоль/л	-0,977118	0,049493	0,039914	0,143538	-0,070927
АТ к о-ЛПНП	-0,942645	-0,030198	0,187151	-0,050491	-0,064435
АТ к тромбину	-0,992526	-0,056146	0,002316	0,004201	-0,059766
Концентрация фибриногена, мг/мл	-0,974543	0,142391	-0,044674	0,088077	-0,091425
АЧТВ, сек	0,049709	0,474631	-0,334662	-0,389246	-0,009235
Протромбиновое время, сек	0,366924	0,087337	-0,493123	0,252161	0,061201
Тромбиновое время, сек	0,081943	0,440243	-0,4547	-0,458028	0,121734
CD142+периферической крови, %	-0,963624	-0,033125	0,106131	0,079993	-0,036503
Время задержки начала роста сгустка, мин	-0,984981	0,028803	0,023183	0,003847	-0,119237
Стационарная скорость тромбообразования, мкм/мин	-0,97106	-0,029222	-0,079112	0,101373	-0,162219
Размер фибринового сгустка через 30 мин, мкм	-0,432459	0,174185	-0,139865	-0,44869	0,308771

Исходные переменные	Факторы				
	1	2	3	4	5
Плотность фибринового сгустка через 30 мин, ус/ед	-0,358462	-0,01176	-0,135462	-0,594569	0,11542
СЕС, (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	-0,957844	-0,020775	0,007726	-0,078323	-0,179528
СЕС Living, абс.	-0,866057	-0,267948	0,145167	-0,228212	-0,209385
СЕС Dead, абс.	0,143082	0,626106	-0,34666	0,405245	0,144485
ЕСР, (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	-0,143487	0,106098	-0,308472	-0,357093	-0,287256
АЕС, (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	0,050705	-0,14864	-0,374819	-0,179738	-0,335616
IL 2, пг/мл	-0,953796	-0,113024	0,095585	-0,141617	-0,060694
INF γ , ед/мл	0,044138	-0,152044	0,258609	0,119502	-0,08726
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 3,5% ПЭГ	-0,171502	0,092887	0,367024	-0,560078	0,079528
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 7,0% ПЭГ	-0,963377	0,136002	-0,078341	0,06952	-0,11611
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 10,0% ПЭГ	-0,991061	-0,055154	-0,015541	0,056861	0,002504
АД систолическое, мм рт. ст.	-0,932129	0,221029	-0,085576	0,1181	-0,122766
АД диастолическое, мм рт. ст.	-0,975251	0,028983	0,078335	0,085356	-0,11084
ЧСС, ударов в минуту	0,248545	-0,540299	-0,043748	-0,265677	0,002305
Диаметр аорты, мм	-0,048083	-0,661053	-0,076842	-0,284093	-0,033165
Правое предсердие	-0,075891	-0,404047	-0,489889	0,200795	0,18908
Левое предсердие	-0,202511	-0,626748	-0,411834	0,387743	0,087748
Полость левого желудочка, мм	-0,037431	-0,476203	-0,574037	0,237984	0,012239
Толщина межжелудочковой перегородки, мм	-0,098606	-0,25612	0,24989	0,100082	0,375963
Толщина задней стенки левого желудочка, мм	-0,089378	-0,104084	0,111298	0,478972	0,308146
Фракция выброса, %	0,305788	0,629724	0,017712	0,035162	-0,404605
Толщина комплекса интима-медиа	-0,954055	0,15954	-0,041202	0,039584	-0,060228
Диаметр левой ОСА, мм	0,145937	0,011717	0,151652	0,35125	-0,595934
Диаметр правой ОСА, мм	0,023515	0,215047	0,442486	0,455457	-0,342251
Пиковая систолическая скорость кровотока левой ОСА, см/сек	0,26419	-0,231957	-0,453629	0,054665	-0,496736

Исходные переменные	Факторы				
	1	2	3	4	5
Пиковая систолическая скорость кровотока правой ОСА, см/сек	0,282234	-0,009728	-0,482392	-0,156491	-0,278057
Резистивный индекс левой ОСА	0,196953	0,342251	-0,572002	0,133723	-0,318868
Резистивный индекс правой ОСА	0,048134	0,307184	-0,478131	0,319709	-0,406807
IL 1 β , пг/мл	-0,22011	0,282405	-0,471731	-0,298456	-0,281097
IL 4, пг/мл	-0,032177	0,571744	0,198065	0,073571	-0,419094
IL 10, пг/мл	-0,276132	0,505915	0,25371	0,240577	-0,294706
IL 17, пг/мл	-0,678032	-0,269198	0,271525	0,155291	-0,008671
TNF α , пг/мл	-0,730521	-0,546926	0,206342	0,074486	-0,143785
СРБ, мг/л	-0,817476	-0,399379	0,01638	-0,086055	0,139121

У лиц, страдающих гипертонической болезнью и ИБС, эти тенденции сохраняются, но при этом усиливаются корреляционные взаимоотношения, нарастают иммуновоспалительный и коагулопатические синдромы (табл. 20 и 21).

Таблица 20

Факторное отображение показателей у больных гипертонической болезнью II-III стадией

Исходные переменные	Факторы				
	1	2	3	4	5
Концентрация гомоцистеина, мкмоль/л	-0,964858	0,197088	0,007218	-0,042274	0,022548
ОХ, ммоль/л	-0,850598	-0,381625	0,084083	0,172595	-0,013465
ЛПВП, ммоль/л	0,023815	-0,604145	-0,039948	0,216198	0,394236
ТАГ, ммоль/л	-0,184675	0,302228	0,001018	-0,018594	-0,508977
ЛПНП, ммоль/л	-0,492888	-0,478075	0,14366	0,150697	-0,164822
ЛПОНП, ммоль/л	-0,412492	0,187645	0,215426	-0,15726	-0,642968
ИА	-0,672978	0,21762	0,072096	-0,094811	-0,195153
о-ЛПНП, ммоль/л	-0,915651	0,321407	-0,017392	-0,106522	0,053307
АТ к о-ЛПНП	-0,949706	0,107855	-0,031938	-0,031564	0,061095
АТ к тромбину	-0,934083	0,289241	-0,023456	-0,108912	0,056983
Концентрация фибриногена, мг/мл	-0,944624	0,268298	-0,012759	-0,093622	0,075144
АЧТВ, сек	0,031106	-0,063628	-0,344931	-0,316771	-0,23214
Протромбиновое время, сек	0,093571	0,198746	-0,548955	0,162307	-0,193655
Тромбиновое время, сек	-0,048692	-0,241442	0,367326	0,428835	-0,3066

Исходные переменные	Факторы				
	1	2	3	4	5
CD142+периферической крови, %	-0,971239	-0,128887	0,030473	0,014079	-0,054906
Время задержки начала роста сгустка, мин	-0,848028	-0,151143	0,013435	0,117144	-0,11201
Стационарная скорость тромбообразования, мкм/мин	0,600135	-0,137354	0,131285	-0,05182	-0,332381
Размер фибринового сгустка через 30 мин, мкм	0,688568	0,209663	0,194845	-0,113304	-0,182878
Плотность фибринового сгустка через 30 мин, ус/ед	0,324211	0,138436	0,48993	0,171785	0,100262
СЕС, (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	-0,927718	0,318596	-0,026649	-0,091658	0,072078
СЕС Living, абс.	-0,925384	0,319595	-0,050763	-0,086059	0,072939
СЕС Dead, абс.	0,00791	-0,030871	0,37847	-0,0832	-0,016927
ЕСР, (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	-0,622417	0,454241	0,248694	-0,107846	-0,127454
АЕС, (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	-0,618194	0,483901	0,162978	-0,283096	-0,041109
IL 2, пг/мл	-0,9187	0,334998	0,01439	-0,113759	0,066275
INF γ , ед/мл	-0,958277	0,20188	-0,020547	-0,082352	0,012317
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 3,5% ПЭГ	-0,85845	-0,381342	-0,018373	0,096241	-0,042919
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 7,0% ПЭГ	-0,870477	-0,370071	0,012648	0,113574	-0,090177
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 10,0% ПЭГ	-0,826325	-0,465457	0,06326	0,162585	-0,08534
АД систолическое, мм рт. ст.	-0,721077	-0,566843	0,037366	0,218097	-0,042804
АД диастолическое, мм рт. ст.	-0,245507	-0,677252	0,245405	-0,140518	0,037163
ЧСС, ударов в минуту	0,106115	0,227789	-0,400134	0,55629	0,038317
Диаметр аорты, мм	0,301747	0,231138	-0,081745	0,419441	0,085853
Правое предсердие	-0,259857	-0,007893	-0,390984	0,296304	-0,10245
Левое предсердие	-0,278363	0,185672	-0,48225	0,25338	-0,254855
Полость левого желудочка, мм	0,125322	0,364659	-0,05118	0,198715	0,03332
Толщина межжелудочковой перегородки, мм	-0,277639	-0,141029	-0,631927	0,076391	-0,375615

Исходные переменные	Факторы				
	1	2	3	4	5
Толщина задней стенки левого желудочка, мм	-0,333966	0,005309	-0,579573	0,149806	-0,280318
Фракция выброса, %	-0,088732	-0,249719	0,562986	-0,391853	-0,100568
Толщина комплекса интима-медиа	-0,908159	-0,309047	-0,023152	0,100612	0,079827
Диаметр левой ОСА, мм	-0,135222	0,609315	0,196311	0,38307	0,233924
Диаметр правой ОСА, мм	-0,070612	0,384465	0,315402	0,439143	0,170427
Пиковая систолическая скорость кровотока левой ОСА, см/сек	0,147952	0,11546	-0,310845	-0,571296	0,262967
Пиковая систолическая скорость кровотока правой ОСА, см/сек	0,08112	-0,30135	-0,187732	-0,565785	-0,074556
Резистивный индекс левой ОСА	-0,286956	0,005883	0,420717	-0,316218	-0,15261
Резистивный индекс правой ОСА	-0,287645	0,112645	0,217894	-0,471449	-0,180291
IL 1 β , пг/мл	-0,983631	-0,028739	-0,014183	-0,016772	0,074315
IL 4, пг/мл	-0,796751	0,492842	-0,004509	-0,192209	0,108352
IL 10, пг/мл	-0,929405	0,304827	-0,008419	-0,110659	0,045207
IL 17, пг/мл	-0,85772	-0,380413	0,003446	0,167584	-0,041163
TNF α , пг/мл	-0,839199	-0,409749	0,019148	0,124319	-0,125126
СРБ, мг/л	-0,937163	0,193579	-0,07078	-0,092569	0,129319

Таблица 21

Факторное отображение показателей у больных ИБС

Исходные переменные	Факторы				
	1	2	3	4	5
Концентрация гомоцистеина, мкмоль/л	-0,782672	-0,100591	0,260167	0,112749	0,022149
ОХ, ммоль/л	-0,71479	0,113035	0,208562	0,226294	0,003996
ЛПВП, ммоль/л	0,159632	0,339887	-0,422411	0,330989	-0,145534
ТАГ, ммоль/л	-0,118851	-0,205876	0,415413	0,034682	0,47432
ЛПНП, ммоль/л	-0,575075	0,270353	-0,017565	0,152109	-0,246809
ЛПОНП, ммоль/л	-0,376075	-0,19821	0,376751	0,165483	0,023359
ИА	-0,564673	-0,083884	0,505317	-0,104383	0,167769
о-ЛПНП, ммоль/л	-0,806884	-0,368409	-0,122413	-0,173349	0,06757
АТ к о-ЛПНП	-0,490654	-0,095385	-0,093842	-0,432328	-0,000363
АТ к тромбину	-0,965847	-0,137391	-0,104286	-0,10802	0,04676
Концентрация фибриногена, мг/мл	-0,81931	0,409371	-0,017625	0,246348	0,01343
АЧТВ, сек	-0,473818	-0,185984	-0,288164	-0,184827	0,109933

Продолжение Таблицы 21

Исходные переменные	Факторы				
	1	2	3	4	5
Протромбиновое время, сек	-0,084577	-0,175821	-0,101227	-0,289057	-0,593329
Тромбиновое время, сек	-0,677365	-0,013275	-0,073759	-0,340674	0,017634
CD142+периферической крови, %	-0,950617	0,095835	-0,037914	0,098948	0,108998
Время задержки начала роста сгустка, мин	-0,823171	0,437917	0,08563	0,07893	-0,036666
Стационарная скорость тромбообразования, мкм/мин	0,008951	-0,390306	-0,085818	0,257443	0,03422
Размер фибринового сгустка через 30 мин, мкм	-0,188213	-0,425436	-0,224758	0,608376	-0,219082
Плотность фибринового сгустка через 30 мин, ус/ед	-0,132918	-0,370847	-0,222518	0,501281	-0,26392
СЕС, (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	-0,097776	-0,303493	-0,092455	0,442875	-0,22216
СЕС Living, абс.	-0,857087	0,31158	0,069489	0,162142	0,004601
СЕС Dead, абс.	-0,795191	0,333395	0,145983	0,098245	0,033379
ЕСР, (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	-0,254835	-0,034386	-0,237835	0,17774	-0,093997
АЕС, (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	-0,196552	-0,132198	0,454284	-0,097448	-0,003228
IL 2, пг/мл	-0,000163	-0,3326	0,363279	-0,036073	0,153518
INFγ, ед/мл	-0,919896	-0,25423	0,006092	0,040423	0,187617
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 3,5% ПЭГ	-0,737003	0,375696	-0,0387	0,321279	0,185911
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 7,0% ПЭГ	-0,746471	0,551754	-0,095713	0,186201	-0,022588
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 10,0% ПЭГ	0,010193	-0,129836	0,06252	0,026325	0,398272
АД систолическое, мм рт. ст.	-0,237851	0,792481	0,066924	0,382727	-0,020623
АД диастолическое, мм рт. ст.	0,199479	0,787822	0,040007	0,173487	-0,060996
ЧСС, ударов в минуту	-0,083946	0,059417	-0,151268	0,087062	0,029966
Диаметр аорты, мм	0,013315	-0,260189	-0,266102	0,113028	0,092234

Продолжение Таблицы 21

Исходные переменные	Факторы				
	1	2	3	4	5
Правое предсердие	0,011124	-0,17455	-0,484988	0,204996	-0,106146
Левое предсердие	0,002282	-0,222044	-0,541674	-0,033476	0,142146
Полость левого желудочка, мм	0,023745	-0,108145	-0,325011	0,126931	0,148294
Толщина межжелудочковой перегородки, мм	0,01968	-0,436544	0,067397	0,356249	0,345161
Толщина задней стенки левого желудочка, мм	0,183676	-0,000813	0,101813	0,3155	0,339396
Фракция выброса, %	0,424478	0,237457	0,106679	0,20554	-0,246218
Толщина комплекса интима-медиа	-0,892016	0,357138	-0,083459	-0,030554	-0,057729
Диаметр левой ОСА, мм	0,747741	0,342813	-0,024168	0,162822	0,352868
Диаметр правой ОСА, мм	0,670529	0,296758	-0,017232	0,250057	0,452527
Пиковая систолическая скорость кровотока левой ОСА, см/сек	-0,190105	-0,274336	0,3084	-0,146339	-0,590372
Пиковая систолическая скорость кровотока правой ОСА, см/сек	-0,306324	-0,339069	0,373403	0,086645	-0,479609
Резистивный индекс левой ОСА	0,124195	0,029591	0,231022	-0,402927	0,187297
Резистивный индекс правой ОСА	0,109172	0,10904	0,303885	-0,383947	0,062098
IL 1 β , пг/мл	-0,881541	-0,065559	-0,164636	-0,324201	-0,052087
IL 4, пг/мл	-0,842391	-0,348563	0,038613	0,085463	0,220782
IL 10, пг/мл	-0,930471	-0,085671	-0,148249	-0,224581	0,026622
IL 17, пг/мл	-0,917692	0,226393	-0,039402	-0,086706	-0,036547
TNF α , пг/мл	-0,952034	-0,119617	-0,048182	-0,071525	0,070474
СРБ, мг/л	-0,947965	-0,04965	0,030016	-0,041374	0,078553

Во всех изучаемых группах наибольший вклад в развитие патологических процессов вносит 1 фактор (табл. 22).

Соотношение факторов в изучаемых группах

Показатели/ группы	Факторы, %				
	1	2	3	4	5
Первая контрольная, (n=30)	39,90	11,05	6,95	6,76	5,84
Вторая контрольная, (n=46)	36,33	10,78	7,69	6,74	5,62
Первая, (n=45)	28,47	16,79	6,72	6,26	4,58
Вторая, (n=20)	39,96	9,43	7,71	6,53	6,24
Третья, (n=20)	41,55	9,14	7,74	6,56	5,53
Четвертая, (n=20)	43,56	8,99	8,85	6,68	5,57
Пятая, (n=28)	40,26	8,71	7,36	6,57	6,27
Шестая, (n=20)	39,92	10,96	8,44	7,05	6,26
Показатели/ группы	Факторы				
	1	2	3	4	5
Седьмая, (n=20)	30,87	8,75	6,26	5,70	4,83

Таким образом, полученный нами результат можно объяснить следующим образом: повышенный уровень гомоцистеина вызывает окисление и модификацию липопротеидов, повреждение эндотелиоцитов, что приводит к запуску системного процесса воспаления в организме и сопровождается изменением уровней цитокинов, активацией системы свертывания крови и иммунной системы. Максимальное повреждение наблюдается со стороны внутренней выстилки артерий, что выступает в качестве фактора инициирующего как развитие артериальной гипертензии, так и атеросклероза.

На следующем этапе нашей работы была построена математическая модель расчета толщины комплекса интима-медиа методом пошаговой множественной регрессии. Метод позволил выделить группу факторов, в наибольшей степени связанных с утолщением стенки сонных артерий – это уровень гомоцистеина,

общего холестерина, триглицеридов, концентрация интерлейкина 2 и титр аутоантител к тромбину (табл. 23).

Таблица 23

Прогностическое значение показателей в многофакторной математической модели расчета толщины комплекса интима-медиа

Показатели	Бета коэффициент	Коэффициент b	Стандартная ошибка	P=
Св.член		0,128	0,058	0,034
Концентрация гомоцистеина, мкмоль/л	1,416	0,073	0,017	0,000
ОХ, ммоль/л	0,439	0,055	0,010	0,000
ТАГ, ммоль/л	-0,160	-0,025	0,007	0,001
АТ к тромбину	0,811	1,832	0,474	0,000
IL 2, пг/мл	-1,708	-0,052	0,010	0,000

Коэффициент детерминации $R^2=0,9942$, это обозначает, что в 99,42% повышение уровня гомоцистеина приведет к утолщению стенки сонной артерии.

В результате была получена следующая математическая модель: Толщина комплекса интима-медиа = $0,128 + 0,073 \cdot$ концентрация гомоцистеина, мкмоль/л + $0,055 \cdot$ ОХ, ммоль/л - $0,025 \cdot$ ТАГ + $1,832 \cdot$ АТ к тромбину - $0,052 \cdot$ IL 2, пг/мл.

Таким образом, нами математически подтверждена роль повышения уровня гомоцистеина в развитии атеросклероза. Данную модель может быть использованна в диагностическом процессе для подтверждения утолщения комплекса интима-медиа сонной артерии на фоне атеросклеротического процесса.

3.1.2. Влияние гипергомоцистеинемии на общие проявления местной воспалительной реакции

Хронический риносинусит характеризуется стойким воспалительным процессом слизистой оболочки носовых пазух. При этом, ни один этиологический фактор не объясняет причину его затяжного течения.

Показано, что у пациентов с периодонтитами, хроническими заболеваниями желудочно-кишечного тракта регистрируется более высокий уровень гомоцистеина [37].

Уровень Нсу у больных хроническими риносинуситами был максимальным в стадию обострения процесса (рис. 11).

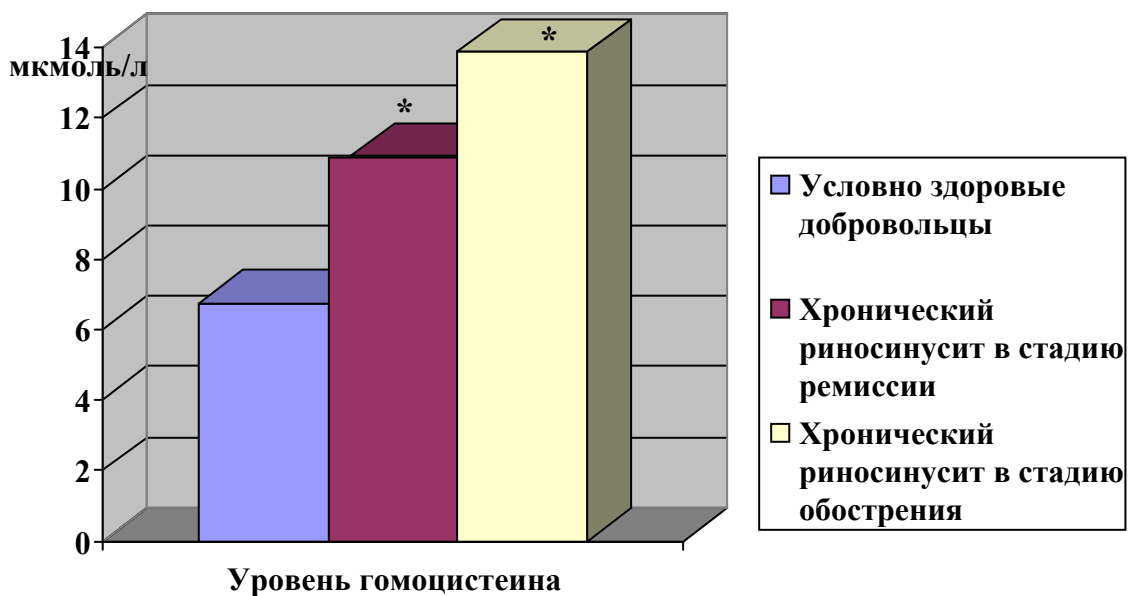


Рисунок 11. Содержание Нсу в сыворотке крови больных хроническими риносинуситами.

Примечание: * – уровень статистической значимости различий по сравнению с условно здоровыми добровольцами.

Повышение уровня гомоцистеина при обострении хронического воспалительного процесса эволюционно оправдано. Так, для ограничения очага воспаления организму необходимо создать условия гиперкоагуляции, а для борьбы с патогеном – интенсифицировать свободнорадикальные реакции с образованием активных форм кислорода.

Состояние гиперкоагуляции нами подтверждалось с одной стороны ростом процента моноцитов, экспрессирующих тканевой фактор (17,11 (15,31; 19,28) % в стадию ремиссии ($p=0,006$) и 18,21 (16,42; 20,37) % ($p=0,002$) в стадию обострения против 13,85 (11,98; 16,33) в контроле), с другой – концентрацией фибриногена в 1,6 раза в период ремиссии ($p=0,00001$) и 2,1 раза в обострение ($p=0,0001$).

Развитие общей системной воспалительной реакции организма оценивали по уровню цитокинов (табл. 24). Наблюдался рост практически всех исследуемых БАВ с максимальным увеличением IL-17 α . [174]. Данный интерлейкин секретируется Т-хелперами 17 типа, которые в свою очередь активно противостоят таким инфекционным агентам, как *Listeria*, *Salmonella*, *Toxoplasma*, *Cryptococcus*, *Leishmania* и *Francisella*, *Borrelia burgdoferi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacteroides fragilis*, грибы с одной стороны, с другой – участвуют в запуске аутоиммунных реакций.

Более высокий уровень Hcy по-разному оказывает пагубное влияние на здоровье слизистой носа. Во-первых, повышенная выработка провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1 β и IL-6, приводит к воспалительному каскаду событий, которые влияют на метаболизм метионина и Hcy, что приводит к развитию ГГЦ. Во-вторых, нарушение регуляции метаболизма во время хронических заболеваний усиливает системное воспаление, что приводит к снижению витаминов, в частности B₆, B₁₂ и фолиевой кислоты, которые играют важную роль в качестве кофакторов в метаболизме Hcy. Кроме того, учитывая уровень фолиевой кислоты в состоянии ГГЦ, который важен при дисбактериозе, эти два состояния, по-видимому, тесно связаны, и в этом контексте дисбиоз, вызванный ГГЦ, может быть одной из потенциальных причин заболеваний слизистой носа.

Так, по данным Крупович А.Я. и соавторов [91] при бактериологическом исследовании микрофлоры глоточного биотопа чаще выявляется полифлора. Среди условно патогенных микроорганизмов лидируют *S.epidermidis*, *Str.mitis*, *S. warneri*. Реже встречаются *Str.salivarius*, *S. aureus*, *Kl.haemolyticus*. Среди

патогенных микроорганизмов наиболее часто выявляются – *Ps. Aeruginosa*, *Str.pioenes*.

При делении всех больных с хроническими риносинуситами по уровню Hcy на две группы – менее 8 мкмоль/л и более 8 мкмоль/л получено, что у добровольцев, имеющих меньшую концентрацию аминотиола в сыворотке крови в мазках из ротоглотки встречаются только условно патогенные микроорганизмы, представленные в основном грамположительными кокками.

В группе лиц, имеющих показатель уровня гомоцистеина более 8 мкмоль/л, глоточный биотоп был представлен не только условно патогенными микроорганизмами, но и патогенными. В том числе золотистым стафилококком, кишечной палочкой.

**Уровни цитокинов у больных хроническими риносинуситами
(Me (25%; 75%))**

Группы / Параметры	IL-1 β , пкг/мл	IL-2, пкг/мл	IL-4, пкг/мл	IL-6, пкг/мл	IL-10, пкг/мл	IL-17 α , пкг/мл	IFN- γ , пкг/мл	TNF α , пкг/мл
Вторая контрольная, (n=46)	5,09 (4,09;5,89)	6,23 (5,18; 6,82)	0,6 (0,38;0,82)	2,25 (1,11;3,55)	10,32 (9,30;11,55)	3,19 (1,47; 4,58)	10,69 (6,96;9,66)	2,78 (1,81;3,94)
Больные в стадию ремиссии (n=23)	10,12 (9,01; 11,17) p1=0,0001	7,15 (3,80; 7,93)	0,81 (0,35;0,83)	4,96 (3,55; 6,12) p1=0,0012	11,45 (10,59;11,34) p1=0,044	20,19 (15,66;23,36) p1=0,000001	14,99 (13,99;16,60)	3,78 (2,65;5,45) p1=0,009
Больные в стадию обострения (n=23)	13,12 (10,98;14,23) p1=0,0001 p2=0,00001	8,15 (4,80;8,61) p1=0,036	0,82 (0,62; 0,85)	10,75 (7,04; 14,26) p1=0,000001 p2=0,000001	16,45 (15,55;17,40) p1=0,001 p2=0,0001	41,19 (37,38;44,36) p1=0,000001 p2=0,000001	17,99 (16,99;21,60) p1=0,04 p2=0,0008	7,90 (6,65;9,45) p1=0,000001 p2=0,000001

Примечание: n – число обследованных; p1 – уровень статистической значимости различий групп больных хроническими риносинуситами по сравнению с контрольной группой, p2 – уровень статистической значимости различий показателями больных в стадию ремиссии и стадией обострения.

Известно, что в очаге воспаления всегда есть повреждение эндотелиоцитов. Однако, данные о развитии системной дисфункции эндотелия при обострении хронического местного воспалительного процесса практически отсутствуют.

Нами получено, что у больных с хроническими риносинуситами наблюдается развитие дисфункции эндотелия, проявляющаяся как в увеличении числа циркулирующих эндотелиоцитов, так и в росте концентрации эндотелина [183]. Причем рост этих показателей отмечается и в стадию ремиссии (табл. 25).

Таблица 25

Содержание циркулирующих эндотелиоцитов и эндотелина 1 у больных хроническими риносинуситами, (Me (25-й; 75-й))

Показатели/ группы	Контрольная группа	Больные хроническими риносинуситами	
		Стадия ремиссии	Стадия обострения
СЕС (CD146+CD45-), (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	2,00 (1,00; 2,50)	3,00 (2,00; 3,50) p=0,083	5,35 (4,25; 6,80) p=0,0001 p1=0,0034
СЕС Living, абс.	2,00 (1,00; 2,50)	3,00 (2,00; 3,00) p=0,01	5,05 (4,15; 6,70) p=0,0001 p1=0,0034
СЕС Dead, абс.	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,50)	0,00 (0,00; 0,50)
ЕСР (CD146+CD34+), (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	0,50 (0,00; 2,00)	0,5 (0,00; 2,00)	1,00 (1,00; 2,00)
АЕС (CD146+CD105+), (количество клеток на 500000 лейкоцитов)	0,00 (0,00; 2,00)	1,50 (0,00; 2,00)	1,50 (0,00; 2,00)
эндотелин, фмоль/мл	0,97 (0,85; 1,13)	1,26 (0,91; 1,33) p=0,0099	2,31 (1,19; 2,43) p=0,000001 p1=0,00001

Примечание: p – уровень статистической значимости различий групп больных хроническим риносинуситами по сравнению с контрольной группой, p_1 – уровень статистической значимости различий больных хроническими риносинуситами в стадию ремиссии со с тадией обострения.

Таким образом, подводя итог данному фрагменту исследования можно утверждать, что местное хроническое воспаление приводит к повышению уровня гомоцистеина в сыворотке крови. Это в свою очередь способствует развитию дисбиоза глоточного биотопа и дисфункции эндотелия.

3.2. Влияние экзогенной гипергомоцистеинемии в экспериментах *in vivo*

Таким образом, повышенный уровень гомоцистеина сопровождается изменением активности систем иммунитета, гемостаза, неспецифической резистентности организма. Поэтому, следующим этапом нашего исследования явилась оценка единой клеточно-гуморальной защиты организма инициированная повреждающим действием высоких концентраций гомоцистеина в организме животного.

3.2.1. Индукция окислительного стресса экзогенной гипергомоцистеинемией в эксперименте

Нсу в дозе 100 мкмоль на 1 мл ОЦК и Нсу-Т в той же концентрации вводили внутривенно в объеме 0,1 мл беспородным лабораторным крысам-самцам в течение 30 дней. Животным контрольной (первой) группы (n=10) вводили физиологический раствор. В нашем эксперименте, повышенного уровня Нсу у всех животных мы не наблюдали. Животные, входящие в группу с хроническим введением Нсу (вторая группа), поделились практически поровну. У одной половины наблюдалось повышение концентрации Нсу в сыворотке крови, а у второй – достоверное его снижение. Введение Нсу-Т (третья группа) привело к снижению общего уровня Нсу (таблица 26). Концентрация цистеина в нашем эксперименте наиболее значительно (более чем на 50%) повысилась в группе животных с хроническим введением Нсу-Т, менее значительно (около 25%) – в группе с повышенным уровнем Нсу, и практически не изменилось у животных с пониженным уровнем Нсу. Концентрация общего глутатиона наиболее значительно возросла в группе животных с высоким уровнем Нсу (более, чем на 100%), при этом в этой группе регистрировалось увеличение концентрации окисленного глутатиона более чем в 25 раз. У животных третьей группы общий уровень глутатиона не изменялся, но при этом количество окисленного глутатиона превышало значения контрольной группы в 9 раз.

Содержание тиол-содержащих соединений при экспериментальной гипергомоцистеинемии, (Ме (25%; 75%))

Показатели / группы животных	Контрольная группа n=10	Вторая группа		Третья группа n=10
		С повышенным уровнем гомоцистеина n=9	С пониженным уровнем гомоцистеина n=11	
Гомоцистеин сыв., мкмоль/л	7,9 (6,7; 10,7)	14,5 (13,7;19,3) p1=0,002	3,9 (2,6;4,9) p1=0,001 p2=0,0003	4,2 (3,2;5,9) p1=0,001 p2=0,0002
Цистеин сыв., мкмоль/л.	31,4 [29,2;36,21	39,33 (33,7; 50,6) p1=0,04	32,7 (29,5; 39,5) p2=0,03	48,2 (44,9;51,5) p1=0,001 p2=0,0002 p3=0,005
Глутатион общий эр., мкмоль/г гемоглобина	8,7 (6,7; 10,2)	20,9 (10,5;20,9) p1=0,0001	8,3 (7,6; 12,9) p2=0,0003	10,8 (9,4; 10,8) p2=0,003
Глутатион восст. Эр., мкмоль/г гемоглобина	8,1 (6,4; 10,1)	6,4 (6,4; 6,6)	6,5 (5,8; 9,9)	6,5 (5,3; 7,6) p1=0,045
Глутатион окисленный эр., мкмоль/г гемоглобина	0,4 (0,1; 0,6)	9,2 (3,8; 14,6) p1=0,0001	1,5 (1,1; 3,3) p1=0,0001 p2=0,00003	3,2 (3,0; 4,3) p1=0,00001 p2=0,0002 p3=0,0005

Примечание: n – число обследованных; p1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p2 – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой животных с неизменным уровнем гомоцистеина, p3 – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой животных с пониженным уровнем гомоцистеина.

Таким образом, на фоне хронического введения высоких доз Нсу, мы получили противоположные результаты. У большего количества экспериментальных животных резервные возможности организма оказались

высокими, о чем свидетельствует снижение концентрации Нсу сыворотки крови, не измененная концентрация цистеина и менее выраженное повышение уровня окисленного глутатиона. У второй части экспериментальных животных мы получили срыв механизмов адаптации: повышение уровня Нсу, цистеина, общего глутатиона и значительное увеличение содержания окисленного глутатиона. Данные результаты можно объяснить только тем, что в эксперимент были включены нелинейные животные, обладающие разными компенсаторными возможностями элиминировать избыток гомоцистеина.

Хроническое введение высоких доз Нсу-Т также может вызывать образование свободных радикалов, о чем свидетельствует повышение количества окисленного глутатиона, при этом, избыток Нсу в этой группе экспериментальных животных был трансформирован в цистеин.

3.2.2. Состояние иммунного статуса при экспериментальной экзогенной гипергомоцистеинемии

Экзогенную ГГЦ моделировали путем внутрибрюшинного введения Нсу в дозе 100 мкмоль на 1 мл ОЦК животного, однократно (первая опытная группа), один раз в сутки в той же дозе в течение 9 дней (вторая опытная группа) и 4 раза в сутки в той же дозе (каждые 6 часов) в течение 9 дней (третья опытная группа). Забор крови производили через 6 часов после последней инъекции Нсу.

Через 6 часов после однократного введения Нсу уровень аминотиола в плазме крови возрос практически в 2 раза ($p=0,0117$), у животных второй опытной группы его концентрация увеличилась в 2,7 раза ($p=0,0499$), а в третьей опытной группе – в 7,2 раза ($p<0,001$) по сравнению с интактными животными. При этом уровень Нсу внутри клеток не изменялся ни в одной из исследуемых групп (табл. 27).

**Уровень гомоцистеина в плазме и мононуклеарах крови
(Me (25%; 75%))**

Показатели	Контрольная группа N=9	1 опытная группа N=13	2 опытная группа N=10	3 опытная группа N=9
Гомоцистеин в плазме крови, мкмоль/л	4,6 (4,25; 5,88)	8,96 (8,75; 10,64) p1 = 0,0117*	12,86 (12,56; 20,24) p1 = 0,0499 p2 = 0,0466	33,10 (23,88; 35,56) p1 < 0,001 p2 < 0,001 p3 = 0,00591
Гомоцистеин в мононуклеарах, нмоль/1 клетку	0,02 (0,00; 0,17)	0,02 (0,00; 0,19)	0,01 (0,00; 0,10)	0,03 (0,00; 0,60)

Примечание: p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p₂ – уровень статистической значимости различий по сравнению с первой экспериментальной группой, p₃ – уровень статистической значимости различий по сравнению со второй экспериментальной группой.

Общий пул лимфоцитов у животных первой опытной группы уменьшился в 3 раза (p=0,0117) за счет снижения в большей степени Т-цитотоксических лимфоцитов, количество которых падало практически в 6 раз (p=0,0117) по сравнению с контролем. Число Т-хелперов также уменьшилось, но лишь в 1,5 раза (p=0,025). Во второй опытной группе общее количество лимфоцитов не изменилось, но при этом наблюдалось увеличение уровня Т-цитотоксических лимфоцитов в 1,2 раза (p=0,012) и снижение популяции натуральных киллеров в 1,4 и 2,6 раза по сравнению с первой и третьей опытными группами (p=0,012 и 0,003 соответственно). В третьей опытной группе резко увеличилось абсолютное количество всех лимфоцитов, за счет Т-лимфоцитов по сравнению со всеми исследуемыми группами животных. Соотношение Т-хелперы/Т-цитотоксические при этом было меньше в 2 раза, чем у интактных животных и в 6,3 раза по сравнению с первой опытной группой, но не отличалось от второй опытной группы.

Процентное содержание В-лимфоцитов и натуральных киллеров во всех исследуемых группах значительно варьируют, при этом количественные показатели не отличаются от таковых у животных контрольной группы (табл. 28).

Таблица 28

Изменение в иммунограмме крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии (Ме (25%; 75%))

Показатели	Контрольная группа N=9	1 опытная группа N=13	2 опытная группа N=10	3 опытная группа N=9
Лимфоциты, абс. в 1 мкл крови	8210,0 (4760; 8704)	4342,0 (3166,0; 6370,0) p ₁ =0,036	7679,0 (7024,0; 8606,0) p ₁ =0,888 p ₂ =0,0011	14884,0 (13744,0; 20096,0) p ₁ =0,012 p ₂ =0,0002 p ₃ =0,0024
T лимфоциты (CD3+), абс. в 1 мкл крови	5404,0 (3208,0; 5884,0)	1750,0 (1346,0; 2514,0) p ₁ =0,0117	5510,0 (5464,0; 6198,0) p ₁ =0,674 p ₂ <0,001	11944,0 (8142,0; 13977,0) p ₁ =0,012 p ₂ <0,001 p ₃ =0,0059
T хелперы (CD3+, CD4+), абс. в 1 мкл крови	1801,5 (1095,0; 2223,0)	1171,0 (960,0; 1484,0) p ₁ =0,025	1366,0 (974,0; 2207,0) p ₁ =0,123 p ₂ =0,0016	2804,0 (2354,0; 3009) p ₁ =0,012 p ₂ =0,604 p ₃ =0,0091
T цитотоксические (CD3+, CD8+), абс. в 1 мкл крови	3497,0 (1751,0; 3724,0)	590,0 (496,0; 1065) p ₁ =0,0117	4509,0 (3751,0; 5058,0) p ₁ =0,012 p ₂ <0,001	11526,0 (5825,0; 12573,0) p ₁ =0,012 p ₂ <0,001 p ₃ =0,007
T хелперы/T цитотоксические	0,6 [0,5; 0,65]	1,89 (1,47; 2,21) p ₁ =0,012	0,27 (0,22; 0,59) p ₁ =0,011 p ₂ =0,012	0,33 (0,24; 0,36) p ₁ =0,012 p ₂ =0,012 p ₃ =0,944

Показатели	Контрольная группа N=9	1 опытная группа N=13	2 опытная группа N=10	3 опытная группа N=9
В лимфоциты, (CD3-, CD45RA+), абс. в 1 мкл крови	532,0 (411,0; 1226,0)	871,0 (683,0; 1190,0) p1=0,33	774,0 (739,0; 1530,0) p1=0,48 p2=0,46	899,0 (714,0; 981,0) p1=0,78 p2=0,56 p3=0,82
NK, (CD3-, CD161ax+), абс. в 1 мкл крови	537,5 (230,0; 675,0)	318,0 (198,0; 492,0) p1=0,67	214,0 (129,0; 223,0) p1=0,19 p2=0,012	559,0 (297,0; 788,0) p1=0,33 p2=0,06 p3=0,003

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p_2 – уровень статистической значимости различий по сравнению с первой экспериментальной группой, p_3 – уровень статистической значимости различий по сравнению со второй экспериментальной группой.

Таким образом, однократное введение Нсу сопровождается выраженным снижением числа Т-лимфоцитов и их субпопуляций. Однако, совершенно иная картина зарегистрирована нами у животных третьей опытной группы, имеющих постоянную ГГЦ на протяжении 9 суток. У этих животных общее число лимфоцитов возрастало, особенно за счет субпопуляции Т-цитотоксических лимфоцитов.

На следующем этапе исследования нами были определены уровни цитокинов, характеризующих активность иммунной системы: IL-1 α , IL-4, IL-17. Максимальный уровень всех изучаемых цитокинов зафиксирован в 3 опытной группе, за исключением IL-1 α . Наибольшая концентрация данного интерлейкина определялся в первой опытной группе, в то время как в третьей – его концентрация была минимальной. Содержание IL-4 в первой опытной группе возросло в 71 раз ($p=0,00001$), а во второй и третьей группах – больше чем в 4000 раз ($p=0,00001$). Уровень IL-17 в первой опытной группе возрос в 11 раз ($p=0,00001$), во второй – в

26 раз ($p=0,00008$), а в третьей – в 47 раз ($p=0,00001$) по сравнению с контрольными животными (табл. 29).

Таблица 29

Изменение концентрации интерлейкинов крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии (Me (25%; 75%))

Показатели	Контрольная группа N=9	1 опытная группа N=13	2 опытная группа N=10	3 опытная группа N=9
IL-1 α , пг/мл	752,14 (549,82; 914,10)	3786,17 (1613,00; 5834,03) $p_1 < 0,001$	99,31 (47,35; 181,22) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	2,14 (1,06; 3,37) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$
IL-4, пг/мл	0,007 (0,00; 0,50)	0,5 (0,005; 16,63) $p_1 < 0,001$	30,54 (25,56; 42,48) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	27,43 (23,79; 38,11) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
IL-17, пг/мл	15,46 (5,09; 46,81)	179,29 (101,00; 218,09) $p_1 < 0,001$	399,35 (310,45; 402,17) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	728,47 (416,96; 1326,90) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p_2 – уровень статистической значимости различий по сравнению с первой экспериментальной группой, p_3 – уровень статистической значимости различий по сравнению со второй экспериментальной группой.

Состояние врожденного звена иммунной системы оценивали по содержанию в сыворотке крови экспериментальных животных MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1 или CCL2 (C-C motif ligand 2)), альфа дефензинов (HNP1-3), кателицидина (LL-37), фактора некроза опухолей альфа, интерферона гамма (табл. 30). Наблюдался рост всех изучаемых показателей во всех опытных группах, с максимальными значениями в третьей [140].

Ответ острой фазы воспаления регистрировали по уровню церулоплазмينا и С-реактивного белка. Наблюдалась та же тенденция. Так, уровень СРБ после однократного введения гомотистена вырос в 9 раз ($p=0,00006$), церулоплазмينا в

15 раз ($p=0,00004$), а при субхроническом введении – в 24,6 ($p=0,00002$) и 70 раз ($p=0,0000001$) соответственно.

Таблица 30

Изменение концентрации цитокинов крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии (Me (25%; 75%))

Показатели	Контрольная группа N=9	1 опытная группа N=13	2 опытная группа N=10	3 опытная группа N=9
MCP-1, пг/мл	10,41 (6,73; 17,20)	132,28 (98,73; 243,59) $p_1 < 0,001$	132,97 (131,58; 181,58) $p_1 < 0,001$	696,94 (596,86; 1009,94) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$
HNP1-3, пг/мл	177,35 (157,28; 199,59)	273,10 (241,88; 376,75) $p_1 < 0,01$	399,31 (347,35; 481,22) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	3208,00 (2083,00; 4083,00) $p_1 < 0,0001$ $p_2 < 0,0001$ $p_3 < 0,0001$
LL-37, нг/мл	0,34 (0,15; 0,63)	2,11 (1,77; 2,84) $p_1 < 0,001$	3,54 (2,56; 4,48) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$	6,51 (4,06; 7,47) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
TNF α , пг/мл	30,20 (0,00;54,30)	137,50 (109,00;150,74) $p_1 < 0,001$	297,41 (248,77;346,27) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,003$	1104,01 (866,79;1350,81) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$
INF γ , ед/мл	13,42 (0,00;24,16)	107,26 (101,00; 118,23) $p_1 < 0,001$	161,69 (150,56; 193,24) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	228,12 (191,53; 323,24) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,001$ $p_3 < 0,001$

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p_2 – уровень статистической значимости различий по сравнению с первой экспериментальной группой, p_3 – уровень статистической значимости различий по сравнению со второй экспериментальной группой.

В специальной серии исследований оценивалась интенсивность лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии при ГГЦ. В контрольной группе животных количество адгезированных лейкоцитов составило $29,8 \pm 3,7\%$, в первой опытной группе – $81,7 \pm 4,1\%$. При этом, через 2-е суток инъекций гомоцистеина ЛТА достоверно снижалась до $9,33\%$, на 5-е сутки увеличивалась до 78% (рис. 12), на 10-е сутки достигала $93,5\%$.

Известно, что к образованию розеток с тромбоцитами способны Т-хелперы и натуральные киллеры, и следовательно, максимальная интенсивность ЛТА может быть не более 60% , в результате нашего эксперимента получились более высокие цифры. Возможно, это объясняется повреждающим действием Нсу на клетки, либо неспецифической экспрессией рецепторов для тромбоцитов другими субпопуляциями лимфоцитов [147].

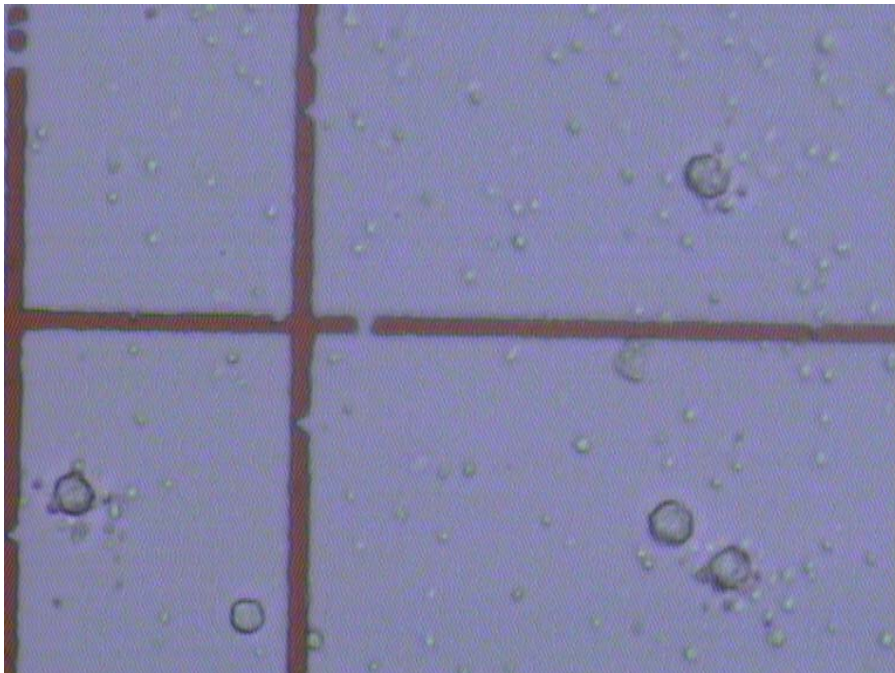


Рисунок 12. ЛТА экспериментальных животных на 5 сутки эксперимента.

3.2. 3. Гипергомоцистеинемия у иммунодефицитных животных

На первом этапе исследования нами изучалась динамика изменения уровня Нсу на фоне введения аминотиолов. Для достижения поставленной цели здоровым, половозрелым самцам, массой тела в среднем 150 г. вводили Нсу и Нсу-Т в концентрации 100 мкмоль на 1 мл ОЦК однократно и в течение 9 суток один раз в день. Через 6 часов после введения исследуемых веществ содержание Нсу в сыворотке крови увеличилась практически в 2 раза, на 9 день введения – в 3 раза (табл. 31).

Таблица 31

**Уровень общего гомоцистеина в сыворотке крови у интактных крыс
(мкмоль/л) (Ме (25-й; 75-й))**

До нагрузки (n=10)	Через 6 ч после введения		После 9 дней введения	
	гомоцистеина (n=10)	гомоцистеин- тиолактона (n=10)	гомоцистеина (n=10)	гомоцистеин- тиолактона (n=10)
4,81 (4,05; 5,38)	8,92 (7,02; 9,99)	8,90 (6,57; 9,54)	12,24 (10,74; 17,52) p=0,02	11,48 (9,73; 16,25) p=0,0018

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с исходным состоянием.

Иммунодефицитное состояние вызывали путем введения экспериментальным животным циклофосфана, и подтверждали показателями иммунограммы (табл. 32). У иммунодефектных животных отмечались изменения как в гуморальном звене иммунной системы – снижалось абсолютное количество В-лимфоцитов на 30%; так и в клеточном – уменьшалось соотношение Т-хелперы/Т-цитотоксические лимфоциты в 2 раза ниже контроля, на фоне снижения Т-хелперов (CD3+, CD4+) на 43,1 % и увеличение процентного количества Т-лимфоцитов на 23,4 % по сравнению с соответствующими показателями у интактных крыс.

Иммунограмма крыс до введения тиолов (Ме (25-й; 75-й))

Показатели	Интактные крысы (n=10)	Крысы, получавшие цитостатик (n=10)
Лимфоциты, абс. в 1 мкл крови	8210,0 (4760; 8704)	4875,8 (3269,12; 5307,03) p=0,002
Т лимфоциты (CD3+), абс. в 1 мкл крови	5404,0 (3208,0; 5884,0)	3831,23 (2704,04; 4566,89) p=0,01
Т хелперы (CD3+, CD4+), абс. в 1 мкл крови	1801,5 (1095,0; 2223,0)	776,45,26 (472,45; 958,12) p=0,005
Т цитотоксические (CD3+, CD8+), абс. в 1 мкл крови	3497,0 (1751,0; 3724,0)	3054,78 (2232,96; 3608,52) p=0,045
Т хелперы/ Т цитотоксические	0,6 (0,5; 0,65)	0,27 (0,18; 0,36) p=0,02
В лимфоциты, (CD3-, CD45RA+), абс. в 1 мкл крови	1090,0 (905,0; 1617,0)	797,52 (589,59; 887,06)
NK, (CD3-, CD161aх+), абс. в 1 мкл крови	537,5 (230,0; 675,0)	238,5 (241,05; 357,02) p=0,04

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой контроля.

Содержание Нсу у иммунодефектных крыс было практически в 2 раза выше (p=0,0001) чем у интактных животных (табл. 33), что подтверждает регуляторную роль иммунной системы в поддержании нормального уровня гомоцистеина путем образования аутоантител к модифицированным белковым структурам.

Через 6 часов после инъекции Нсу его концентрация в сыворотке крови у крыс с ИДС превышала значения в группе контроля в 3 раза; после введения Нсу-Т уровень эндогенного Нсу также, по нашим данным, повышался почти в 2 раза [10, 101].

На 10 сутки введения аминотиолов уровень Нсу был практически в 2 раза выше у крыс с ИДС по сравнению с концентрацией у интактных, при этом не отличался от содержания его до нагрузки тиолами, что вероятно, обусловлено включением других, более отсроченных, механизмов его элиминации, таких как, реметилирование в метионин ферментом метилентетрагидрофолатредуктазой, либо превращение его в цистеин под действием цистатионин- β -синтазы.

Таблица 33

**Содержание общего гомоцистеина в сыворотке крови у крыс с ИДС
(мкмоль/л) (Ме (25-й; 75-й))**

До нагрузки (n=10)	Через 6 ч после введения		После 9 дней введения	
	гомоцистеина (n=10)	гомоцистеин- тиолактона (n=10)	гомоцистеина (n=10)	гомоцистеин- тиолактона (n=10)
9,18 (8,61; 10,59) p1=0,002	27,38 (17,65; 32,1) p1=0,001 p2=0,0003	17,20 (14,92; 20,2) p1=0,003	9,54 (6,05; 12,29) p1=0,002	9,67 (6,73; 12,50) p1=0,002

Примечание: p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p₂ – уровень статистической значимости различий в сравнении с уровнем до нагрузки.

Показатели иммунограммы иммунодефектных крыс не имели отличия в зависимости от введения гомоцистеина и гомоцистеина-тиолактона. Наблюдалось резкое снижение общего числа лимфоцитов (в 2,26 раз (p=0,002)) через 6 часов после введения тиолов и увеличение их количества на 9 день (в 1,55 раз (p=0,03)). Изменения в субпопуляциях носили однонаправленный характер и отличались только степенью выраженности. Так, процентное содержание Т-лимфоцитов у крыс с ИДС было больше на 43,4% по сравнению с интактными животными (p=0,003) и не менялось на фоне введения аминотиолов. Рост числа Т-лимфоцитов был обусловлен возрастанием уровня цитотоксических лимфоцитов (в 2,2 раза по сравнению с интактными животными (p=0,001)) и уменьшением совокупности Т-

хелперов. Со стороны В-лимфоцитов наблюдалось падение как относительных (в 4 раза ($p=0,005$)), так и их абсолютных значений (в 10 раз ($p=0,0001$)).

Полученные данные свидетельствуют о влиянии повышенных концентраций Нсу на адаптивное звено иммунной системы [101].

3.3.4.. Коагулопатия при экспериментальной экзогенной гипергомоцистеинемии

Для изучения механизмов развития коагулопатии, развивающейся на фоне повышенных концентраций Нсу, нами была смоделирована экспериментальная экзогенная ГГЦ на 42 белых беспородных крысах – самцах средней массой 150 граммов, одного возраста. Всех животных разделили на 2 группы по 21 крысе в каждой.

ГГЦ у опытных животных создавали путем внутрибрюшинного введения Нсу в дозе 100 мкмоль на 1 мл ОЦК один раз в день, в течении 14 суток, взяв за основу модель гипергомоцистеинемии E.L. Streck и соавторов [346].

На 14 сутки ежедневного введения Нсу в дозе 0,1 мкмоль на 1 г веса была получена умеренная ГГЦ: содержание Нсу в контроле составило 7,8 (6,02; 8,96) мкмоль/л, а в опытных образцах – 28,6 (20,5; 32,4). При этом уровень Нсу внутри клеток не изменился: в контрольной группе он составил 0,02 (0,00; 0,17), а в опытных группах – 0,03 (0,00; 0,60) нмоль/1 клетку.

Нами зарегистрировано развитие дисфункции эндотелия в опытной группе, проявляющаяся увеличением уровня эндотелина более чем в 5 раз и снижением концентрации нитратов и нитритов ($p=0,005$) (табл. 34).

Известно, что эндотелиин самый мощный вазоконстриктор из известных на сегодняшний день. Резкое увеличение его уровня при ГГЦ приводит к нарушению перфузии органов и тканей, с возможным ишемическим повреждением клеток. Более того, вазоконстрикторный эффект эндотелина усиливается на фоне снижения концентрации основного вазодилататора – оксида азота, регистрируемое нами по уменьшению содержания его метаболитов – нитратов и нитритов.

**Содержание вазоактивных веществ в сыворотке крови крыс при ГГЦ,
(Me (25; 75))**

Показатель	Контрольная группа (N=21)	Опытная группа (N=21)
эндотелин, фмоль/мл	2,83 (0,85; 3,52)	15,73 (12,25; 15,82) p=0,005
нитраты, мкмоль/л	101,00 (96,48; 110,50)	54,17 (34,09; 54,17) p=0,005
нитриты, мкмоль/л	87,50 (58,33; 95,83)	25,00 (23,01; 41,80) p=0,005

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, экзогенная ГГЦ сопровождается развитием дисфункции эндотелия [48].

При изучении коагулологических показателей плазмы экспериментальных крыс, нами зарегистрировано развитие гиперкоагуляции в группе опытных животных (табл. 35), что подтверждает сведения о роли ГГЦ в развитии тромбозов [98-99, 148, 160].

Показатели коагулограммы экспериментальных животных Me (25; 75)

Показатель	Контрольная группа (N=21)	Опытная группа (N=21)
АЧТВ, сек	22,25 (21,5; 23,00)	19,75 (19,00; 20,50) p = 0,008
ТВ, сек	12,00 (11,00; 13,00)	9,00 (8,00; 10,00) p = 0,0076
ПВ, сек	27,25 (26,50; 28,00)	22,25 (21,50; 23,00) p = 0,007
РФМК, мг/100мл	3,40 (3,00; 4,00)	7,25 (6,50; 12,00) p = 0,007

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой.

В дальнейшем, нами исследовалась экспрессия тканевого фактора (TF) под воздействием высоких доз гомоцистеина в клетках миокарда экспериментальных животных (рис. 13 и 14).

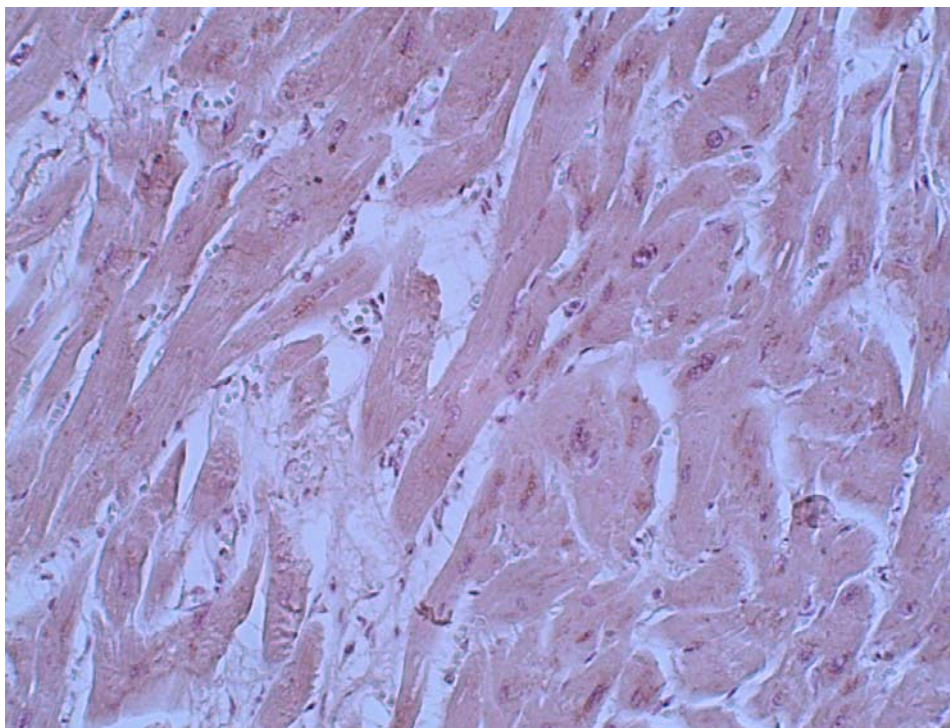


Рисунок 13. Миокард интактной крысы (увеличение x 400).

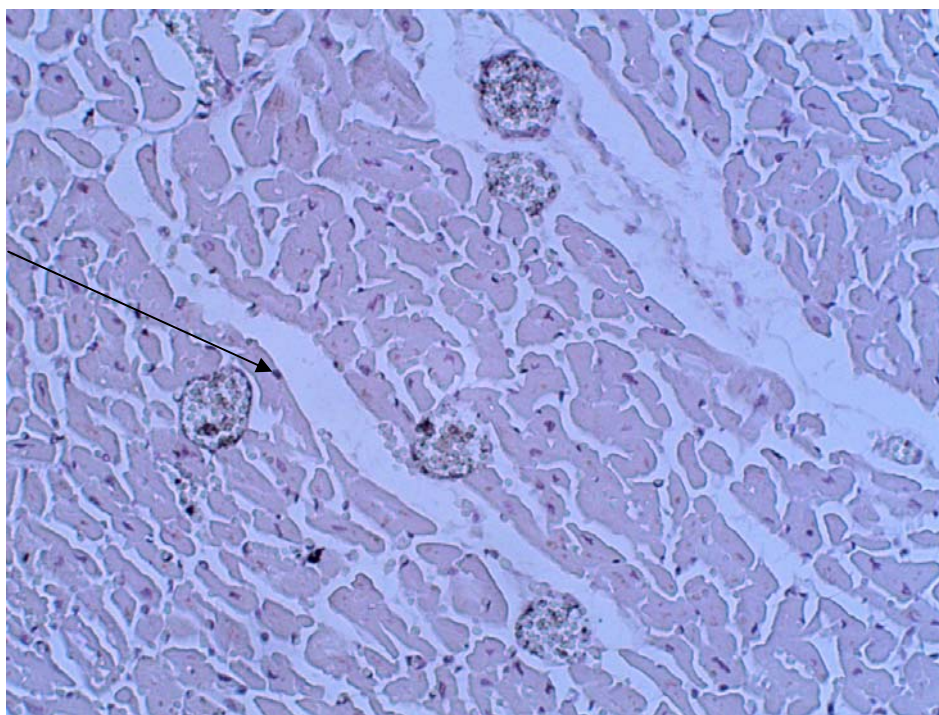


Рисунок 14. Экспрессия тканевого фактора эндотелиоцитами, фибробластами, нейтрофилами в миокарде крысы из опытной группы

(увеличение $\times 400$) (стрелкой указана экспрессия тканевого фактора эндотелием).

Установлено, что в эндотелиоцитах увеличивалась экспрессия тканевого фактора более чем в 3 раза ($p = 0,00028$), в нейтрофилах – практически в 10 раз ($0,0001$). Со стороны фибробластов зарегистрировано уменьшение числа не окрашенных клеток (табл. 36).

Таблица 36

Экспрессия тканевого фактора в миокарде экспериментальных животных ($M \pm SD$)

Показатель	Контрольная группа (N=21), % / \pm SD	Опытная группа (N=21), % / \pm SD	Уровень достоверности
Экспрессия TF эндотелиоцитами	0,62 \pm 0,67	2,05 \pm 0,81	коэф. Вилкоксона $p = 0,00028$
менее 10% окрашенных клеток	47,6%	-	Хи-квадрат $p=0,009$
10 – 25% окрашенных клеток	42,9%	28,6%	Хи-квадрат $p=0,0018$
25 – до 50% окрашенных клеток	9,5%	38,0%	Хи-квадрат $p=0,026$
50 – 75% окрашенных клеток	-	33,4%	Хи-квадрат $p=0,033$
Экспрессия TF фибробластами	0,273 \pm 0,47	0,455 \pm 0,52	коэф. Вилкоксона = 0,36
менее 10% окрашенных клеток	70,0%	54,5%	Хи-квадрат $p=0,0002$
10 – 25% окрашенных клеток	30,0%	45,5%	Хи-квадрат $p=0,75$
Экспрессия TF нейтрофилами	0,19 \pm 0,40	1,86 \pm 0,79	коэф. Вилкоксона = 0,0001
менее 10% окрашенных клеток	80,9%	-	Хи-квадрат $p=0,01$
10 – 25% окрашенных клеток	19,1%	38,1%	Хи-квадрат $p=0,002$
25 – до 50% окрашенных клеток	-	38,1%	Хи-квадрат $p=0,03$
50 – 75% окрашенных клеток	-	23,8%	Хи-квадрат $p=0,05$

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, при экспериментальной ГГЦ увеличивается экспрессия TF эндотелиоцитами и особенно нейтрофилами [90]. Вероятно, усиление экспрессии TF на эндотелиоцитах может быть обусловлено гиперпродукцией $TNF\alpha$ и $INF\gamma$ клетками иммунной системы. Наиболее значительно в нашем исследовании увеличилось содержание $TNF\alpha$ – в 14 раз ($p=0,003$), концентрация $INF\gamma$ возросла почти в 11 раз ($p=0,0005$) (табл. 37) [61].

Таблица 37

Содержание цитокинов в сыворотке крови крыс при ГГЦ, Ме (25; 75)

Показатель	Контрольная группа (N=21)	Опытная группа (N=21)
$TNF\alpha$, пг/мл	77,56 (0,00; 150,74)	1104,01 (860,05; 1350,81) $p=0,003$
$INF\gamma$, пг/мл	17,99 (4,05; 25,90)	191,53 (124,59; 228,12) $p=0,0005$

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой.

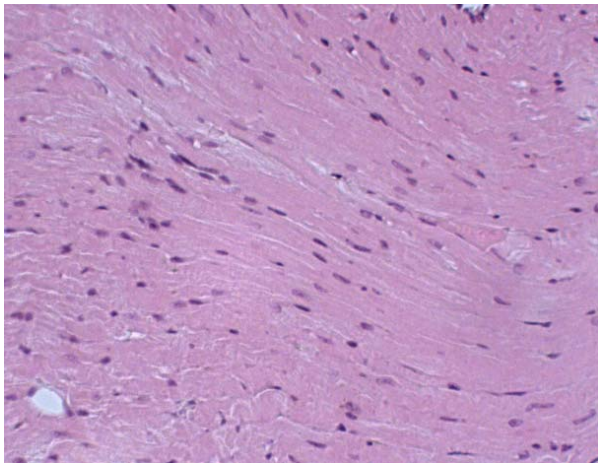
Показано, что $TNF\alpha$ является индуктором апоптоза [70, 133, 158]. Поэтому, на следующем этапе нами оценивалась экспрессия маркеров апоптоза миокардиоцитами экспериментальных животных.

3.2.5. Активация апоптоза кардиомиоцитов у животных с экспериментальной гипергомоцистеинемией

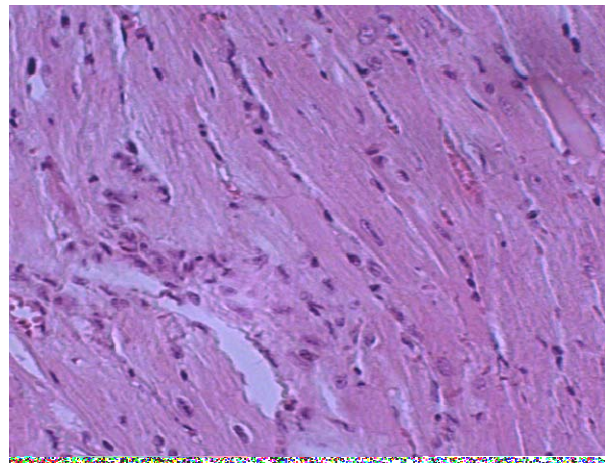
Масса сердца у крыс с экспериментальной ГГЦ не изменялась по сравнению с интактными животными. Однако, при этом, снизилось как абсолютное количество кардиомиоцитов (КМЦ) (8, 01 (7,75; 8,3) в опытной группе, против 11,086 (10,54; 12,54) в контрольной ($p=0,036$)), так и их диаметр (8,5 (7,01; 10,01) и 12,25 (11,51; 13,01) мкм соответственно ($p=0,083$)), изменилось соотношение

одно- и двуядерных клеток: доля одноядерных уменьшилась (на 44,1%), а двуядерных – увеличивалась ($p=0,046$).

Кроме этого, в миокарде животных опытной группы зафиксированы: межучасточный и межклеточный отек, белковая дистрофия основного массива кардиомиоцитов, наряду с неравномерной, диффузно-очаговой гипертрофией части мышечных волокон. Обнаружены клетки с крупными гиперхромными ядрами и линейными размерами, превышающими средние значения контрольных группы в 1,2 и 1,4 раза, диффузный перимускулярный кардиосклероз, максимально выраженный в субэндокардиальной зоне. У 30% животных, в межучасточной строме отмечалось формирование диффузных лимфогистиоцитарных инфильтратов с примесью плазматических клеток, фибриноидное набухание периваскулярной стромы и признаки васкулитов (рис. 15).



Миокард крысы контрольной группы.



Миокард крысы, получавшей Нсу 14 суток.

Рисунок 15. **Микрофотографии миокарда крыс.**
Окраска гематоксилин-эозином; увеличение X200.

По нашему мнению, снижение абсолютного числа КМЦ может быть обусловлено гибелью клеток миокарда и истощением его регенераторных резервов. Для уточнения механизмов гибели кардиомиоцитов нами с помощью метода проточной цитофлуометрии в гомогенате миокарда определялись маркеры некроза и апоптоза. Известно, что пропидиум иодид (PI) может войти в клетку и

связаться с ДНК только при условии нарушения целостности ее мембраны, что возможно лишь при некрозе. Раннюю стадию апоптоза определяют по экспрессии аннексина (AV5), позднюю – по одновременной окраске клеток PI и AV5. Нами получено увеличение количества клеток с маркерами раннего апоптоза в 5 раз, позднего – в 7 раз и некроза – в 2 раза в опытной группе [97] (табл. 38).

Таблица 38

Маркеры клеточной гибели в миокарде крыс с экспериментальной гипергомоцистеинемии (Me (25; 75))

Показатели	миокард животных контрольной группы	миокард животных опытной группы
PI, абс. (маркер некроза)	668,50 (596,00; 721,00)	1583,00 (1295,00; 1895,00) p=0,002
PI, %	9,46 (7,75; 11,11)	17,09 (14,06; 23,45) p=0,002
AV5, абс. (маркер апоптоза)	1201,0 (1029,0; 1497,50)	5751,50 (4660; 7212,50) p=0,002
AV5, %	9,52 (7,47; 10,12)	50,05 (48,97; 52,64) p=0,002
PI+AV5, абс. (поздняя стадия апоптоза или погибшие клетки)	167,50 (158,00; 187,50)	1189,00 (1128,00; 1501,50) p=0,002
PI+AV5, %	5,69 (4,81; 6,74)	10,86 (10,03; 12,81) p=0,002

Примечание: p – уровень различий по сравнению с контрольной группой. Таким образом, ГГЦ вызывает гибель миокардиоцитов как путем апоптоза, так и некроза, с преобладанием апоптоза.

Исходя из наших данных, определить конкретного индуктора апоптоза на фоне ГГЦ не представляется возможным, что требует дальнейшего изучения [61].

3.2.6. Оценка повреждающей роли гипергомоцистеинемии в анализе главных компонент у экспериментальных животных

Таким образом, при сжатии наших исходных составляющих (в нашем случае 37), характеризующих основную гамму событий у интактных животных, получено, что роль играют лишь 2 интегративных индекса – фактор 1 и 2 (рис. 16 и 17).

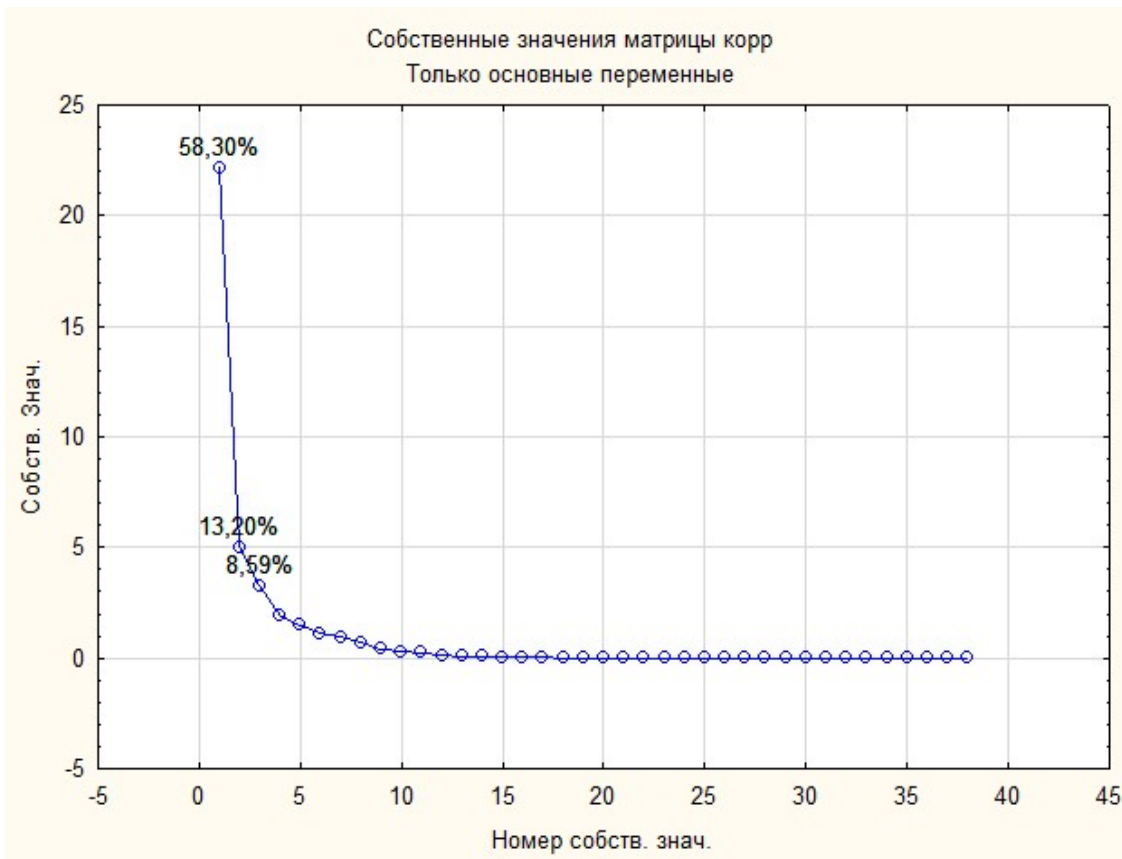


Рисунок 16. Собственные значения главных компонент и доли контролируемой ими дисперсии у интактных животных.

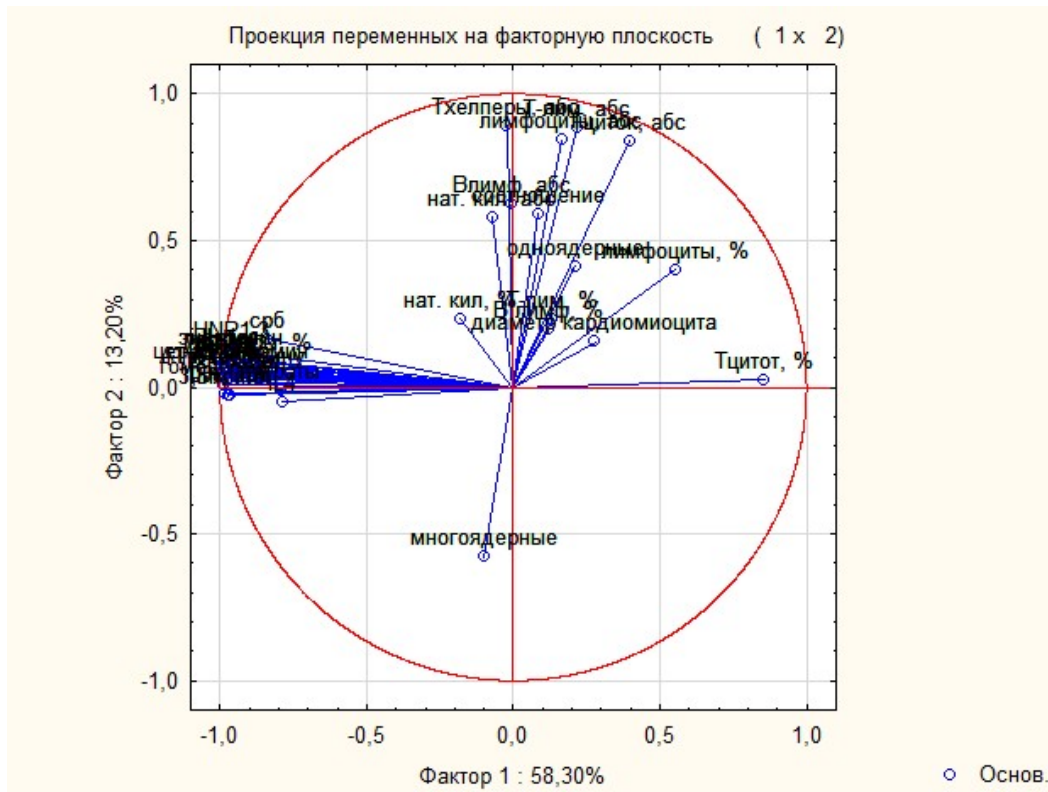


Рисунок 17. Проекция переменных на факторную плоскость.

Суммарный вклад 1 фактора у интактных животных составил 58,3%, что свидетельствует о том, что эти параметры с одной стороны достаточно близки по силе действия, а с другой – от них зависит изменчивость исходных показателей. В свою очередь, первый фактор объединил такие показатели как ГГЦ, процентное содержание Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов и их соотношение, содержание цитокинов, иммунных комплексов, маркеров апоптоза и некроза кардиомиоцитов, уровень аутоантител к тромбину (табл. 39).

Таблица 39

Факторное отображение у интактных животных

Исходные переменные	Факторы				
	1	2	3	4	5
Число лимфоцитов, %	0,553665	0,400434	0,311734	-0,336453	0,41647
Число лимфоцитов, абс.	0,16473	0,840945	-0,279258	0,133941	-0,305185
Уровень Т-лимфоцитов, %	0,134884	0,233758	0,562833	-0,619707	0,399656
Уровень Т-лимфоцитов, абс.	0,217507	0,883956	0,087728	-0,260911	-0,007864
Уровень Т-хелперов, %	-0,908831	0,089495	-0,1251	-0,229538	-0,176503
Уровень Т-хелперов, абс.	-0,021181	0,891064	-0,004488	-0,291227	-0,223173
Число цитотоксических лимфоцитов, %	0,856311	0,024792	0,333451	0,175119	0,265521

Исходные переменные	Факторы				
	1	2	3	4	5
Число цитотоксических лимфоцитов, абс.	0,396951	0,838137	0,119618	-0,203378	-0,07632
Соотношение Т-хелперов к Т-цитотоксическим	-0,952776	0,0217	-0,16656	-0,153477	-0,152853
Уровень В-лимфоцитов, %	0,123422	0,196581	-0,590039	-0,051164	0,530652
Уровень В-лимфоцитов, абс.	-0,005221	0,622147	-0,599215	0,325832	0,124376
Число НК, %	-0,181689	0,233482	-0,594183	-0,012063	0,53706
Число НК, абс	-0,070591	0,578078	-0,589886	0,381379	0,035959
Концентрация гомоцистеина, мкмоль/л	-0,987956	0,008895	0,066617	0,035866	0,075305
IL 1 α , пг/мл	-0,97878	0,102041	0,089762	0,058675	0,073171
MCP 1, пг/мл	-0,987946	0,080913	-0,028795	-0,044834	-0,026685
IL 17 α , пг/мл	-0,979389	0,065609	0,1353	0,026406	0,111289
TNF α , пг/мл	-0,950492	0,05196	0,151686	0,148997	0,157397
INF, ед/мл	-0,957326	0,084262	0,133556	0,143615	0,107212
IL 4, пг/мл	-0,786063	-0,049732	0,337076	0,196511	0,015808
СРБ, мг/л	-0,839096	0,164118	0,215223	0,306498	0,129252
Концентрация эндотелина, фмоль/мл	-0,961594	0,103965	0,064645	0,090723	0,136348
Уровень нитратов, мкмоль/л	-0,789147	-0,013641	0,331076	0,270558	0,036232
Уровень нитритов, мкмоль/л	-0,963703	-0,02654	0,101359	-0,047693	0,161993
Содержание HNP1-3, пг/мл	-0,959526	0,12484	-0,105377	-0,074964	-0,149835
Концентрация LL-37, нг/мл	-0,986159	0,055929	-0,055095	-0,042418	0,035548
Величина церрулоплазмина, мг/дл	-0,963653	0,060825	-0,082486	-0,140085	-0,129211
Показатель аутоантител к тромбину, ед. опт. плотности	-0,95541	0,039023	-0,116956	-0,175417	-0,074546
Диаметр кардиомиоцита, мкм	0,279565	0,154382	0,414722	0,527793	0,106045
Число одноядерных кардиомиоцитов, абс.	0,211822	0,411399	0,311278	0,143296	0,153175
Число многоядерных кардиомиоцитов, абс.	-0,100132	-0,578925	-0,438715	-0,411517	0,020085
Соотношение одноядерных кардиомиоцитов к многоядерным	0,086681	0,591307	0,541129	0,054235	-0,23615
Величина кардиомиоцитов, окрашенных PI, %	-0,959546	0,076481	-0,102806	-0,129259	-0,108284

Исходные переменные	Факторы				
	1	2	3	4	5
Величина кардиомиоцитов, окрашенных AV5, %	-0,968682	0,045297	-0,037935	-0,08316	-0,007331
Величина кардиомиоцитов, окрашенных AV5+PI, %	-0,992412	0,033437	0,037007	-0,010027	0,010388
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 3,5% ПЭГ	-0,969968	-0,027959	0,135787	-0,011481	0,146476
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 7,0% ПЭГ	-0,982383	0,078761	0,003528	-0,063197	0,043342
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 10,0% ПЭГ	-0,981329	-0,022736	0,095224	0,00089	0,048503

После однократного введения высокой дозы гомоцистеина в 1 фактор включается уровень В-лимфоцитов, что свидетельствует о реагировании иммунной системы на избыток Hcy путем активации синтеза иммуноглобулинов против модифицированных гомоцистеином белковых структур организма (табл. 40.)

Таблица 40

Факторное отображение показателей у животных при однократном введении гомоцистеина

Исходные переменные	Факторы				
	1	2	3	4	5
Число лимфоцитов, %	-0,4936	-0,39069	-0,22305	-0,083	0,058855
Число лимфоцитов, абс.	-0,98893	-0,04747	-0,02144	-0,01349	0,074557
Уровень Т-лимфоцитов, %	-0,16257	-0,59715	0,061058	0,369581	-0,43922
Уровень Т-лимфоцитов, абс.	-0,96312	-0,22306	-0,02047	0,044881	0,007985
Уровень Т-хелперов, %	0,213648	0,890308	-0,02064	0,298696	0,151976
Уровень Т-хелперов, абс.	-0,91704	0,137491	-0,03744	0,211534	0,047255
Число цитотоксических лимфоцитов, %	-0,15521	-0,92579	0,074472	-0,25079	-0,11356
Число цитотоксических лимфоцитов, абс.	-0,78554	-0,44254	0,103075	-0,04785	-0,13971

Исходные переменные	Факторы				
	1	2	3	4	5
Соотношение Т-хелперов к Т-цитотоксическим	0,176263	0,903684	0,004737	0,299768	0,156747
Уровень В-лимфоцитов, %	-0,59459	0,345467	-0,36162	-0,22814	-0,27204
Уровень В-лимфоцитов, абс.	-0,75832	0,375809	-0,21469	-0,18228	-0,27314
Число NK, %	0,340314	-0,21275	-0,16938	-0,61996	0,511352
Число NK, абс	0,215745	0,106572	0,02909	-0,57201	0,512949
Концентрация гомоцистеина, мкмоль/л	-0,9556	0,025439	0,105631	0,002667	0,061324
IL 1 α , пг/мл	-0,55313	0,15417	-0,52194	-0,25103	-0,3135
MCP 1, пг/мл	-0,97952	-0,02785	0,030774	-0,05951	0,032574
IL 17 α , пг/мл	-0,95705	0,101334	0,05036	0,105965	0,088085
TNF α , пг/мл	-0,98568	-0,04863	0,06371	0,028558	0,032051
INF, ед/мл	-0,94319	0,123934	0,012325	0,088488	0,113144
IL 4, пг/мл	-0,92839	0,10285	0,048663	0,028667	0,08082
СРБ, мг/л	-0,97936	0,033609	-0,01418	0,056795	0,122133
Концентрация эндотелина, фмоль/мл	-0,97283	0,011233	0,04379	0,01833	0,09369
Уровень нитратов, мкмоль/л	-0,99182	-0,03367	-0,03726	0,004276	0,081829
Уровень нитритов, мкмоль/л	-0,60144	0,102036	-0,25063	-0,44674	-0,40076
Содержание HNP1-3, пг/мл	-0,96184	-0,05914	-0,05069	-0,03869	0,063562
Концентрация LL-37, нг/мл	-0,99206	-0,02581	0,046042	-0,0459	0,012644
Величина церулоплазмينا, мг/дл	-0,98629	0,021126	0,007901	0,046625	0,110714
Показатель аутоантител к тромбину, ед. опт. плотности	-0,4936	-0,39069	-0,22305	-0,083	0,058855
Диаметр кардиомиоцита, мкм	0,290164	-0,38653	-0,35418	0,472782	0,192996
Число одноядерных кардиомиоцитов, абс.	0,165773	0,054486	-0,65788	-0,19174	0,362646
Число многоядерных кардиомиоцитов, абс.	-0,0575	0,242967	0,824999	-0,30886	-0,09733
Соотношение одноядерных кардиомиоцитов к многоядерным	0,042151	-0,23677	-0,69409	0,363092	0,088204
Величина кардиомиоцитов, окрашенных PI, %	-0,96659	0,078534	0,082943	0,064694	0,063248
Величина кардиомиоцитов, окрашенных AV5, %	-0,97651	-0,01903	0,081463	0,079992	0,117274

Исходные переменные	Факторы				
	1	2	3	4	5
Величина кардиомиоцитов, окрашенных AV5+PI, %	-0,97967	-0,04128	0,081018	0,044437	0,1457
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 3,5% ПЭГ	-0,96811	0,060452	0,082281	0,093685	0,137314
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 7,0% ПЭГ	-0,969	-0,07332	0,0127	-0,01354	0,087582
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 10,0% ПЭГ	-0,98219	-0,02226	0,035292	0,063039	0,112926

При субхроническом же введении высоких доз Нсу, к первому фактору присоединяются еще и морфологические изменения в кардиомиоцитах (рис. 18 и табл. 41), что свидетельствует о повреждающем действии ГГЦ на миокард.

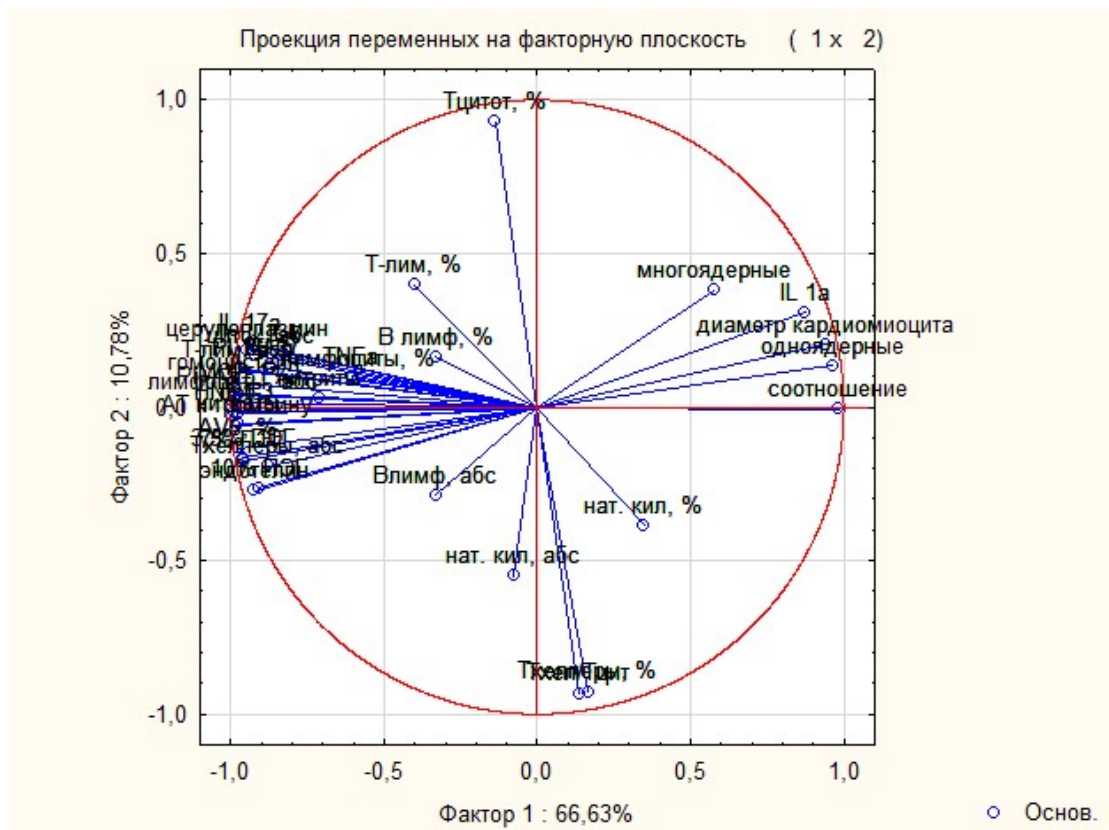


Рисунок 18. Проекция переменных животных при субхроническом введении гомоцистени на факторную плоскость.

**Факторное отображение показателей у животных при субхроническом
введении гомоцистеина**

Исходные переменные	Факторы				
	1	2	3	4	5
Число лимфоцитов, %	-0,58064	0,092237	0,256418	0,517095	-0,02106
Число лимфоцитов, абс.	-0,99032	0,015532	-0,05118	-0,00954	-0,07124
Уровень Т-лимфоцитов, %	-0,39991	0,398178	-0,06826	0,635477	-0,12173
Уровень Т-лимфоцитов, абс.	-0,97425	0,119904	-0,0425	0,1206	-0,05629
Уровень Т-хелперов, %	0,166942	-0,92617	-0,02307	-0,01365	0,079132
Уровень Т-хелперов, абс.	-0,87556	-0,19157	-0,25383	0,104416	-0,13677
Число цитотоксических лимфоцитов, %	-0,13727	0,928627	0,062584	-0,03536	-0,01296
Число цитотоксических лимфоцитов, абс.	-0,92074	0,168587	-0,12034	0,034763	-0,09076
Соотношение Т-хелперов к Т-цитотоксическим	0,136757	-0,93184	-0,03882	0,069397	0,075776
Уровень В-лимфоцитов, %	-0,33161	0,162629	0,421695	0,353439	0,653301
Уровень В-лимфоцитов, абс.	-0,32967	-0,28819	0,733646	0,026139	0,329257
Число НК, %	0,348812	-0,38389	0,55372	0,412237	-0,27226
Число НК, абс	-0,07511	-0,54984	0,684167	0,103042	-0,35646
Концентрация гомоцистеина, мкмоль/л	-0,98496	0,080127	0,072901	-0,07668	-0,00024
IL 1 α , пг/мл	0,873663	0,30644	0,260495	-0,08722	-0,03352
MCP 1, пг/мл	-0,98751	0,045961	-0,04247	0,024283	0,012802
IL 17 α , пг/мл	-0,93478	0,206765	0,163703	-0,05702	-0,02343
TNF α , пг/мл	-0,60576	0,099739	0,603103	-0,37869	-0,0834
INF, ед/мл	-0,87172	0,128438	0,376572	-0,23493	-0,0525
IL 4, пг/мл	-0,82382	0,173707	0,442441	-0,25703	-0,04741
СРБ, мг/л	-0,97684	-0,0195	-0,03019	-0,03976	-0,02192
Концентрация эндотелина, фмоль/мл	-0,92242	-0,27246	-0,07924	0,036191	-0,0236
Уровень нитратов, мкмоль/л	-0,97498	-0,05321	-0,0967	0,053966	0,045559
Уровень нитритов, мкмоль/л	-0,70952	0,030139	-0,03298	0,096884	-0,34407
Содержание HNP1-3, пг/мл	-0,98983	-0,0148	-0,07843	0,058634	0,058627
Концентрация LL-37, нг/мл	-0,86338	0,127387	0,371119	-0,24556	-0,06524
Величина церулоплазмينا, мг/дл	-0,94489	0,188382	-0,02828	0,017375	0,040839
Показатель аутоантител к тромбину, ед. опт. плотности	-0,97987	-0,06003	-0,14653	0,004181	0,020986

Исходные переменные	Факторы				
	1	2	3	4	5
Диаметр кардиомиоцита, мкм	0,941617	0,202507	0,192008	-0,05584	0,010691
Число одноядерных кардиомиоцитов, абс.	0,964061	0,134799	0,175878	-0,03301	-0,05272
Число многоядерных кардиомиоцитов, абс.	0,577163	0,379876	0,240187	0,414087	-0,09771
Соотношение одноядерных кардиомиоцитов к многоядерным	0,981919	-0,00712	-0,03755	-0,04054	0,000648
Величина кардиомиоцитов, окрашенных PI, %	-0,96946	0,126244	-0,04735	0,02419	0,031605
Величина кардиомиоцитов, окрашенных AV5, %	-0,97518	-0,1345	-0,11497	-0,00644	0,003439
Величина кардиомиоцитов, окрашенных AV5+PI, %	-0,98636	0,035553	-0,00343	0,047533	0,078545
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 3,5% ПЭГ	-0,95972	-0,16613	-0,11691	0,032688	0,021723
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 7,0% ПЭГ	-0,95871	-0,17379	0,05294	-0,13244	0,034314
Содержание иммунных комплексов, осаждаемых 10,0% ПЭГ	-0,90764	-0,26428	-0,15956	0,08253	0,063267

При этом, показатели гуморального звена иммунной системы уходят из первой компоненты, что свидетельствует в пользу большей активации клеточного звена иммунной системы.

Формирование дисфункции эндотелия на фоне ГГЦ является наиболее очевидным фактом для большинства исследователей [37, 71, 99, 157, 159].

Однако, проведенный анализ факторов, при моделировании экзогенной гипергомоцистеинемии *in vivo*, позволяет выделить у экспериментальных животных, кроме этого наличие еще следующих синдромов: цитолитического, системной воспалительной реакции, коагулопатического, иммунопатологического. Они, казалось бы, являясь латентными факторами,

определяют своеобразие функционального состояния организма животного в реальный момент времени.

Кроме этого, результаты метода главных компонент показали, что тесная взаимосвязь между уровнем гомоцистеина и величинами главных компонент позволяет выделить, вышеназванные синдромы, не используя процедуру измерения таких показателей как процентное содержание Т-хелперов, цитотоксических лимфоцитов, интерлейкинов 1α , 17α , 4, моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1, фактора некроза опухоли α , интерферона γ , СРБ, эндотелина, концентрацию нитратов и нитритов, α дефензимов, кателицидинов, церулоплазмينا, антитела к тромбину, маркеры апоптоза и некроза, содержание циркулирующих иммунных комплексов.

3.3 Ответ организма на модификацию аминотиолами белковых структур организма

Показано, что Hcy образует химические связи с белками организма, что вызывает их модификации и превращение в неоантигены, способные индуцировать иммунный ответ организма. Имеются данные, что ГГЦ индуцирует появление аутоантител [55, 62, 286].

Нами получен комплекс сывороточного альбумина с Hcy. Подтверждением этого является содержание Hcy в фильтрате 120 нг/мкл, при исходном уровне Hcy в образце 189,3 нг/мкл (рис. 19) [65]. Следовательно, около 40% Hcy (74,3 нг/мкл – уровень Hcy после фильтрации и десорбции с фильтра) в нашем эксперименте образовало конъюгаты с альбумином, что в свою очередь, вызывает его модификацию. По данным Блашко Э.Л. в условиях *in vivo* такую связь образует примерно 70% Hcy [16].

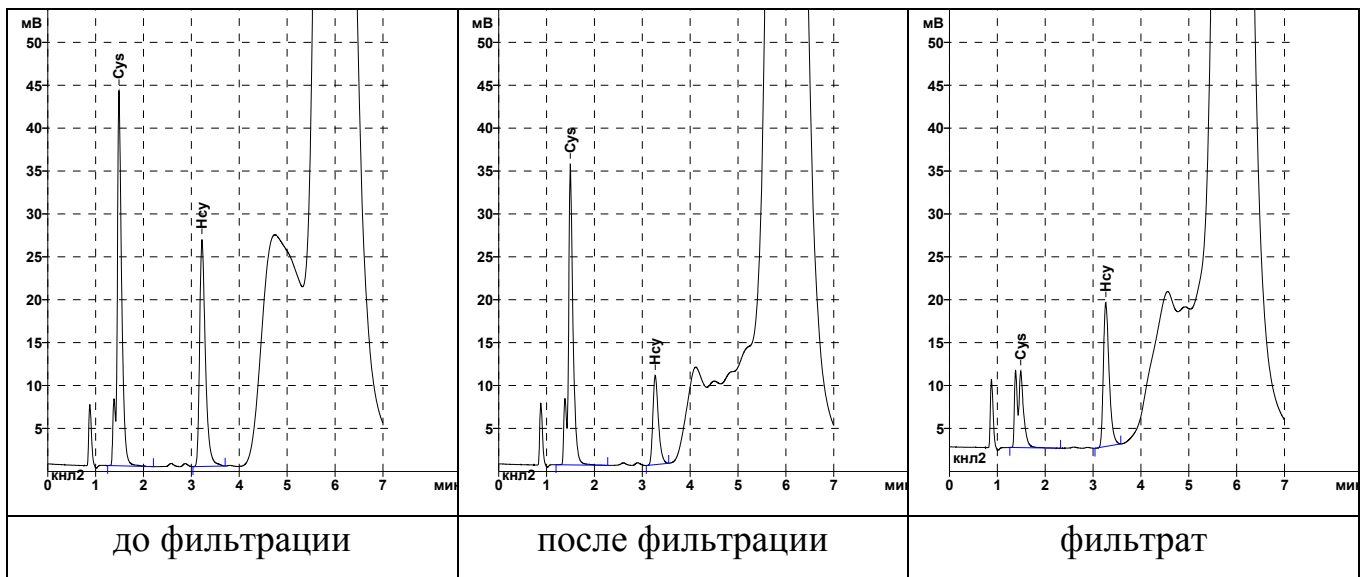


Рисунок 19. Хроматограммы исследованных образцов (Hcy – пик, отражающий концентрацию гомоцистеина)

Таким образом, мы подтвердили возможность образования конъюгатов Hcy с сывороточным альбумином человека *in vitro* [105].

На следующем этапе мы изучали уровень аутоантител к альбумину, модифицированному Hcy и Hcy-T как в эксперименте (у 20 интактных и 20 крыс,

с гуморальным иммунодефицитом), так и в сыворотке крови человека (здоровые и больные ИБС).

В реакции пассивной гемагглютинации с сенсibilизированными красными кровяными тельцами нативным сывороточным альбумином крысы и несенсibilизированными эритроцитами, нами получен отрицательный результат.

Причем, у интактных крыс до нагрузки Нсу и Нсу-Т были обнаружены аутоантитела к альбумину, модифицированному Нсу. Через 6 часов после введения аминотиолов титр аутоантител класса IgG повысился в 8 раз, а титр всех классов Ig увеличился более выражено: в 24 раза после введения Нсу и в 32 раза после нагрузки животных Нсу-Т (табл. 42).

На фоне введения в течение девяти дней Нсу титр аутоантител всех классов оставался столь же высоким, в то время как нагрузка Нсу-Т приводила к резкому падению концентрации аутоантител до уровня контроля.

Титр аутоантител к комплексу альбумина с Нсу-Т у интактных животных был таким же, как и к комплексу альбумина и Нсу, но при этом, динамика его на фоне введения тиолов отсутствовала (табл. 43).

Данный факт, вероятно, можно объяснить быстрой трансформацией Нсу-Т в организме животного в Нсу, вызывающего модификацию белков [289]. У иммунодефицитных животных прослеживалась эта же тенденция, но с гораздо меньшей степенью выраженности.

Иммунодефицит у экспериментальных животных моделировали введением 2 раза в неделю на протяжении 14 дней внутрибрюшинно циклофосфана в дозе 100 мг/м², подтверждая показателями иммунограммы (табл. 32). Уровень аутоантител у животных с индуцированным иммунодефицитом и интактных до введения экзогенных тиолов не имел статистических различий. Нагрузка тиолами вызвала увеличение титра аутоантител к альбумину, модифицированному гомоцистеином, примерно в 2 раза и не изменилась при введении Нсу-Т (табл. 44 и 45).

При оценке уровня аутоантител к модифицированному альбумину в сыворотке крови здоровых и больных различными формами ИБС, выявлено, что

максимальный титр IgG против модифицированного Hcy альбумина наблюдается у больных стабильной стенокардией и острым коронарным синдромом без подъема сегмента ST (табл. 46).

Титр аутоантител интактных животных к комплексу альбумина с гомоцистеином (Ме (25-й; 75-й))

До нагрузки (N=20)		Спустя 6 ч после введения				По прошествии 9 дней введения			
		Нсу (N=10)		Нсу -Т (N=10)		Нсу (N=10)		Нсу -Т (N=10)	
IgG	Все классы IG	IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig
1:30 (0; 1:30)	1:60 (1:15; 1:60)	1:480 (1:480; 1:480) $p_1=0,01$	1:720 (1:480; 1:960) $p_1=0,001$	1:480 (1:480; 1:480) $p_1=0,01$	1:960 (1:960; 1:960) $p_1=0,001$	1:480 (1:480; 1:960) $p_1=0,01$	1:960 (1:480; 1:960) $p_1=0,005$	0 (0; 0)	1:480 (1:60; 1:960)

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с титром до нагрузки.

Титр аутоантител интактных животных к комплексу альбумина с гомоцистеин-тиолактоном (Ме (25-й; 75-й))

До нагрузки (N=20)		Спустя 6 ч после введения				По прошествии 9 дней введения			
		Нсу (N=10)		Нсу -Т (N=10)		Нсу (N=10)		Нсу -Т (N=10)	
IgG	Все классы IG	IgG	Все классы IG	IgG	Все классы IG	IgG	Все классы IG	IgG	Все классы IG
1:45 (0; 1:300)	1:60 (1:45;1:480)	1:30 (0; 1:30)	1:60 (0; 1:60)	0 (0; 0)	1:30 (0; 1:60)	1:30 (1:30;1:30)	1:60 (1:60;1:60)	1:30 (1:30;1:30)	1:60 (1:60;1:960)

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с титром до нагрузки.

Титр аутоантител животных с индуцированным ИДС к комплексу альбумина с Нсу, (Ме (25-й; 75-й))

До нагрузки (N=20)		Спустя 6 ч после введения				По прошествии 9 дней введения			
		Нсу (N=10)		Нсу -Т (N=10)		Нсу (N=10)		Нсу -Т (N=10)	
IgG	Все классы IG	IgG	Все классы IG	IgG	Все классы IG	IgG	Все классы IG	IgG	Все классы IG
0	1:30	1:30	1:60	1:30	1:60	1:15	1:30	0	1:60
(0; 0)	(1:30;1:60)	(1:30;1:30)	(1:60;1:60)	(1:30;1:30)	(1:60;1:60)	(0; 1:30)	(0; 1:60)	(0; 1:30)	(0; 1:60)
		p ₁ =0,04	p ₁ =0,04	p ₁ =0,04	p ₁ =0,04	p ₁ =0,001	p ₁ =0,001		p ₁ =0,03

Примечание: p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению с титром у интактных крыс.

Титр аутоантител животных с индуцированным ИДС к комплексу альбумина с Нсу-Т (Ме (25-й; 75-й))

До нагрузки (N=20)		Спустя 6 ч после введения				По прошествии 9 дней введения			
		Нсу (N=10)		Нсу -Т (N=10)		Нсу (N=10)		Нсу -Т (N=10)	
IgG	Все классы IG	IgG	Все классы IG	IgG	Все классы IG	IgG	Все классы IG	IgG	Все классы IG
0	1:30	0	1:60	0	1:30	1:15	1:60	1:30	1:60
(0; 1:15)	(1:30;1:60)	(0; 0)	(1:30;1:60)	(0; 0)	(1:30;1:60)	(0; 1:30)	(0; 1:60)	(0; 1:30)	(0; 1:60)
		p ₁ =0,04							

Примечание: p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению с титром до нагрузки.

**Содержание аутоантител к комплексу гомоцистеин-альбумин
(ед. оп. пл.) (Ме (25-й; 75-й))**

Группа	Аутоантитела класса IgG к модифицированному альбумину в сыворотке
Группа контроля (n=46)	0,026 (0,010; 0,038)
Стабильная стенокардия (n=28)	0,075 (0,000; 0,076) $p_1=0,003$
Острый коронарный синдром (n=20)	0,066 (0,039; 0,111) $p_1=0,004$
Острый инфаркт миокарда (n=20)	0,043 (0,026; 0,049)

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями в группе контроля

Полученные данные свидетельствуют, во-первых, об изменении антигенной структуры белковых молекул избыточным содержанием Нсу, во-вторых – об активном включении иммунной системы в механизмы элиминации модифицированных соединений и тем самым регуляции концентрации Нсу в организме [10, 105, 120].

3.4. Влияние различных концентраций аминотиолов на клетки человека *in vitro*

3.4.1. Ответ лейкоцитов на высокие дозы аминотиолов

Для изучения изменения фенотипа и функциональной активности лейкоцитов кровь относительно здоровых добровольцев и больных ишемической болезнью сердца (стабильная стенокардия 2 функционального класса) инкубировали с Нсу в конечной концентрации 50 мкмоль/л и Нсу-Т в концентрации 50 нмоль/л при температуре 37⁰С в течение 4 часов, после чего определяли фенотип клеток. Контролем служил образец крови с внесенным в него физиологическим раствором.

Общее количество лейкоцитов, моноцитов и нейтрофилов не имело значимых различий в исследуемых группах. Было зафиксировано лишь увеличение содержания лимфоцитов в образцах периферической крови больных ИБС, за счет увеличения числа всех субпопуляций лимфоцитов. Максимальный сдвиг зарегистрирован со стороны Т-НК (табл. 47).

Одним из показателей функциональной активности клеток является экспрессия ими молекул адгезии.

Уровни ICAM-1 и р-селектина определялись нами в культуральной среде. Зарегистрированно увеличение концентраций изучаемых веществ в образцах культуры клеток доноров и больных ИБС как под воздействием Нсу, так и Нсу-Т. Причем, содержание ICAM-1 была изначально выше в культуре клеток больных ИБС практически в 2 раза ($p=0,001$) и возрастала во всех изучаемых группах примерно в 4 раза после инкубации с тиолами. Количество р-селектина в группе больных ИБС было изначально выше по сравнению с донорами (в 2,4 раза ($p=0,002$)). При внесении в культуру клеток периферической крови Нсу и Нсу-Т содержание р-селектина увеличивалось (табл. 48). Причем в культуральной

жидкости клеток крови больных ИБС концентрация ICAM-1 и р-селектина была значительно выше, нежели, чем в культуре клеток здоровых доноров.

Общее содержание лейкоцитов и их подвидов в исследуемых краткосрочных культурах, (Me (25%; 75%))

Показатели	Образцы крови условно здоровых добровольцев			Образцы крови больных ИБС		
	Контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т	контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т
содержание лейкоцитов, абс. в 1 мкл.	1742,5 (1450,0; 2035,0)	1996,5 (1306,0; 2687,0)	2007,0 (1222,0; 2792,0)	2296,0 (2200,0; 2392,0)	2250,5 (2088,0; 2413,0)	2313,0 (2164,0; 2462,0)
содержание лимфоцитов, абс. в 1 мкл.	473,5 (467,0; 480,0)	477,0 (432,0; 522,0)	486,0 (451,0; 521,0)	963,5 (894,0; 1033,0) $p_4=0,001$	984,0 (910,0; 1058,0) $p_4=0,001$	972,0 (863,0; 1081,0) $p_4=0,001$
содержание моноцитов, абс. в 1 мкл.	15,5 (14,0; 17,0)	21,5 (15,0; 28,0) $p_1=0,01$	21,5 (12,0; 31,0) $p_1=0,01$	19,0 (11,0; 27,0)	23,0 (21,0; 25,0)	23,5 (23,0; 24,0)
содержание нейтрофилов, абс. в 1 мкл.	1151,5 (835,0; 1468,0)	1379,5 (777,0; 1982,0)	1374,5 (657,0; 2092,0)	1135,5 (1066,0; 1205,0)	1078,0 (958,0; 1198,0)	1159,0 (1108,0; 1210,0)

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p_2 – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона, p_3 – уровень статистической значимости различий по сравнению с условно здоровыми добровольцами и больными ИБС.

**Молекулы адгезии лейкоцитов в культуральной среде клеток периферической крови человека,
(Me (25%; 75%))**

Показатели	Образцы крови условно здоровых добровольцев			Образцы крови больных ИБС		
	Контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т	контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т
ICAM-1 ng/ ml	13,78 (9,11; 13,78)	56,84 (44,68; 68,99) $p_1=0,016$	56,96 (52,74; 61,18) $p_1=0,016$	26,33 (20,33; 26,33) $p_3=0,001$	130,15 (114,10;146,20) $p_1=0,003$ $p_3=0,001$	101,25 (86,71; 115,8) $p_1=0,004$ $p_3=0,001$
p-селектин ng/ ml	2,07 (1,94; 2,47)	13,67 (11,14; 21,36) $p_1=0,002$	19,34 (11,98; 25,42) $p_1=0,002$ $p_2=0,04$	4,91 (4,22; 5,48) $p_3=0,02$	15,25 (14,26; 19,62) $p_1=0,002$ $p_3=0,001$	19,85 (16,02; 24,21) $p_1=0,002$ $p_2=0,04$ $p_3=0,001$

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p_2 – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона, p_3 – уровень статистической значимости различий по сравнению с условно здоровыми добровольцами и больными ИБС.

Молекулы адгезии обуславливают взаимодействие между клетками. Одним из проявлений этого процесса является образование лейкоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов. У больных ИБС обнаружено большее число адгезированных клеток. Введение аминотиолов вызывало однонаправленные сдвиги, как в культурах клеток здоровых доноров, так и лиц, страдающих атеросклерозом – возрастала число агрегатов, в большей степени в культурах с введением в нее гомоцистеина (табл. 49).

Таблица 49

Число лейкоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов, образованных при внесении в культуру клеток периферической крови аминотиолов, (Me (25%; 75%))

Показатели	Число лейкоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов, абс. в 1 мкл культуры клеток
Здоровые доноры	
Контроль инкубации	159,44 (113,00; 203,00)
С добавлением гомоцистеина	261,00 (130,00; 277,00) p=0,03
С добавлением гомоцистеин-тиолактона	286,50 (276,00; 308,00) p<0,001
С добавлением глутамата	136,00 (127,00; 252,00) p ₂ <0,001
Больные ИБС	
Контроль инкубации	213,00 (204,00; 232,00)
С добавлением гомоцистеина	1646,00 (1413,00; 1776,00) p<0,001
С добавлением гомоцистеин-тиолактона	918,00 (900,00; 960,00)- p<0,001 p ₁ <0,001
С добавлением глутамата	469,00 (333,00; 661,00) p<0,001 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем инкубации, p₁ – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина, p₂ – уровень статистической значимости различий образцов с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона.

Следующим фактором, характеризующим изменение функциональной активности клеток, можно считать экспрессию тканевого фактора (CD-142). В нашем исследовании, показано, что количество клеток больных ИБС, несущих на своей поверхности тканевой фактор было выше, чем у доноров в 1,9 раза ($p=0,0001$), что безусловно внесет свой вклад в развитие гиперкоагуляции у страдающих атеросклерозом.

Уровень тканевого активатора плазминогена также более выражено изменился в культуральной среде клеток больных ИБС. Так, в супернатанте культуры клеток доноров он увеличился на 23% ($p=0,04$) только под воздействием Нсу-Т, в то время как у больных ИБС на 55% как при влиянии Нсу, так и Нсу-Т ($p=0,005$ и $0,005$ соответственно). Напротив, концентрация ингибитора активатора плазминогена наиболее существенно увеличивалась в жидкой фазе культуры клеток доноров. На фоне всех этих изменений зафиксирована прокоагулянтная активность культуральной среды (табл. 50).

Таким образом, как Нсу так и Нсу-Т увеличивают экспрессию тканевого фактора, снижают активность системы фибринолиза, что приводит к состоянию гиперкоагуляции, более выраженной в супернатанте культуры клеток больных ИБС [60].

Еще одним маркером функциональной активности клеток является активация апоптического процесса в клетках. К наиболее важным регуляторам апоптоза относятся индукторы гибели клетки, в частности, поверхностный рецептор Fas (CD95, APO-1), его лиганд (CD 178) и белки семейства Bcl-2, ингибирующие апоптоз [6, 158]. Ранним маркером апоптоза является экспрессия APO 2.7 [40]. В последующем, на мембране клеток, появляются отрицательно заряженные фосфолипиды внутреннего слоя цитоплазматической мембраны (в частности, фосфатидилсерин) [158]. Для выявления этого события используется аннексин V (AV5) с различными флюорохромами [133].

Некоторые показатели системы гемостаза в исследуемых краткосрочных культурах (Ме (25%; 75%))

Показатели	Образцы крови условно здоровых добровольцев			Образцы крови больных ИБС		
	Контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т	контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т
ТРа (инкубация 24 часа), ng/ml	2,20 (1,90; 2,20)	2,20 (0,21; 0,24)	2,85 (2,58; 3,11) p ₁ =0,04 p ₂ =0,04	3,11 (2,26; 3,41) p ₃ =0,04	6,80 (5,76; 7,88) p ₁ =0,005 p ₃ =0,0001	6,92 (5,41; 8,42) p ₁ =0,005 p ₃ =0,0001
ТРа (инкубация 48 часов), ng/ml	3,72 (3,21; 3,72)	5,97 (5,62; 6,31) p ₁ =0,04	6,14 (5,28; 7,00) p ₁ =0,04	7,86 (7,17; 7,86) p ₃ =0,0001	9,68 (9,07; 10,28) p ₁ =0,04 p ₃ =0,0001	10,96 (8,03; 13,90) p ₁ =0,04 p ₁ =0,04 p ₃ =0,0001
РАI (инкубация 24 часа), ng/ml	22,26 (13,02; 22,26)	73,33 (66,06; 80,59) p ₁ =0,003	79,62 (67,87; 91,37) p ₁ =0,003	117,80 (117,80;139,20) p ₃ =0,002	128,30 (106,80;149,80) p ₃ =0,002	131,75 (129,30;134,20) p ₃ =0,002
РАI (инкубация 48 часов), ng/ml	74,89 (50,21; 74,89)	144,25 (139,80;148,70) p ₁ =0,003	114,76 (95,12; 134,40) p ₁ =0,003 p ₂ =0,04	174,00 (174,00;228,51) p ₃ =0,001	193,15 (170,10;216,20) p ₃ =0,001	194,90 (166,80;223,00) p ₃ =0,001
АЧТВ культуральной среды, сек	37,50 (35,00; 40,00)	31,50 (31,00; 33,00) p ₁ =0,002	32,50 (32,00; 33,00) p ₁ =0,002	31,00 (29,00; 33,00)	26,50 (26,00; 27,00) p ₁ =0,002	28,00 (25,00; 29,00)
Протромбиновое время, сек	15,00 (14,00; 16,00)	11,00 (10,00; 12,00) p ₁ =0,002	11,00 (10,00; 12,00) p ₁ =0,002	10,50 (10,00; 11,00)	9,00 (8,00; 9,00) p ₁ =0,005	9,00 (8,00; 9,00) p ₁ =0,005

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p_2 – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона, p_3 – уровень статистической значимости различий по сравнению с условно здоровыми добровольцами и больными ИБС.

Выявлено, что в крови больных ИБС уровень CD95+ позитивных лейкоцитов в 10,63 раза выше, чем у здоровых доноров, а содержание Ann V – позитивных клеток – в 108,0 раз ($p < 0,001$ и $p < 0,001$ соответственно) (табл. 48). При этом, в общей популяции лейкоцитов (CD45+) периферической крови здоровых экспрессия поверхностного рецептора Fas увеличивается под влиянием аминотиолов, а у больных ИБС – снижается. Максимальный ответ зарегистрирован при внесении в культуру клеток глутамата (в 2,88 раз ($p = 0,0014$) у здоровых и 1,35 ($p < 0,001$) – у больных ИБС). Однако, Hcy более выражено влиял на появление отрицательно заряженных фосфолипидов внутреннего слоя мембраны на поверхности лейкоцитов, нежели глутамат. Так, количество клеток с фосфатидилсерином на внешней мембране под воздействием Hcy возрастало в 165,3 раза ($p < 0,001$), а глутамата – в 16,3 раза ($p < 0,001$). Содержание Bcl-2 в пересчете на 1 клетку в большей степени увеличивалось при внесении NMDA – в 4,6 раз ($p < 0,001$), причем как в лейкоцитах здоровых, так и больных ИБС. Hcy вызывал снижение этого показателя на 36,76% только в белых кровяных тельцах доноров и не влиял на ингибирование процесса апоптоз у больных ИБС (табл. 51).

Таблица 51

Маркеры апоптоза в популяции лейкоцитов в образцах периферической крови здоровых добровольцев и больных стенокардией, %, (Me (25%; 75%))

Показатели	CD 45 Ann V	CD 45+ CD95+	Bcl-2/WBC, pg/cells
Здоровые доноры			
Контроль инкубации	0,015 (0,00; 0,03)	0,22 (0,03; 0,41)	0,68 (0,50; 0,68)
С добавлением гомоцистеина	2,48 (2,05; 4,13) $p < 0,001$	0,39 (0,22; 0,56) $p < 0,001$	0,43 (0,11; 0,75) $p = 0,0018$
С добавлением глутамата	0,245 (0,18; 0,31) $p < 0,001$ $p1 = 0,0005$	0,635 (0,31; 0,96) $p = 0,0014$ $p1 = 0,001$	3,13 (2,12; 4,13) $p < 0,001$ $p1 < 0,001$

Больные ИБС			
Показатели	CD 45 Ann V	CD 45+ CD95+	Bcl-2/WBC, pg/cells
Контроль инкубации	1,62 (1,09; 2,14)	2,34 (2,09; 2,58)	0,59 (0,32; 0,86)
С добавлением гомоцистеина	1,59 (0,73; 2,44) p=0,1	1,91 (1,78; 2,03) p=0,000002	0,51 (0,49; 0,53) p=0,2
С добавлением глутамата	0,9 (0,85; 0,95) p<0,001 p1=0,0038	1,73 (1,07; 2,39) p<0,001 p1=0,7	3,09 (1,41; 4,77) p=0,013 p1<0,001

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем инкубации, p₁ – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина.

В ряде исследований обнаружено, что мишенью действия Hcy могут быть глутаматные рецепторы, в частности, NMDA-рецепторы [18, 29, 56,]. Активация этих рецепторов поиводит к увеличению концентрации ионов кальция в цитоплазме и активации апоптоза. Наши данные свидетельствуют, что влияние аминотиолов на клетку, скорей всего, происходит не только за счет конкурентной активации рецепторов для глутамата, а и митохондриальным путем.

Таким образом, хотя число лейкоцитов не имело значимых отличий у здоровых добровольцев и людей, страдающих атеросклеротическим процессом, мы наблюдаем выраженное изменение функциональной активности белых кровяных телец, что свидетельствует о вовлеченности их в системный воспалительный процесс. Введение аминотиолов усугубляет сдвиги в изучаемых показателях, что в организме может вызвать как инициацию процесса воспаления, так и утяжеление течения его.

3.4.2. Ответ отдельных видов лейкоцитов на высокие концентрации аминотиолов

Роль отдельных типов белых кровяных телец в патогенезе и атеросклероза, и воспаления разная. Поэтому, на следующем этапе исследования нами проводилась оценка функциональной активности отдельных видов лейкоцитов при внесении в культуру клеток периферической крови аминотиолов.

3.4.2.1. Изменение фенотипа и функций лимфоцитов под воздействием высоких доз гомоцистеина в краткосрочной культуре клеток крови

При изучении субпопуляций лимфоцитов в культуре под воздействием высоких доз гомоцистеина и гомоцистеина-тиолактона количественные сдвиги наблюдались только в популяции Т-лимфоцитов. Так, в образцах крови условно здоровых добровольцев под воздействием ГГЦ наблюдалось снижение количества Т-лимфоцитов за счет фракции Т-хелперов. В пробах же больных ИБС, под воздействием ГГЦ, число Т-лимфоцитов не имело значимых различий по сравнению с контролем, но при этом содержание Т-хелперов снижалось так же, как в образцах крови условно здоровых добровольцев на 20%.

Уровень цитотоксических лимфоцитов при добавлении Нсу в культуру клеток условно здоровых добровольцев увеличивался на 50%, а при добавлении Нсу-Т – практически в 2 раза, в то время как, у больных ИБС эта фракция лимфоцитов увеличивалась на 70% как под воздействием Нсу, так и Нсу-Т (табл. 52). Уровень Т-НК возрастал под воздействием изучаемых аминотиолов только в образцах крови условно здоровых добровольцев.

Субпопуляции лимфоцитов в исследуемых краткосрочных культурах (Me (25%; 75%))

Показатели	Образцы крови условно здоровых добровольцев			Образцы крови больных ИБС		
	Контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т	контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т
Т лимфоциты (CD3+), абс. в 1 мкл.	366,5 (357,0; 375,0)	292,5 (217,0; 367,0) p ₁ =0,001	426,0 (422,0; 431,0) p ₂ =0,005	827,5 (614,0; 1041,0) p ₃ =0,0001	776,5 (594,0; 959,0) p ₃ =0,0001	784,0 (627,0; 941,0) p ₃ =0,0001
Т хелперы (CD3+, CD4+), абс. в 1 мкл.	210,0 (185,0; 229,0)	164,0 (123,0; 227,0) p ₁ =0,002	230,0 (211,0; 246,0) p ₁ =0,002 p ₂ =0,008	563,0 (465,0; 606,0) p ₃ =0,001	430,0 (346,0; 509,0) p ₁ =0,002 p ₃ =0,001	443,0 (372,0; 512,0) p ₁ =0,002 p ₂ =0,008 p ₃ =0,001
Т цитотоксические (CD3+, CD8+), абс. в 1 мкл.	79,0 (67,0; 91,0)	118,0 (106,0; 126,0) p ₁ =0,002	148,0 (138,0; 169,0) p ₁ =0,002 p ₂ =0,008	250,0 (214,0; 332,0) p ₃ =0,001	428,0 (320,0; 450,0) p ₃ =0,001	403,5 (309,0; 450,0) p ₂ =0,008 p ₃ =0,001
Т хелперы/Т цитотоксические	2,76 (2,31; 2,89)	1,38 (1,16; 1,8) p ₁ =0,002	1,66 (1,25; 1,68) p ₁ =0,002	2,17 (1,83; 2,25) p ₃ =0,048	1,08 (0,96; 1,19) p ₁ =0,002 p ₃ =0,048	1,21 (0,98; 1,27) p ₁ =0,002 p ₃ =0,048
В лимфоциты, (CD3-, CD45RA+), абс. в 1 мкл.	68,5 (47,0; 89,0)	67,5 (48,0; 87,0)	79,0 (51,0; 107,0)	110,5 (100,0; 120,0) p ₃ =0,001	104,0 (96,0; 112,0) p ₃ =0,001	102,5 (79,0; 126,0) p ₃ =0,001

Показатели	Образцы крови условно здоровых добровольцев			Образцы крови больных ИБС		
	Контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т	контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т
NK, (CD3-, CD56+, CD16+), абс. в 1 мкл.	7,5 (4,0;11,0)	7,5 (7,0; 8,0)	8,5 (5,0; 12,0)	13,0 (4,0; 22,0) $p_3=0,01$	24,5 (8,0; 41,0) $p_3=0,01$	24,5 (11,0; 38,0) $p_3=0,01$
T- NK, (CD3+ , CD56+, CD16+), абс. в 1 мкл.	1,5 (1,0; 2,0)	2,5 (2,0; 3,0) $p_1=0,05$	2,5 (1,0;4,0) $p_1=0,03$ $p_2=0,04$	34,0 (4,0; 64,0) $p_3=0,001$	37,5 (3,0; 72,0) $p_3=0,001$	25,5 (0,0; 51,0) $p_3=0,001$

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p_2 – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона, p_3 – уровень статистической значимости различий по сравнению с условно здоровыми добровольцами и больными ИБС.

При экспонировании на поверхности лимфоцита α -субъединицы рецептора IL-2, лимфоциты приобретают фенотип CD25+. Это является свидетельством IL-2-зависимой стадии ответа Т-лимфоцитов на патоген [162, 164]. В образцах крови больных ИБС количество CD25+ позитивных клеток существенно больше, чем в пробах условно здоровых добровольцев. При этом, ответ клеток, инкубированных с гомоцистеином и гомоцистеином-тиолактоном у здоровых и больных ИБС имеет разнонаправленные сдвиги. Так, под воздействием высоких доз Hcy в крови здоровых увеличивается число Т-хелперов и моноцитов, а Hcy-Т – В-лимфоцитов и макрофагов. В крови больных ИБС – возрастает только количество Т-хелперов при инкубации с Hcy. Практически в 2 раза снижается количество цитотоксических лимфоцитов под влияние как Hcy, так и Hcy-Т и не меняется содержание В-лимфоцитов и моноцитов (табл. 53).

Еще одним маркером, характеризующим регуляторную функцию лимфоцитов является α -цепь рецептора IL-7 (CD 127+). Показано, что клетки, несущие этот антиген, обладают высокой супрессивной активностью [164, 191]. Зарегистрированные сдвиги как в культуре клеток периферической крови относительно здоровых добровольцев, так и больных ИБС носили однонаправленный характер, причем как при внесении Hcy, так и Hcy-Т. Наблюдалось увеличение Т-хелперов, цитотоксических лимфоцитов и моноцитов CD 127+. Количественных сдвигов со стороны В-лимфоцитов в образцах здоровых добровольцев не обнаружено, в то время как в культуре клеток больных ИБС их количество увеличивалось почти в 2,5 раза (табл. 54).

Оценивая популяцию клеток, имеющую фенотип CD3+CD4+CD25+CD127-, нами получено, что в образцах крови условно здоровых добровольцев их число в среднем составляло 0,5% от всей популяции Т-хелперов, в крови больных страдающих ИБС – 0,95%.

CD-25 позитивные лимфоциты в исследуемых краткосрочных культурах (Me (25%; 75%))

Клетки, несущие на своей поверхности CD25+, %	Образцы крови условно здоровых добровольцев			Образцы крови больных ИБС		
	Контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Г	контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Г
Т-хелперы	1,15 (1,13; 1,17)	1,39 (0,90; 1,89) $p_1=0,01$	1,01 (0,76; 1,26) $p_2=0,005$	7,71 (4,07; 11,34) $p_3=0,0001$	9,01 (5,11; 12,91) $p_1=0,001$ $p_3=0,0001$	7,84 (6,12; 9,55) $p_3=0,0001$
Цитотоксические Т-лимфоциты	1,82 (0,33; 3,31)	1,65 (0,38; 2,92)	1,62 (1,21; 2,02)	11,09 (0,15; 22,02) $p_3=0,001$	5,89 (0,52; 11,26) $p_1=0,002$ $p_3=0,001$	6,18 (0,67; 11,68) $p_1=0,002$ $p_3=0,001$
В-лимфоциты	2,60 (0,76; 4,44)	2,61 (0,0; 5,21)	1,75 (0,37; 3,13) $p_1=0,02$ $p_2=0,04$	13,93 (1,21; 26,65) $p_3=0,001$	15,17 (0,0; 30,34) $p_3=0,001$	12,38 (2,03; 22,73) $p_3=0,001$

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p_2 – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона, p_3 – уровень статистической значимости различий по сравнению с условно здоровыми добровольцами и больными ИБС.

CD 127 позитивные лимфоциты в исследуемых краткосрочных культурах (Me (25%; 75%))

Клетки несущие на своей поверхности CD127, %	Образцы крови условно здоровых добровольцев			Образцы крови больных ИБС		
	Контроль	с добавлением HCY	с добавлением HCY -Г	контроль	с добавлением HCY	с добавлением HCY -Г
Т-хелперы	1,25 (1,13; 1,36)	2,44 (1,55; 3,32) $p_1=0,0001$	2,29 (2,14; 2,43) $p_1=0,0001$	2,58 (0,19; 4,97) $p_3=0,01$	7,03 (1,83; 12,23) $p_1=0,01$ $p_3=0,0001$	6,40 (4,55; 8,25) $p_1=0,01$ $p_3=0,0001$
Цитотоксические Т-лимфоциты	1,47 (0,61; 2,33)	3,69 (3,22; 4,17) $p_1=0,0001$	2,63 (1,21; 4,04) $p_1=0,02$	4,85 (4,03; 5,67) $p_3=0,001$	10,19 (9,41; 10,96) $p_1=0,002$ $p_3=0,001$	11,65 (7,73; 15,56) $p_1=0,002$ $p_3=0,001$
В-лимфоциты	0,21 (0,0; 0,42)	0,17 (0,0; 0,34)	0,37 (0,0; 0,74)	0,58 (0,0; 1,15) $p_3=0,01$	1,41 (0,0; 2,81) $p_1=0,02$ $p_3=0,001$	1,43 (0,58; 2,27) $p_1=0,02$ $p_3=0,001$

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p_2 – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона, p_3 – уровень статистической значимости различий по сравнению с условно здоровыми добровольцами и больными ИБС.

Внесение в культуру клеток Hcy, Hcy-T и NMDA вызвало однонаправленные сдвиги в сторону увеличения клеток с данными маркерами. Причем, ответ клеток доноров был более выраженным, чем больных ИБС. Так, число T-регуляторных, под влиянием Hcy возросло в 3 ($p=0,001$) и 1,8 ($p=0,01$) раз, Hcy-T – в 3,4 ($p=0,0004$) и в 1,1 ($p=0,049$), NMDA – в 2,8 ($p=0,001$) и 1,5 ($p=0,01$) раз соответственно.

Таким образом, под воздействием и Hcy, и Hcy-T изменяется фенотип лимфоцитов. Данный факт возможен как вследствие гибели части клеток (реализация токсического эффекта ГГЦ), так и модификации рецепторов клеток, что приведет к нарушению адгезии антитела к искомому антигену.

Изменение функциональной активности клеток, в частности, характеризует экспрессия молекул адгезии. Увеличение представительства CD162 на T-хелперах наблюдалось только в пробах крови условно здоровых добровольцев под воздействием Hcy в 3,3 раза ($p=0,003$), а Hcy-T – в 1,6 раза ($p=0,047$). В популяции цитотоксических лимфоцитов количество клеток, несущих лиганд p-селектина, увеличивалось на 30% только в образцах крови условно здоровых доноров с добавлением Hcy ($p=0,023$). Однако, в культуре клеток периферической крови больных ИБС этот маркер снижался на 23% ($p=0,002$) под влиянием Hcy-T (табл. 55).

Молекулы адгезии лимфоцитов в исследуемых краткосрочных культурах (Ме (25%; 75%))

Показатели	Образцы крови условно здоровых добровольцев			Образцы крови больных ИБС		
	Контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т	контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т
CD4+CD162+, %	1,37 (0,67; 2,06)	4,54 (2,43; 6,64) $p_1=0,003$	2,22 (1,84; 2,59) $p_1=0,047$	1,97 (1,08; 2,86)	1,31 (0,33; 2,29) $p_3=0,0001$	1,86 (0,76; 2,96)
CD4+CD62L+, %	74,55 (72,04; 77,06)	74,97 (74,52; 75,42)	73,87 (73,13; 74,61)	81,31 (74,36; 88,26)	81,62 (74,50; 88,74)	79,70 (73,35; 86,05)
CD8+CD162+, %	5,05 (2,29; 7,80)	6,71 (2,24; 11,18) $p_1=0,023$	3,88 (2,09; 5,67) $p_1=0,002$ $p_2=0,04$	1,82 (0,82; 2,81) $p_3=0,001$	1,25 (0,52; 1,97) $p_1=0,002$ $p_3=0,001$	0,98 (0,92; 1,04) $p_1=0,023$ $p_2=0,04$ $p_3=0,001$
CD8+CD62L+, %	58,39 (45,95; 70,82)	58,92 (47,35; 70,49)	54,92 (43,49; 66,35)	61,07 (39,56; 82,57)	61,41 (38,01; 84,84)	62,25 (37,71; 86,79)
CD19+CD162+, %	7,31 (6,76; 7,85)	8,57 (7,84; 9,30)	7,53 (6,98; 8,07)	13,02 (3,26; 22,78) $p_3=0,001$	12,53 (2,17; 22,88) $p_3=0,001$	13,11 (3,83; 22,39) $p_3=0,001$
CD19+CD62L+, %	67,93 (65,54; 70,31)	71,05 (70,59; 71,51)	66,52 (63,57; 69,47)	65,47 (60,65; 70,29)	71,58 (66,99; 76,17)	71,93 (67,19; 76,66)

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p_2 – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона, p_3 – уровень статистической значимости различий по сравнению с условно здоровыми добровольцами и больными ИБС.

Показано, что лимфоциты способны образовывать агрегаты с тромбоцитами (ЛТА) [79]. Причем, с кровяными пластинками коагрегаты образуют не все популяции Т-лимфоцитов, а только клетки, несущие маркеры CD4+ и CD16+ [28]. Клеточными поверхностными молекулами, обуславливающими феномен ЛТА, являются ICAM-1, α IIb/ β 3 и β 1-связанные интегрины, Р-селектин – PSGL и CD40 – CD40L [81]. Мы наблюдали снижение представительства молекул адгезии как на клетках лиц страдающих атеросклеротическим процессом, так и при внесении в культуру клеток аминотиолов.

Однако, оценка числа образованных в культуре клеток периферической крови ЛТА, показала, что у лиц, страдающих ИБС коагрегатов в 5,5 раз больше, чем у здоровых добровольцев и наблюдается их рост при введении в культуральную среду аминотиолов. Более выраженный при внесении гомоцистеина – в 1,4 раза у доноров ($p < 0,001$) и 3,9 раза у больных стабильной стенокардией ($p < 0,001$) (табл. 56).

Таблица 56

Число лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов, образованных при внесении в культуру клеток периферической крови аминотиолов, (Me (25%; 75%))

Показатели	Число лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов, абс. в 1 мкл культуры клеток
Здоровые доноры	
Контроль инкубации	23,00 (20,00; 44,00)
С добавлением гомоцистеина	52,00 (43,00; 60,00) $p < 0,001$
С добавлением гомоцистеин-тиолактона	33,00 (31,00; 36,00) $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$
С добавлением глутамата	30,00 (27,00; 40,00) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$

Больные ИБС	
Показатели	Число лимфоцитарно-тромбоцитарных коагратов, абс. в 1 мкл культуры клеток
Контроль инкубации	126,00 (122,00; 139,00)
С добавлением гомоцистеина	500,00 (450,00; 550,00) p<0,001
С добавлением гомоцистеин-тиолактона	393,50 (320,00; 420,00)- p<0,001 p1<0,001
С добавлением глутамата	87,50 (86,00; 179,00) p1<0,001 p2<0,001

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем инкубации, p₁ – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина, p₂ – уровень статистической значимости различий образцов с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона.

Биологический смысл образования ЛТА заключается в первую очередь в обеспечении механизма миграции лимфоцитов в поврежденные ткани для обеспечения специфической защиты тканей о патогена, во-вторых – позволяют расширить функции адгезированных тромбоцитов. В частности изменить трофику и репарацию тканей, путем секретии в окружающую среду факторов роста, запустить каскад свертывания крови.

Не вызывает сомнения тот факт, что выделение тканевого фактора, происходит наиболее интенсивно в месте разрушения тканей [184]. Известно, что лимфоциты не способны синтезировать TF, однако, благодаря феномену ЛТА, он появляется на поверхности лимфоцитов (табл. 57). Причем, если в культурах клеток крови доноров наблюдается рост числа CD 142 позитивных лимфоцитов в 3,8 раз (p=0,01) при внесении в культуру гомоцистеина, в 7,7 раз гомоцистеина-тиолактона (p<0,0001) и в 4,6 раз глутамата, то в культуре клеток больных ИБС – в 12,7 (p<0,0001), 11,2 (p<0,0001) и 11,7 (p<0,0001) соответственно.

Уровень лимфоцитов, несущих маркер CD 142, в культуре клеток периферической крови на фоне введения аминокислот (Me (25%; 75%))

Показатели	Число CD 142 позитивных лимфоцитов, абс. в 1 мкл культуры клеток
Здоровые доноры	
Контроль инкубации	0,12 (0,09; 0,48)
С добавлением гомоцистеина	0,46 (0,35; 0,60) p=0,01
С добавлением гомоцистеин-тиолактона	0,92 (0,76; 1,00) p<0,0001 p1<0,0001
С добавлением глутамата	0,55 (0,15; 0,75) p<0,0001 p1=0,01 p2=0,001
Больные ИБС	
Контроль инкубации	1,06 (0,91; 1,15)
С добавлением гомоцистеина	13,42 (11,60; 13,60) p<0,0001
С добавлением гомоцистеин-тиолактона	11,92 (10,85; 12,93) p<0,0001
С добавлением глутамата	12,35 (11,54; 13,82) p<0,0001

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем инкубации, p₁ – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина, p₂ – уровень статистической значимости различий образцов с образцами с добавлением гомоцистеин-тиолактона.

Экспрессия маркеров апоптоза различными субпопуляциями лимфоцитов в исследуемой и контрольной группах чаще всего имел однонаправленный характер, но с различной степенью выраженности.

Так, максимальная экспрессия маркеров апоптоза в популяции В-лимфоцитов здоровых наблюдалась под влиянием глутамата (рис. 20).

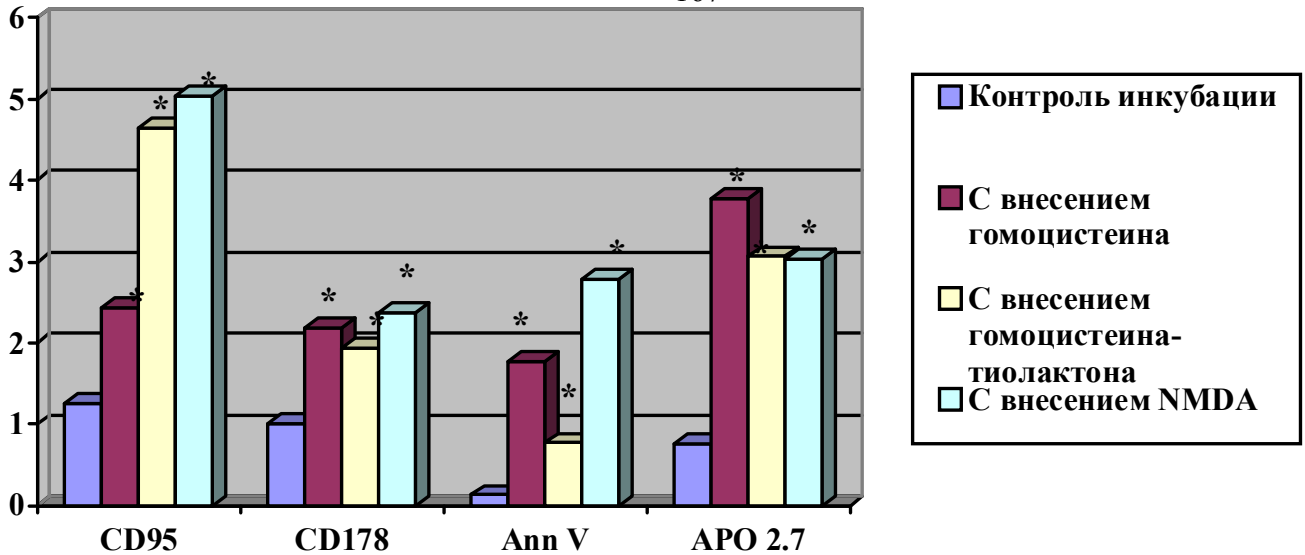


Рисунок 20. Экспрессия маркеров апоптоза В-лимфоцитами периферической крови здоровых доноров под влиянием аминотиолов и глутамата, %

Примечание: *– уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем инкубации.

*

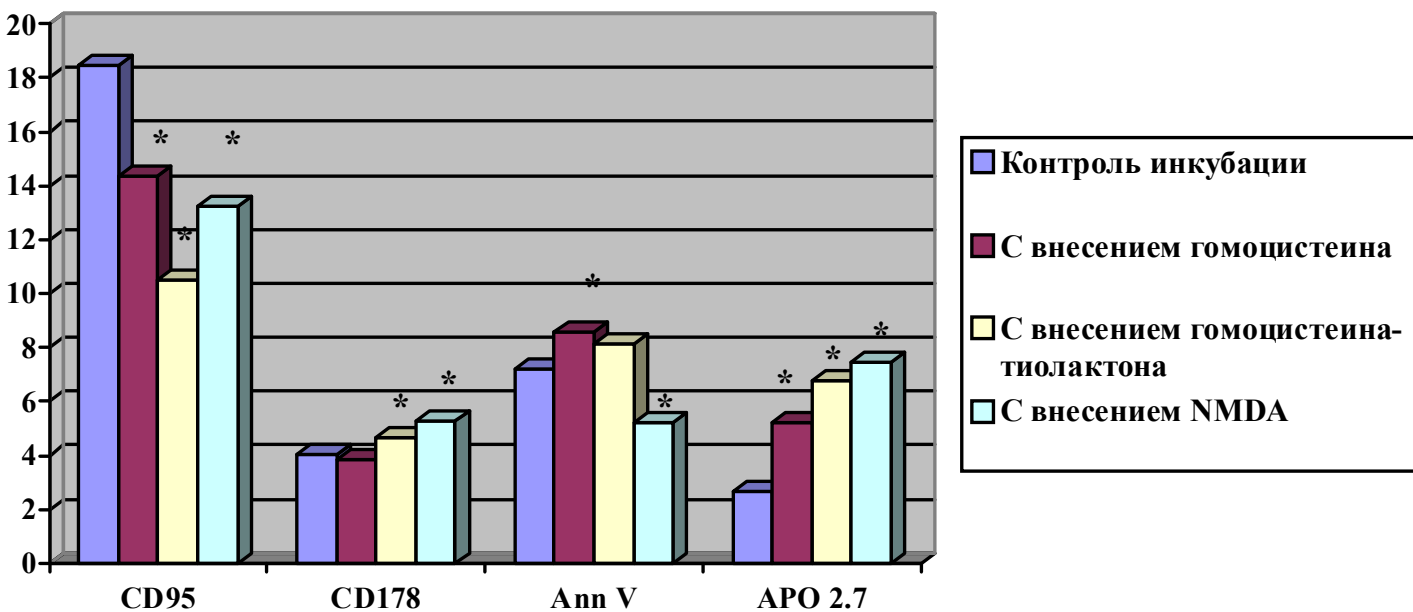


Рисунок 21. Экспрессия маркеров апоптоза В-лимфоцитами периферической крови больных ИБС под влиянием аминотиолов и глутамата, %

Примечание: *– уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем инкубации.

В-лимфоциты больных ИБС реагировали на внесение аминотиолов differently от доноров. Так количество CD95+ позитивных клеток не изменялось при внесении Hcy и снижалось на 42,95% при введении в культуру Hcy-T,

параллельно с этим увеличивалась экспрессия лиганда Fas-рецептора на 15,92% ($p=0,013$). При этом, фосфатедилсерин на наружной мембране клеток под влиянием аминотиолов не появлялся, но возросло количество клеток с АРО 2.7 (рис. 21).

В общей популяции Т-лимфоцитов как здоровых доноров, так и больных ИБС, зарегистрировано увеличение экспрессии Fas-рецептора под влиянием аминотиолов, причем в большей степени при внесении Нсу-Т (в 1,71 раз у здоровых ($p=0,00017$) и в 25,17 раз на фоне атеросклероза ($p=0,036$) и снижение этого показателя под воздействием глутамата на 10,1 % ($p=0,0014$) на клетках здоровых доноров. У больных ИБС наблюдался рост CD95+ позитивных Т-лимфоцитов (в 23,83 раза ($p=0,000001$)).

Рост экспрессии отрицательно заряженных фосфолипидов внутреннего слоя цитоплазматической мембраны был зарегистрирован под влиянием всех изучаемых веществ, примерно в одинаковой степени, как на поверхности мембран Т-лимфоцитов здоровых добровольцев, так и больных ИБС (табл. 58).

Таблица 58

Маркеры апоптоза в популяции Т-лимфоцитов в образцах периферической крови, %, (Ме (25%; 75%))

Показатели	CD 3 AV5	CD 3+ CD95
Здоровые доноры		
Контроль инкубации	0,06 (0,06; 0,07)	1,79 (1,27; 2,32)
С добавлением гомоцистеина	0,25 (0,23; 0,62) $p<0,001$	2,31 (1,55; 3,18) $p<0,001$
С добавлением гомоцистеин-тиолактона	0,31 (0,28; 0,47) $p<0,001$ $p1<0,001$	3,06 (1,25; 4,87) $p<0,001$ $p1=0,001$
С добавлением глутамата	0,36 (0,22; 0,45) $p<0,001$ $p1<0,001$ $p2=0,1$	1,61 (1,03; 2,18) $p=0,0014$ $p1=0,001$ $p2=0,1$

Показатели	CD 3 AV5	CD 3+ CD95
Больные ИБС		
Контроль инкубации	0,43 (1,09; 2,14)	0,06 (0,05; 0,21)
С добавлением гомоцистеина	2,45 (1,91; 2,62) p<0,001	0,92 (0,56; 1,37) p<0,001
С добавлением гомоцистеин-тиолактона	2,52 (2,23; 4,08) p p<0,001 p1=0,028	1,51 (0,81; 2,22) p<0,001 p1=0,036
С добавлением глутамата	3,31 (2,14; 3, 59) p<0,001 p1=0,0038 p2=0,8	1,43 (0,80; 2,05) p<0,001 p1=0,045 p2=0,7

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем инкубации, p₁ – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина, p₂ – уровень статистической значимости различий образцов с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона, p₃ – уровень статистической значимости различий образцов с образцами с добавлением с добавлением глутамата

Динамика экспрессии маркеров программированной гибели клеток в популяции Т-хелперов под влиянием изучаемых веществ в культурах крови здоровых и больных ИБС была разная. Так, внесение Нсу вызвало увеличение числа клеток, несущих фосфатидилсерин на наружной мембране и АРО 2.7, более выраженное у больных ИБС. Количество Fas-рецептора и его лиганда в культуре клеток крови здоровых возрастало одинаково в 5,57 и 7,86 раз соответственно. В то время, как в образцах людей, страдающих атеросклерозом содержание CD95 позитивных Т-хелперов росло на фоне резкого снижения CD178+. Аналогичная динамика наблюдалась под влиянием Нсу-Т у здоровых. Глутамат у здоровых вызывал рост аннексин положительных клеток и несущих АРО 2.7 при сниженном уровне Fas-рецептора и его лиганда. Клетки лиц, страдающих атеросклеротическим процессом, вели себя одинаково под влиянием Нсу-Т и глутамата – экспрессия всех изучаемых маркеров возрасла, более выражено при внесении в культуру клеток Нсу-Т (табл. 59).

Маркеры апоптоза в популяции Т-хелперов в образцах периферической крови, %, (Ме (25%; 75%))

Показатели	CD4+Ann V	CD4+ CD95+	CD4 CD178+	CD4 APO 2.7
Данные здоровых доноров				
Контроль инкубации	0,05 (0,00; 0,09)	0,28 (0,21; 0,34)	0,87 (0,77; 0,96)	0,35 (0,12; 0,58)
С добавлением гомоцистеина	0,23 (0,11; 0,34) p<0,001	2,12 (1,89; 2,34) p<0,001	6,84 (4,96; 8,72) p<0,001	4,54 (2,24; 6,84) p<0,001
С добавлением гомоцистеин-тиолактона	0,16 (0,14; 0,26) p<0,001 p1=0,3	0,54 (0,44; 0,64) p<0,001 p1<0,001	0,29 (0,18; 0,41) p<0,001 p1<0,001	0,58 (0,24; 0,91) p=0,07 p1<0,001
С добавлением глутамата	0,36 (0,22; 0,45) p<0,001 p1=0,35 p2=0,1	0,18 (0,14; 0,19) p<0,001 p1<0,001 p2<0,001	0,50 (0,47; 0,53) p<0,001 p1<0,001 p2<0,001	0,82 (0,47; 1,16) p=0,001 p1<0,001 p2=0,1
Данные больных ИБС				
Контроль инкубации	0,09 (0,08; 0,15)	0,13 (0,10; 0,25)	0,46 (0,10; 0,82)	0,14 (0,10; 0,18)
С добавлением гомоцистеина	0,55 (0,36; 0,55) p<0,001	0,54 (0,49; 0,58) p<0,001	0,14 (0,10; 0,18) p=0,007	2,51 (0,99; 4,02) p<0,001
С добавлением гомоцистеин-тиолактона	0,38 (0,25; 0,47) p<0,001 p1=0,2	0,79 (0,68; 0,89) p<0,001 p1<0,001	6,61 (3,33; 9,88) p<0,001 p1<0,001	3,66 (1,53; 5,79) p<0,001 p1=0,2
С добавлением глутамата	0,61 (0,31; 0,94) p<0,001 p1=0,08 p2=0,01	0,5 (0,45; 0,55) p<0,001 p1=0,09 p2<0,001	4,44 (2,77; 6,11) p<0,001 p1<0,001 p2=0,06	2,68 (1,78; 3,57) p<0,001 p1=0,7 p2=0,2

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем инкубации, p₁ – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина, p₂ – уровень статистической значимости различий образцов с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона, p₃ – уровень статистической значимости различий образцов с образцами с добавлением с добавлением глутамата

Реакция цитотоксических Т-лимфоцитов здоровых доноров на введение Нсу носила одинаковый характер с Т-хелперами, но отличалась степенью выраженности. Так, количество Т-хелперов, несущих на своей мембране как Fas-рецептора, так и его лиганда увеличивалось под влиянием Нсу в 7,57 раз ($p < 0,001$) и 7,86 раз ($p < 0,001$), а у цитотоксических лимфоцитов в 3,38 ($p < 0,001$) и 1,68 ($p = 0,011$) раз соответственно.

Число цитотоксических лимфоцитов больных ИБС, несущих Fas-рецептор и его лиганд было существенно меньше, чем в контрольной группе. Однако, регистрировалось больше клеток с наличием на наружной мембране фосфатидилсерина и АРО 2.7. При введении в культуру аминотиолов резко возрастал уровень CD95 позитивных клеток и в меньшей степени – несущих лиганд Fas рецептора. Значительно увеличивалось количество клеток, как с ранними, так и поздними маркерами апоптоза (табл. 60). Под влиянием Нсу-Т, напротив, резко возрастала экспрессия CD95+ и CD178+ на поверхности цитотоксических лимфоцитов.

Таблица 60

Маркеры апоптоза в популяции цитотоксических Т-лимфоцитов в образцах периферической крови, %, (Me (25%; 75%))

Показатели	CD14 AnnV	CD14+CD95+	CD14 CD178+	CD14 APO2.7
Данные здоровых доноров				
Контроль инкубации	0,29 (0,25; 1,19)	3,04 (2,55; 3,79)	1,23 (1,11; 1,29)	0,34 (0,16; 0,51)
С добавлением гомоцистеина	0,79 (0,72; 1,41) $p = 0,02$	10,29 (7,96; 11,82) $p < 0,001$	2,07 (1,37; 9,93) $p = 0,011$	1,94 (0,34; 3,54) $p = 0,003$
С добавлением гомоцистеин-тиолактона	0,84 (0,79; 0,88) $p = 0,048$ $p1 = 0,2$	16,01 (14,14; 16,17) $p < 0,001$ $p1 < 0,001$	1,62 (1,11; 2,12) $p = 0,015$ $p1 = 0,024$	1,19 (0,55; 1,82) $p < 0,001$ $p1 = 0,11$
С добавлением глутамата	0,86 (0,24; 1,48) $p = 0,2$ $p1 = 0,5$ $p2 = 0,9$	5,94 (2,96; 9,93) $p = 0,002$ $p1 = 0,004$ $p2 < 0,001$	1,69 (1,14; 2,25) $p = 0,009$ $p1 = 0,029$ $p2 = 0,7$	1,32 (1,14; 1,49) $p < 0,001$ $p1 = 0,2$ $p2 = 0,9$

Показатели	CD14 AnnV	CD14+CD95+	CD14 CD178+	CD14 APO2.7
Данные больных ИБС				
Контроль инкубации	0,63 (0,48; 0,77)	0,28 (0,13; 0,62)	0,63 (0,32; 0,68)	9,87 (8,19; 11,54)
С добавлением гомоцистеина	4,72 (4,23; 5,46) p<0,001	3,09 (2,77; 3,42) p=0,001	0,14 (0,10; 0,18) p=0,0015	2,51 (0,99; 4,02) p<0,001
С добавлением гомоцистеин-тиолактона	4,36 (4,15; 6,02) p<0,001 p1=0,4	3,38 (1,56; 5,19) p<0,001 p1=0,6	0,45 (0,33; 0,60) p=0,017 p1=0,17	8,44 (4,38; 12,49) p=0,001 p1=0,2
С добавлением глутамата	6,64 (6,02; 7,26) p<0,001 p1=0,08 p2=0,03	3,09 (1,41; 4,77) p<0,001 p1=0,9 p2=0,7	0,46 (0,43; 0,48) p=0,0054 p1=0,08 p2=0,9	6,22 (3,83; 8,61) p=0,005 p<0,001 p2=0,1

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем инкубации, p₁ – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина, p₂ – уровень статистической значимости различий образцов с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона, p₃ – уровень статистической значимости различий образцов с образцами с добавлением с добавлением глутамата.

Таким образом, нами показано, что под влиянием аминотиолов изменяется функциональная активность лимфоцитов. Причем, гомоцистеин вызывает наиболее выраженные сдвиги, что свидетельствует о включении механизмов защиты организма на повреждающее действие ГГЦ [59].

3.4.2.2. Изменение функций нейтрофилов и моноцитов под воздействием высоких доз гомоцистеина в краткосрочной культуре клеток крови

Общее число нейтрофилов в культуре клеток под влиянием аминотиолов не изменялось. Наблюдалось лишь увеличение числа погибших нейтрофилов в образцах крови больных, страдающих стабильной стенокардией (p=0,002) (табл. 61). При этом, число погибших моноцитов в тех же образцах было ниже (p=0,0002). Аминотиолы вызывали резкий рост числа погибших моноцитов, в

большой степени при внесении в среду гомоцистеина и гомоцистеина-тиолактона, и в культурах клеток крови лиц с текущим атеросклеротическим процессом. Так, если в образцах культуры периферической крови доноров число погибших моноцитов увеличивалось в 2,4 ($p=0,00002$) при внесении гомоцистеина и в 2,25 ($p=0,00003$) раза – гомоцистеина-тиолактона, то в культурах периферической крови больных ИБС в 3,93 ($p=0,00001$) и в 4,75 ($p=0,00002$) раза соответственно.

Причем гибель моноцитов была обусловлена в первую очередь активацией процесса некроза. Так, в популяции нейтрофилов здоровых доноров количество CD95+ позитивных клеток увеличилось под влиянием всех изучаемых веществ: Hcy – в 4,1 раз ($p<0,001$), Hcy-T – в 2,69 раз ($p<0,001$). Число CD95+ позитивных лейкоцитов больных ИБС не отличалось от группы контроля. Однако, под влиянием аминотиолов их пул возрастал значительно больше, чем в культуре клеток условно здоровых доноров: в 18,8 раз при внесении Hcy ($p<0,001$) и в 14,2 раз – Hcy-T ($p<0,001$). Глутамат вызвал еще большую экспрессию CD95+ на нейтрофилах – в 108,6 раз ($p<0,001$).

Аннексин V – позитивных нейтрофилов у больных ИБС было выше в 3,43 раза по сравнению со здоровыми добровольцами ($p<0,001$). Воздействие аминотиолов, так же как и у здоровых вызывает увеличение числа этих клеток, но в большей степени – в 7,67 раз против 3,7 раза (рис. 22).

Активации апоптического процесса под влиянием изучаемых веществ в моноцитах периферической крови не выявлено ни в контрольной группе, ни у больных ИБС. Зафиксировано лишь увеличение клеток у здоровых доноров, с наличием Fas-рецептора на 66,05% ($p=0,027$) при внесении в культуру клеток Hcy-T. При этом, обнаружено снижение Fas-лиганда на 16,43% ($p=0,015$) по сравнению с контролем инкубации.

Число выживших и погибших фагоцитов в краткосрочных культурах клеток периферической крови под влиянием аминотиолов, (Ме (25%; 75%))

Показатели	Образцы крови условно здоровых добровольцев				Образцы крови больных ИБС			
	Контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т	с добавлением глутамата	Контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т	с добавлением глутамата
Общее число нейтрофилов, абс.	1722,00 (654,0; 1944,0)	1860 (777,0; 1982,0)	2037,00 (1942,0; 2117,0)	1791,00 (746,0; 2214,0)	1072,00 (958,0; 1270,0)	1356,00 (1205,00; 1481,00)	1229,00 (1139,0; 1449,0)	715,50 (654,00; 1066)
Число живых нейтрофилов, %	96,87 (96,38; 98,05)	99,62 (96,54; 97,94)	95,89 (95,33;96,88)	96,36 (93,65;96,89)	95,67 (95,39;98,05)	94,05 (93,99; 94,33)	94,09 (93,99;94,49)	94,89 (94,76;95,06)
Число погибших нейтрофилов, %	2,23 (1,67; 2,48)	1,85 (0,85; 1,90)	2,19 (1,79; 2,33)	2,06 (1,56; 2,59)	4,24 (1,82; 4,58) p ₄ =0,002	5,95 (5,67; 6,43) p ₁ =0,02 p ₄ =0,001	5,91 (4,87; 5,99) p ₁ =0,02 p ₄ =0,0002	4,91 (4,30; 5,23) p ₄ =0,003
Общее число моноцитов, абс.	16,00 (15,00; 19,00)	28,00 (11,00; 31,00) p ₁ =0,002	30,00 (23,00;34,00) p ₁ =0,003	19,50 (17,00;27,00) p ₁ =0,04 p ₂ =0,045 p ₃ =0,03	23,00 (19,00;29,00) p ₄ =0,01	29,00 (25,00; 30,00) p ₁ =0,04	26,00 (24,00;28,00)	15,50 (12,00;17,00) p ₁ =0,003 p ₄ =0,02
Число живых моноцитов, %	71,15 (64,52; 76,36)	29,51 (28,57; 42,11) p ₁ =0,00002	35,04 (25,53;38,00) p ₁ =0,00003	52,09 (32,67;65,63) p ₁ =0,004 p ₂ =0,02 p ₃ =0,01	83,93 (80,77;87,18) p ₄ =0,003	36,91 (35,63; 39,64) p ₁ =0,00001	23,64 (21,52;28,74) p ₁ =0,00002	64,52 (62,50;65,63) p ₁ =0,0003
Число погибших моноцитов, %	28,85 (23,644;35,29)	70,49 (57,89; 71,43) p ₁ =0,00002	64,97 (62,00;74,47) p ₁ =0,00003	47,91 (38,46;67,33) p ₁ =0,004 p ₂ =0,035	16,07 (12,82;19,23) p ₄ =0,0002	63,09 (60,36; 64,37) p ₁ =0,00001	76,36 (71,26;78,48) p ₁ =0,00002	35,44 (34,38;37,50) p ₁ =0,00002

				$p_3=0,01$				
--	--	--	--	------------	--	--	--	--

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p_2 – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона, p_3 – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением глутамата по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона, p_4 – уровень статистической значимости различий по сравнению с условно здоровыми добровольцами и больными ИБС.

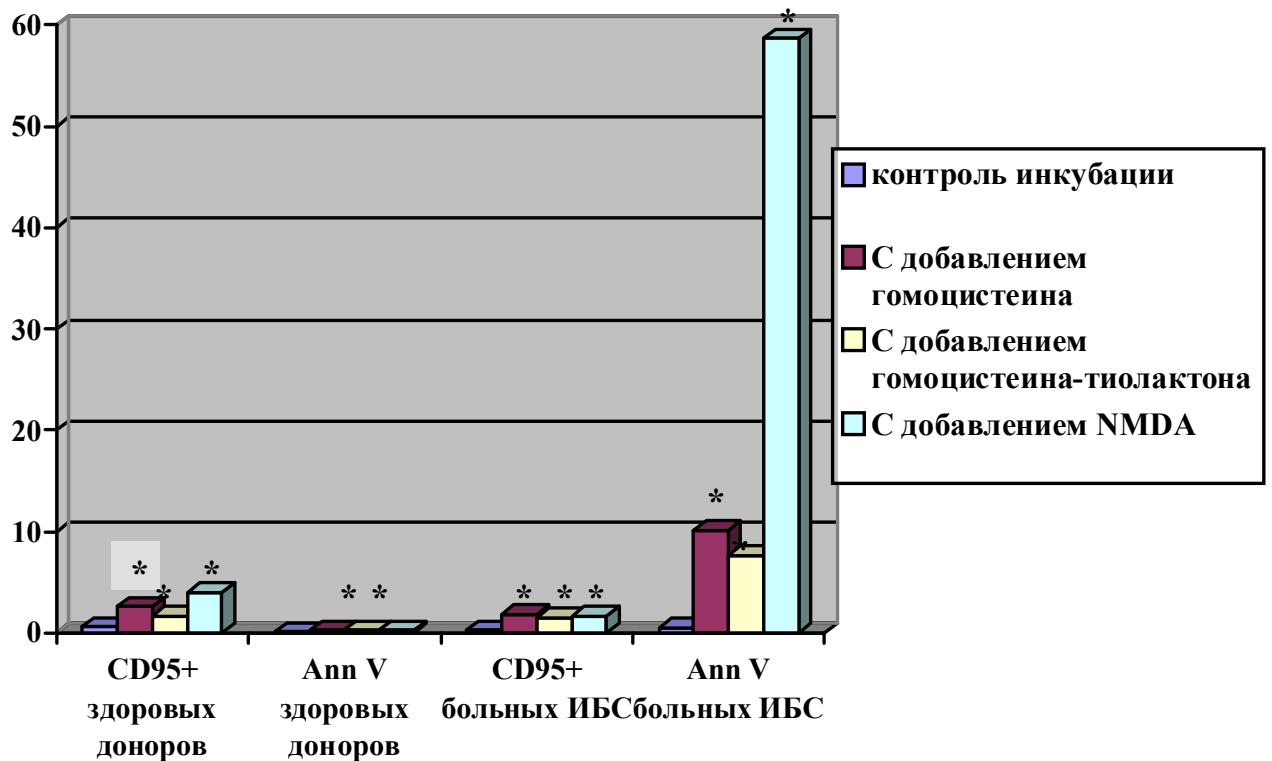


Рисунок 22. Экспрессия CD95 и Ann V на мембране нейтрофилов под воздействием аминотиолов и глутамата, %

Примечание: * – уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем инкубации.

Маркеры раннего и позднего этапа апоптоза в популяции моноцитов здоровых доноров не изменялись. Следовательно, данные показатели у здоровых можно проинтерпретировать лишь как готовность моноцитов к рецепции апоптогенного сигнала. Моноциты больных ИБС несли на своей поверхности большее количество маркеров апоптоза. Так, содержание CD95+ позитивных моноцитов увеличивалось в 3,99 раз ($p < 0,001$), CD178 позитивных – в 2,24 раза ($p = 0,001$), с наличием фосфатидилсерина – в 6,12 раз ($p = 0,000001$) и APO 2.7 – в 1,37 раз ($p < 0,001$) (табл. 62).

Экспрессия маркеров апоптоза моноцитами периферической крови под влиянием аминотиолов и глутамата, %, (Ме (25%; 75%))

Показатели	CD14 AnnV	CD14+CD95+	CD14 CD178+	CD14 APO2.7
Показатели здоровых доноров				
Контроль инкубации	7,32 (0,00;14,63)	8,07 (1,51;14,63)	23,38 (19,23;27,54)	18,57 (15,39;21,74)
Показатели	CD14 AnnV	CD14+CD95+	CD14 CD178+	CD14 APO2.7
С добавлением гомоцистеина	6,39 (1,00;11,77) p=0,74	12,91 (7,00;18,82) p=0,08	17,36 (14,71;20,00) p=0,0005	16,35 (15,56;17,14) p=0,035
С добавлением гомоцистеин-тиолактона	7,28 (7,14;7,41) p=0,98 p1=0,59	13,40 (9,88;16,92) p=0,027 p1=0,81	20,08 (19,64;20,51) p=0,015 p1=0,0028	10,49 (10,26;10,72) p<0,001 p1<0,001
С добавлением глутамата	6,96 (3,28;10,64) p=0,89 p1=0,77 p2=0,77	8,85 (4,92;12,77) p=0,74 p1=0,07 p2=0,0089	26,49 (22, 41;30,56) p=0,09 p1<0,001 p2<0,001	15,04 (11,11;18,97) p=0,031 p1=0,29 p2<0,001
Показатели больных ИБС				
Контроль инкубации	44,85 (15,79; 73,91)	32,21 (25,47; 78,95)	52,49 (26,53; 78,46)	25,32 (24,49; 26,15)
С добавлением гомоцистеина	43,96 (13,73; 74,12) p=0,94	58,84 (21,59; 96,08) p=0,64	57,09 (26,67; 87,50) p=0,71	29,48 (23,53; 35,42) p=0,032
С добавлением гомоцистеин-тиолактона	53,07 (39,61; 69,23) p=0,42 p1=0,4	69,05 (52,38; 85,72) p=0,09 p1=0,42	61,64 (25,00; 98,28) p=0,51 p1=0,75	41,33 (36,11; 46,55) p<0,001 p1<0,001
С добавлением глутамата	41,11 (12,82; 69,39) p=0,76 p1=0,8 p2=0,24	58,65 (27,55; 89,74) p=0,61 p1=0,98 p2=0,33	59,86 (21,57; 98,15) p=0,61 p1=0,85 p2=0,91	32,19 (25,49; 38,89) p=0,0027 p1=0,33 p2=0,0017

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем инкубации, p₁ – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина, p₂ – уровень статистической значимости различий образцов с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона, p₃ – уровень статистической значимости различий образцов с образцами с добавлением с добавлением глутамата.

Таким образом, введение аминотиолов в первую очередь оказывает цитотоксическое влияние на фагоциты, вызывая их гибель путем некроза. При этом в культурах клеток здоровых доноров, наблюдается увеличение экспрессии CD62L на фоне снижения CD162+. В то время, как в культурах клеток периферической крови лиц, страдающих атеросклеротическим процессом – рост числа клеток, несущих P-селектин, при не измененном уровне моноцитов, экспрессирующих L-селектин (табл. 62).

Моноциты, имеющие на своей мембране рецептор для интерлейкина -2, в большей степени способны образовывать и секретировать активные формы кислорода, протеазы, перекись водорода, фактор некроза опухолей [3-4, 366]. Нами зафиксирован рост количества таких клеток как в культурах клеток крови здоровых доноров, так и больных стабильной стенокардией только при внесении в нее глутамата (табл. 63).

Молекулы адгезии позволяют клеткам образовывать коагрегаты, тем самым вызывая взаимную активацию друг друга и позволяя им более широко выполнять свои функции. Необходимо отметить, что изначально число нейтрофило-тромбоцитарных и моноцитарно-тромбоцитарных коагрегатов у больных ИБС значимо выше, чем у здоровых добровольцев. Гомоцистеин и гомоцистеин-тиолактон вызывали более сильный эффект, чем глутамат как в культурах клеток периферической крови здоровых доноров, так и лиц, страдающих атеросклерозом с соблюдением одной и тоже тенденции – рост числа коагрегатов при внесении в культуру Hcy и Hcy-T, в большей степени в культурах клеток больных ИБС (рис. 23 и 24).

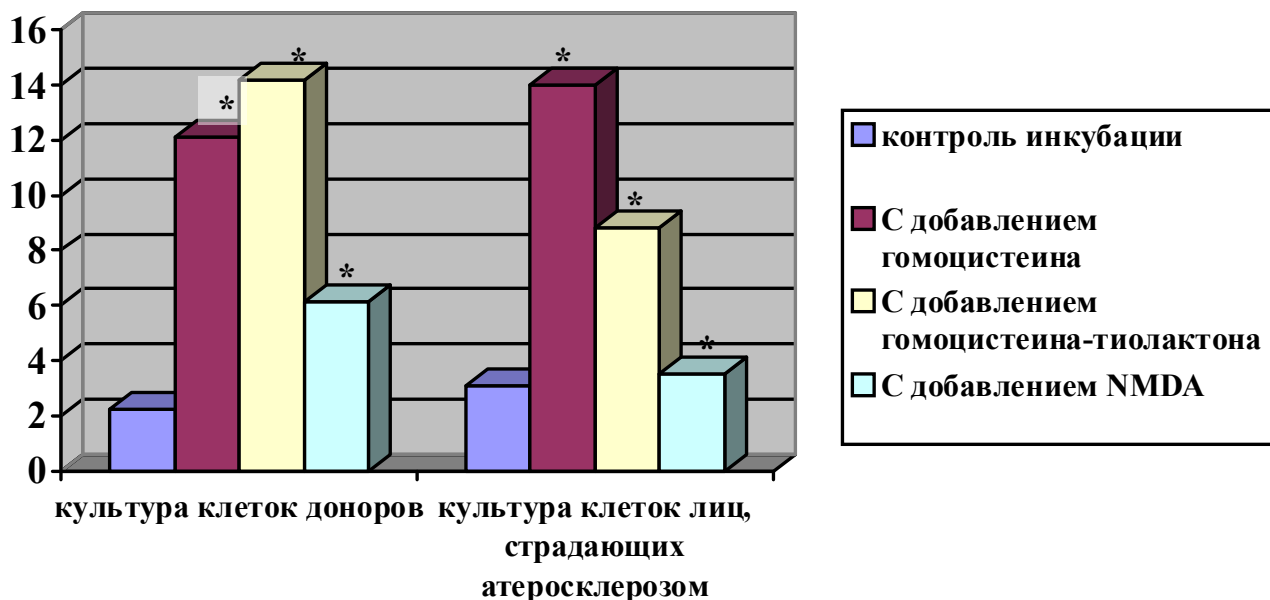


Рисунок 23. Моноцитарно – тромбоцитарные коагрегаты, образованные в культуре клеток периферической крови под влиянием аминотиолов, абс. в 1 мкл культуры.

Примечание: *– уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем инкубации.

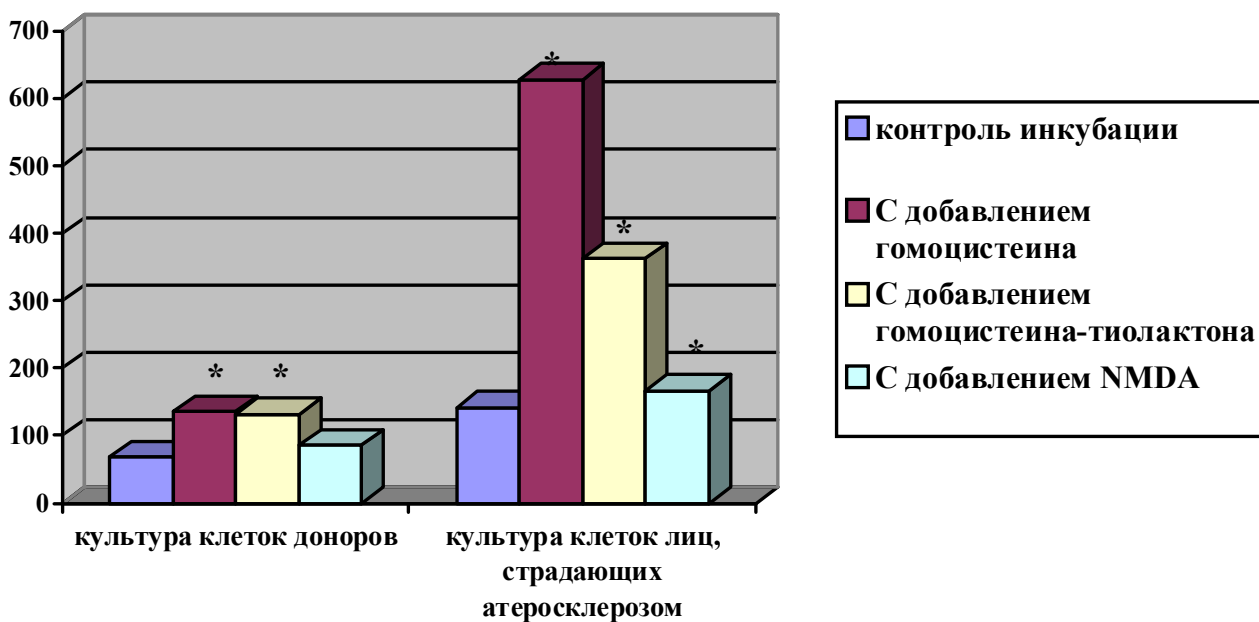


Рисунок 24. Нейтрофило – тромбоцитарные коагрегаты, образованные в культуре клеток периферической крови под влиянием аминотиолов, абс. в 1 мкл культуры.

Примечание: *– уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем инкубации.

Динамика молекул активации и адгезии экспрессируемых моноцитами в краткосрочных культурах клеток периферической крови под влиянием аминотиолов, (Me (25%; 75%))

Показатель и	Образцы крови условно здоровых добровольцев				Образцы крови больных ИБС			
	Контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т	с добавлением глутамата	Контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т	с добавлением глутамата
CD14+ CD25+, %	1,90 (1,43; 2,10)	2,0 (1,25; 3,00)	1,35 (1,20; 1,50)	3,00 (2,00; 4,26) p ₁ =0,004	75,00 (70,00;80,00) p ₄ =0,000001	52,38 (37,50;58,18) p ₁ =0,00001	58,21 (37,26;90,18) p ₁ =0,001	84,03 (80,00;88,09) p ₁ =0,04
CD14+ CD162+, %	72,48 (55,21; 75,73)	51,22 (31,25;76,03)	27,09 (25,80;29,07) p ₁ =0,00003	26,83 (25,71;30,00) p ₁ =0,004 p ₂ =0,02	7,25 (4,17;10,17) p ₄ =0,000003	59,26 (54,00;75,00) p ₁ =0,00001	48,22 (29,27;52,94) p ₁ =0,00002	8,30 (4,17;13,46) p ₂ =0,0004 p ₃ =0,0004
CD14+ CD62L+, %	2,75 (1,52; 10,19)	15,13 (9,37; 16,67) p ₁ =0,01	8,25 (6,45; 10,45) p ₁ =0,045	12,00 (7,50; 17,46) p ₁ =0,04 p ₂ =0,045 p ₃ =0,04	12,50 (11,91;14,29) p ₄ =0,00002	15,52 (12,96;29,41)	12,75 (4,88;20,83)	12,20 (6,12;13,39)

Примечание: p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p₂ – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона, p₃ – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением глутамата по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона, p₄ – уровень статистической значимости различий по сравнению с условно здоровыми добровольцами и больными ИБС.

Одной из важных функций фагоцитов является их участие в регулировании процесса свертывания крови [81], так как развитие гиперкоагуляции в очаге воспаления является механизмом его ограничения. Нами показано, что моноциты здоровых доноров значительно увеличивают экспрессию TF только под влиянием Нсу. В то время как моноциты больных ИБС – при воздействии всех аминотиолов (рис. 24). Число нейтрофилов здоровых лиц, несущих на своей поверхности TF, увеличивалось при внесении в культуру аминотиолов увеличивалось в среднем на 23% ($p=0,001$, $p=0,002$, $p=0,001$ соответственно) (рис. 25). У больных атеросклерозом изначально 99,9% полиморфноядерных лейкоцитов имели на своей мембране TF. Поэтому их реакцию на внесение изучаемых веществ отследить не представлялось возможным (ри. 26)..

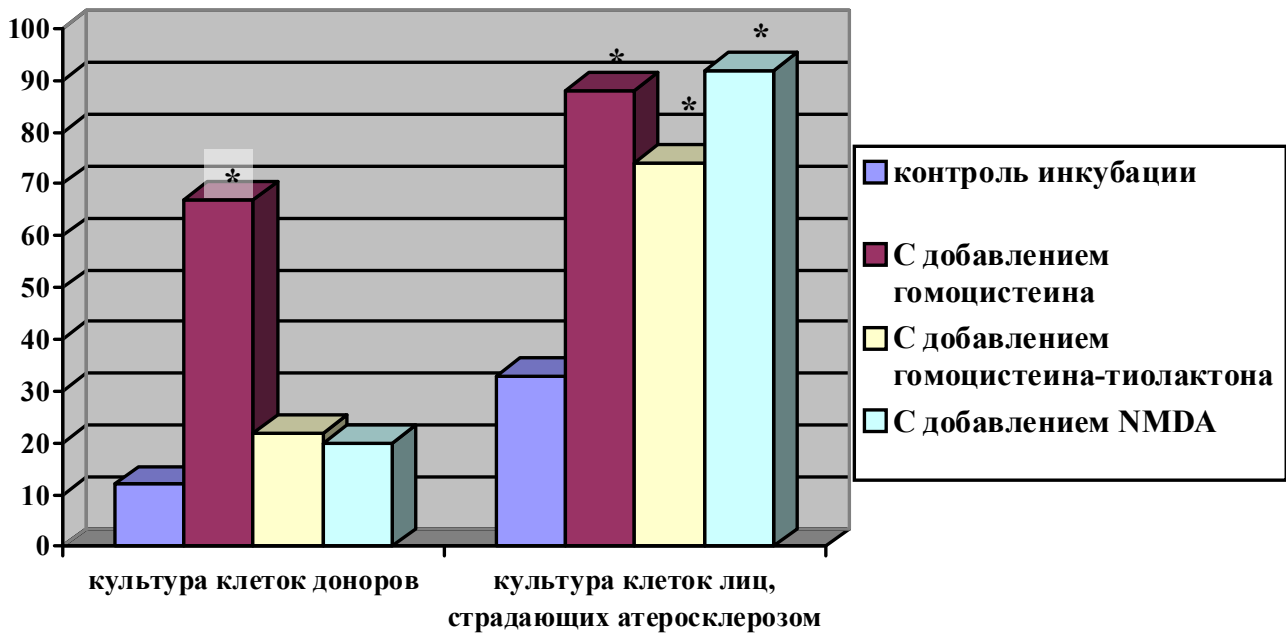


Рисунок 25. Процент моноцитов, несущих на своей поверхности тканевой фактор, при внесении в культуру клеток периферической крови влиянием аминотиолов.

Примечание: *– уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем инкубации.

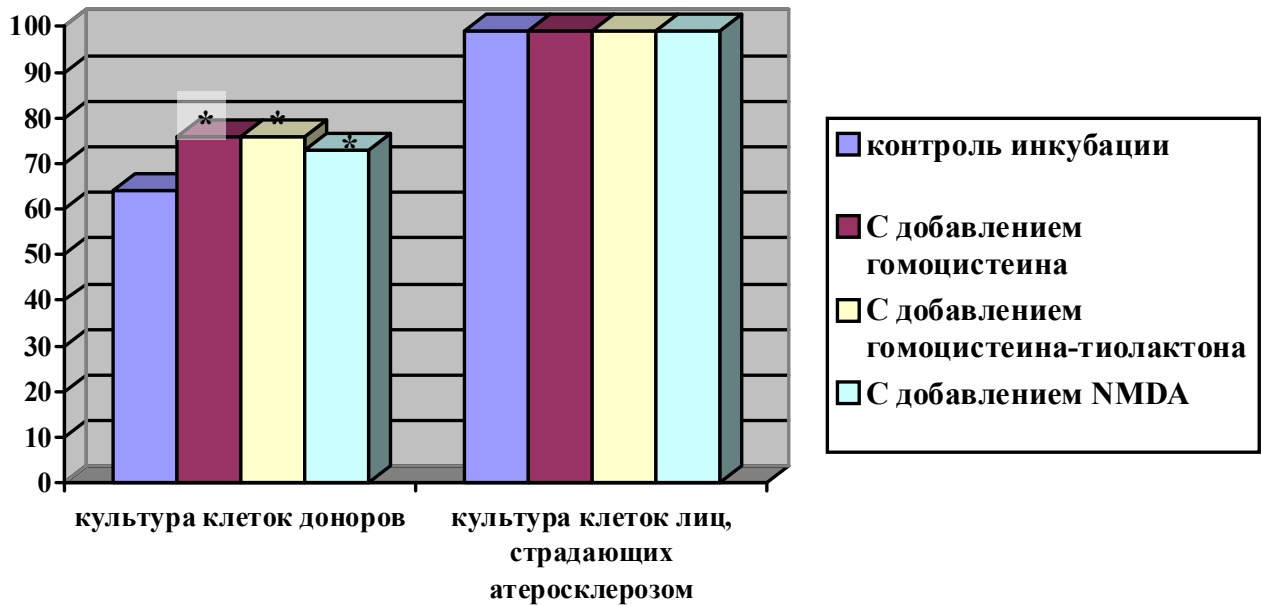


Рисунок 26. Процент нейтрофилов, несущих на своей поверхности тканевой фактор, при внесении в культуру клеток периферической крови влиянием аминотиолов.

Примечание: * – уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем инкубации.

Таким образом, подводя итог этой главе, можно сделать вывод, что Hcy в большей степени и Hcy-T – в меньшей, вызывают повреждение различных структур организма. В первую очередь – эндотелиоцитов, запускают процесс воспаления в стенке сосудов, тем самым активируют клетки иммунной системы, индуцируют развитие вторичной альтерации и тромбозов. Как следствие этого – формирование атеросклеротической бляшки.

3.4.3. Дозозависимое влияние различных концентрации гомоцистеина на функциональную активность фибробластов в культуре

Одним из патологических эффектов ГГЦ является резкое увеличение синтеза и накопления в ней коллагена, что приводит к существенному повышению плотности сосудистой стенки [72, 95, 99]. Нами изучались особенности функционирования фибробластов в культуре клеток под действием различных концентраций Hcy.

Визуальное наблюдение культуры клеток позволило выявить отчетливые различия роста фибробластов с добавлением различных доз Hcy в среду роста. В контрольных лунках фибробласты были распластаны по дну флакона, каждая клетка имела от 2 до 4 отростков, которые анастомозировали с отростками соседних клеток (рис. 27). Цитолемма и кариолемма их четко контурировала, цитоплазма была гомогенная, центрально расположенные ядра пузырьковидные, округлой формы, имели гладкую тонкую оболочку и содержали 1-2 крупных ядрышка. В опытных образцах, содержащих 12,5 и 25,0 мкмоль/л Hcy, форма фибробластов веретеновидная, тела клеток плотно прилежали друг к другу, поэтому анастомозы между клетками прослеживались плохо.

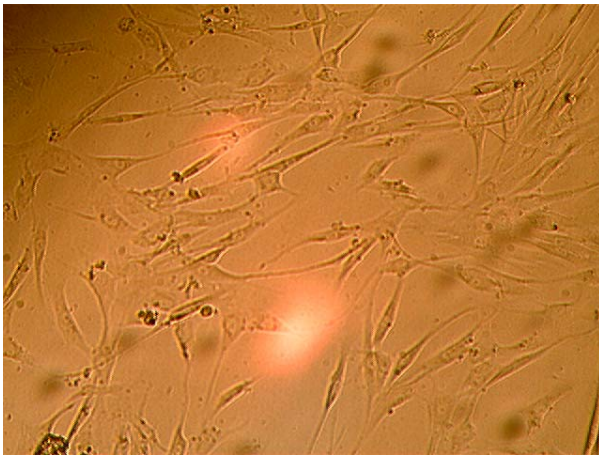


Рисунок 27. Рост культуры фибробластов в контрольных лунках

В культурах с концентрацией Hcy 50 мкмоль/л отмечалось уменьшение размеров фибробластов и количества отростков, наблюдалось сморщивание клеток и сглаживание контуров их ядер, определялись фрагменты разрушенных клеток (рис.28).



Рисунок 28. Рост культуры фибробластов в образцах, содержащих 50 мкмоль/л гомоцистеина

Изменения оптической плотности раствора кристаллического фиолетового подтвердило визуальное наблюдение: максимально высокие цифры экстинции были получены в лунках с концентрацией Hcy 12,5 и 25 мкмоль/л, а минимальное – 50 мкмоль/л (табл. 64), что говорит о бимодальном эффекте, заключающемся в противоположном воздействии различных концентраций активного вещества на систему или ткань.

Таблица 64

Интенсивность окраски фибробластов в единицах оптической плотности в зависимости от концентрации гомоцистеина (Me (25-й; 75-й))

контроль	6,3 мкмоль/л Hcy	12,5 мкмоль/л Hcy	25,0 мкмоль/л Hcy	50,0 мкмоль/л Hcy
0,16 (0,15; 0,17)	0,19 (0,18; 0,20) $p_1=0,004$	0,20 (0,19; 0,21) $p_1=0,003$ $p_2=0,8$	0,26 (0,24; 0,29) $p_1=0,003$ $p_2=0,05$ $p_3=0,05$	0,13 (0,12; 0,14) $p_1=0,003$ $p_2=0,05$ $p_3=0,05$ $p_4=0,05$

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p_2 – по сравнению с добавлением гомоцистеина в среду в концентрации 6,3 мкмоль/л, p_3 – 12,5 мкмоль/л, p_4 – 25,0 мкмоль/л.

Фактами, подтверждающими повреждение фибробластов, являются и дозозависимое увеличение концентраций малонового диальдегида и содержание HSP 70 и 90 α (табл. 65).

Содержание малонового диальдегида и белков теплового шока в культуральной среде фибробластов в зависимости от концентрации гомоцистеина (Ме (25-й; 75-й)) (N=8)

показатели	контроль	6,3 мкмоль/г Нсу	12,5 мкмоль/л Нсу	25,0 мкмоль/л Нсу	50,0 мкмоль/л Нсу
Малоновый диальдегид мкмоль/мг липидов	0,07 (0,03; 0,09)	0,11 (0,05; 0,27) p ₁ =0,11	1,9 (1,80; 2,50) p ₁ =0,003 p ₂ =0,05	2,2 (1,85; 2,75) p ₁ =0,003 p ₂ =0,05 p ₃ =0,8	0,35 (0,35 0,80) p ₁ =0,003 p ₂ =0,05 p ₃ =0,001 p ₄ =0,001
HSP 70, нг/мл	0,12 (0,10; 0,13)	0,21 (0,16; 0,29) p ₁ =0,003	0,34 (0,29; 0,36) p ₁ =0,003 p ₂ =0,05	0,38 (0,35; 0,43) p ₁ =0,003 p ₂ =0,05 p ₃ =0,08	0,49 (0,49; 0,54) p ₁ =0,003 p ₂ =0,05 p ₃ =0,05 p ₄ =0,05
HSP 90a, нг/мл	0,13 (0,10; 0,15)	0,23 (0,21; 0,24) p ₁ =0,003	0,24 (0,23 0,27) p ₁ =0,003 p ₂ =0,9	0,57 (0,42; 0,72) p ₁ =0,003 p ₂ =0,05 p ₃ =0,05	0,19 (0,14; 0,31) p ₁ =0,02 p ₂ =0,8 p ₃ =0,9 p ₄ =0,05

Примечание: p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p₂ – по сравнению с добавлением гомоцистеина в среду в концентрации 6,3 мкмоль/л, p₃ – 12,5 мкмоль/л, p₄ – 25,0 мкмоль/л.

Увеличение концентрации белков теплового шока является проявлением механизмов адаптации клетки к окислительному стрессу [53, 74], вызванному Нсу. Этим можно объяснить то, что уровень малонового диальдегида в нашем исследовании увеличивался при внесении в культуральную среду Нсу в дозе 12,5 мкмоль/л и выше, в то время как содержание белков теплового шока изменилось уже при добавлении Нсу в дозе 6,3 мкмоль/л.

Влияние различных концентраций гомоцистеина привело к различной интенсивности синтеза интерлейкинов фибробластами. Наиболее выраженные изменения чаще наблюдались в среде, содержащей 25 мкмоль/л гомоцистеина.

Так, содержание в этих образцах IL-1b увеличилось более чем в 70 раз ($p=0,003$), IL-4 – в 7 раз ($p=0,003$). Максимальное увеличение IL-6 получено при концентрации Hcy в 50 мкмоль/л – в 17 раз ($p=0,003$). Регистрировалось дозозависимое снижение концентрации IL-10. При концентрации Hcy 6,3 мкмоль/л – в 1,7 раза (0,003), 12,5 и 25 мкмоль/л – в 7 раз ($p=0,003$ и 0,004 соответственно), 50 мкмоль/л – в 246 раз ($p=0,003$) (табл. 66).

Таблица 66

Содержание цитокинов в культуральной среде фибробластов в зависимости от концентрации гомоцистеина (Ме (25-й; 75-й))

Показатели	IL-1b, пг/мл	IL-6, пг/мл	IL-4, пг/мл	IL-10, пг/мл
контроль	0,99 (0,45; 1,16)	1,50 (1,05; 2,24)	0,87 (0,43; 0,98)	7,43 (6,65; 7,87)
6,3 мкмоль/л гомоцистеина	4,82 (3,56 5,20) $p_1=0,003$	3,96 (3,27; 5,08) $p_1=0,003$	1,30 (1,13; 1,47) $p_1=0,003$	4,20 (3,20; 5,55) $p_1=0,003$
12,5 мкмоль/л гомоцистеина	19,84 (15,10; 22,40) $p_1=0,003$ $p_2=0,05$	14,32 (12,34; 16,32) $p_1=0,003$ $p_2=0,005$	2,90 (2,51; 3,75) $p_1=0,003$ $p_2=0,05$	1,00 (0,9; 1,2) $p_1=0,003$ $p_2=0,05$
25,0 мкмоль/л гомоцистеина	72,00 (66,50; 82,50) $p_1=0,003$ $p_2=0,000003$ $p_3=0,000013$	17,74 (16,39; 20,59) $p_1=0,003$ $p_2=0,005$ $p_3=0,7$	5,80 (4,74 7,55) $p_1=0,003$ $p_2=0,05$ $p_3=0,05$	1,00 (0,75; 1,45) $p_1=0,004$ $p_2=0,05$ $p_3=0,9$
50,0 мкмоль/л гомоцистеина	2,30 (1,50; 3,75) $p_1=0,003$ $p_2=0,05$ $p_3=0,05$ $p_4=0,000003$	25,35 (22,90; 29,05) $p_1=0,003$ $p_2=0,005$ $p_3=0,05$ $p_4=0,05$	1,47 (1,17; 2,20) $p_1=0,003$ $p_2=0,6$ $p_3=0,05$ $p_4=0,001$	0,03 (0,001; 0,48) $p_1=0,003$ $p_2=0,05$ $p_3=0,05$ $p_4=0,05$

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p_2 – по сравнению с добавлением гомоцистеина в среду в концентрации 6,3 мкмоль/л, p_3 – 12,5 мкмоль/л, p_4 – 25,0 мкмоль/л.

Таким образом, Hcy вызывает изменение функции культивируемых фибробластов: в диапазоне концентраций 12,5 – 25,0 мкмоль/л усиливается пролиферация фибробластов, на фоне активации процессов перекисного

окисления липидов, повышается синтез IL-1b и IL-4, HSP90a. Добавление Hcy в дозе 50,0 мкмоль/л вызывает гибель клеток, накопление в культуральной среде HSP70, IL-6 и резкое снижение IL-10 [150].

Глава 4

Обсуждение полученных данных

Гипергомоцистеинемия является независимым фактором риска развития сердечно-сосудистой патологии, осложнений беременности, когнитивных расстройств, остеопороза [37-38, 42, 44, 72, 99, 155, 156, 261, 278].

Нсу непрерывно образуется при деметилировании метионина и метаболизируется путем реметилирования, трансметилирования с метионином и транссульфатирования, превращаясь в цистеин. ГГЦ развивается в первую очередь вследствие снижения активности ферментов, принимающих участие в его метаболизме, во-вторых, вследствие нарушения его выведения из организма. По данным многочисленных исследований, хроническая умеренная ГГЦ способствует резкому усилению коагулирующих свойств крови, повреждению эндотелия кровеносных сосудов, и развитию их спазма, появлению очагов атероматозного поражения [26, 148, 297, 377]. Но, несмотря на это, остается много вопросов о молекулярных механизмах его действия.

Предполагается, что Нсу повреждает эндотелиоциты, активирует окислительный стресс (в первую очередь за счет угнетения активности глутатионпероксидазы), образует окисленные формы липопротеинов низкой плотности, инактивирует оксид азота [177, 271, 306]. Кроме этого, Нсу повышает активность XII и V факторов свертывания крови, снижает активность протеина С и экспрессию тромбомодулина, подавляет экспрессию гепаран-сульфатов [13, 330, 377], что в конечном итоге уменьшает антитромботический потенциал эндотелиальных клеток [169, 171, 214]. Помимо этого, Нсу инициирует синтез тромбоксана А₂ в тромбоцитах, увеличивает экспрессию Р-селектина, что вызывает повышенную агрегацию тромбоцитов [226].

Гемостаз, иммунитет и врожденные факторы резистентности организма составляют единую интегральную клеточно-гуморальную систему защиты [78-79], обеспечивающую охрану от повреждающего действия гипергомоцистеинемии.

Изменения, развивающиеся в организме человека, обусловленные повышенным уровнем гомоцистеина

Первым этапом изучения влияния высоких концентраций аминотиолов на организм человека явилось исследование, проведенное на добровольцах, имеющих риск развития сосудистых катастроф. В качестве фактора, инициирующего данное состояние, нами выбран такой устранимый фактор, как курение. Курение является одним из признанных факторов риска развития атеросклероза, хронической обструктивной болезни легких, облитерирующего эндартериита и т.д. [365]. Число курящих лиц различается в зависимости от региона страны, возрастной группы, городское или сельское население, профессиональных коллективах и т. п. В среднем у мужчин достигает 73,2%, а у женщин – 27% [110, 144].

Известно несколько гипотез, обосновывающих основные пути цитотоксического влияния компонентов дыма сигарет на эндотелий сосудов: прямое повреждение эндотелиоцитов [224, 311]; изменение структуры и функции лейкоцитов крови – трансформация моноцитов в макрофаги секреторного типа и продуцирование ими цитокинов [360]; иммунотоксический путь повреждения клеток – фиксация гликопротеидов табака на поверхности эндотелиоцитов (гаптена) и образование к ним аутоантител; иммуноаллергический механизм – образование антител к гликопротеинам табака и секреция медиаторов повреждения [110, 144]. Возможным повреждающим механизмом является повышение уровня Нсу. Никотин вызывает снижение концентрации витамина В₆, необходимого для превращения Нсу в цистотионин, а также снижает активность ферментов печени, участвующих в метаболизме Нсу, что и приводит к повышению уровня аминотиола [197].

Оказалось, что в первой исследуемой группе – пациентов с риском развития сосудистых катастроф – уровень Нсу превышал значения контрольной группы в 1, 87 раза ($p=0,003$) при стаже курения до 5 лет, 2,24 раза ($p=0,002$) – 5-10 лет и в

2,39 раз ($p=0,0002$) – более 10 лет. При этом, изменения его уровня в зависимости от стажа курения не выявлено (табл. 4).

Различными исследователями показано, что в крови, а также в стенках крупных артерий, как здоровых лиц, так и больных ишемической болезнью сердца, присутствуют аутоиммунные комплексы, в состав которых входят окисленные липопротеины. Доказано, что такие комплексы способны индуцировать трансформацию макрофагов в пенистые клетки, вызывать повреждение эндотелиальных клеток и увеличивать поступление в интиму артериальной стенки атерогенных липопротеинов [3-4, 9, 14, 24, 43, 55, 89, 113, 235].

Поэтому, на следующем этапе нами изучалась зависимость между окисленными липопротеидами, входящими в состав иммунных комплексов и концентрацией Нсу. Не исключено, что образование иммунных комплексов может сопровождаться гипергомоцистеинемией.

Нами показано, что содержание окисленных липопротеидов зависит как от возраста, так и от стажа курения, и максимально в группе со стажем курения 10 и более лет (табл. 5). В этой же группе была зафиксирована и максимальная концентрация окисленных липопротеидов малоновым диальдегидом – около 80% от всех оЛПНП. Параллельно наблюдалось повышение количества иммунных комплексов средних размеров в 8 раз у лиц со стажем курения более 10 лет ($p=0,00089$). При этом, уровень аутоантител к окисленным ЛПНП возрастал только при стаже курения от 5 до 10 лет – в 1,5 раза ($p=0,0072$), и в группе более 10 лет – в 6 раз ($p=0,00089$) (табл. 8). Кроме этого, у никотинзависимых лиц со стажем курения 5 лет, увеличивается уровень иммунных комплексов, содержащих как холестерин, так и триглицериды. При этом, концентрация антител к окисленным липопротеидам у них нарастала с гораздо меньшей скоростью, по сравнению с увеличением уровня о-ЛПНП. Так у никотинзависимых лиц, со стажем курения до 5 лет количество антител не увеличивалось, а уровень окисленных липопротеидов возрастал в 7 раз, стаж от 5 до 10 лет – 1,5 и 23 раза, и

у лиц, курящих более 10 лет – в 6 и 20 раз соответственно по сравнению с группой контроля [33, 67].

Одним из маркеров дисфункции эндотелия является увеличение числа циркулирующих эндотелиальных клеток. Нами было зарегистрировано семикратное повышение ЦЭК в первой исследуемой группе ($p < 0,001$), при этом со значительным увеличением процента мертвых ЦЭК (таблица 6).

Повреждение эндотелиоцитов косвенно подтверждало и изменение спектра цитокинов. Так, у молодых людей первой исследуемой группы уровень интерлейкина 10 увеличивался более чем в 25 раз ($p < 0,001$), интерлейкина 8 – в 3,5 раз ($p = 0,001$). Менее значимо возросли концентрации интерлейкина 4 и TNF α (табл. 11) [136].

Вероятно, процессу дезэндотелизации предшествуют воспалительные процессы, сопровождающиеся продукцией про- и противовоспалительных цитокинов. Следует ожидать, что интерлейкины активируют нейтрофилы и моноциты с выбросом металлопротеиназ, повреждающих субэндотелиальную мембрану, что делает возможным «отрыв» эндотелиоцитов.

Полученные данные, свидетельствуют, что в норме иммунная система организма поддерживает уровень Hsu и содержание окисленных им ЛПНП, путем образования аутоантител. У никотинзависимых лиц со стажем курения до 10 лет механизмы адаптации работают, но в не полном объеме. В то время как у людей со стажем курения более 10 лет наблюдается срыв механизмов адаптации, приводящий к ускорению развития атеросклероза. Этот факт подтверждается корреляционным анализом – выявлены значимые связи между содержанием Hsu и окисленными ЛПНП ($r = -0,485$; $p < 0,05$), окисленными ЛПНП малоновым диальдегидом ($r = -0,836$; $p < 0,05$) и иммунными комплексами, осажденными 10 % полиэтиленгликолем. В первой исследуемой группе данные корреляционные взаимосвязи исчезают и появляются вновь в подгруппе со стажем курения более 10 лет. При этом изменяется их направленность и сила. Так, отмечается прямая связь между окисленными ЛПНП в целом и малоновым диальдегидом, в частности, и насыщенностью крови Hsu ($r = 0,79$, $r = 0,8$, соответственно, $p < 0,05$).

Кроме этого, корреляционный анализ выявил также прямую зависимость между уровнем Нсу и содержанием иммунных комплексов, осажденных 3,5% ПЭГ ($r=0,8$; $p<0,05$), 5% ПЭГ ($r=0,74$; $p<0,05$) и обратную – с 10% ПЭГ ($r=-0,81$; $p<0,05$) [41].

Показатели коагулограммы первой исследуемой группы не выходили за пределы референсных значений, но при этом наблюдалось удлинение тромбинового времени на 18,6% ($p=0,000293$) и АЧТВ в группе курящих молодых людей на 9,5 % ($p=0,0013$) [31]. Параллельно с этим, в крови никотинзависимых обследуемых возрастает уровень аутоантител к тромбину ($p=0,022$). Такой сдвиг с одной стороны, свидетельствует о более высоком содержании антигенных эпитопов тромбина в крови курящих людей, а с другой, объясняет удлинение тромбинового времени и АЧТВ в этой же группе обследуемых. В связи со сказанным, увеличение концентрации аутоантител к тромбину следует расценивать как компенсаторную реакцию организма на гиперкоагуляцию.

В последние годы происходит переоценка ключевых положений патогенеза гипертонической болезни с позиций вовлечения специфических иммунных механизмов [34, 63, 93, 152, 309, 327]. Так, было показано увеличение общей концентрации IgG, IgA при гипертонической болезни, особенно с кризовым течением, а также повышение уровня аутоантител к антигенам из ткани аорты и сердца [112]. Однако, в полной мере, вопрос состояния иммунной системы при эссенциальной артериальной гипертензии остается практически не изученным. Атеросклеротический процесс без вовлеченности иммунной системы в механизмы его формирования уже не рассматривается.

Одним из механизмов токсичности аминотиолов является активация процессов перекисного окисления липидов. Так, нами в исследовании культуры фибробластов было получено дозозависимое увеличение концентраций малонового диальдегида, сопровождающееся возрастанием уровня HSP 70 и HSP 90α (табл. 65), что свидетельствует как об активации окислительных процессов, так и включении механизмов внутриклеточной защиты.

Процесс окисления сопровождается образованием неоантигенов. Кроме этого, Hsu и Hsu-T встраиваясь в структуру белков, также вызывают их модификацию. Это в свою очередь приводит к активации гуморального звена иммунной системы и росту уровня иммунных комплексов.

В норме, образовавшиеся иммунные комплексы, фагоцитируются и разрушаются системой протеаз. Патогенные свойства ЦИК определяются совокупностью их физико-химических параметров, к которым, в первую очередь, относятся размеры, состав, концентрация и способность фиксировать комплемент [75, 362]. Молекулярная масса ЦИК определяет их размер, а также скорость элиминации из организма: крупные ЦИК быстро элиминируются и сравнительно малопатогенны; мелкие ЦИК плохо элиминируются, могут откладываться субэндотелиально, но не способны активировать систему комплемента; ЦИКи среднего размера обладают высокой комплементсвязывающей способностью и являются наиболее патогенными. Интенсивность реакций на иммунные комплексы могут быть обусловлены повышением скорости их образования над скоростью элиминации, дефицитом одного или нескольких компонентов комплемента или функциональными дефектами фагоцитарной системы [9].

Полученные нами результаты свидетельствуют о достаточно выраженных изменениях в активности иммунной системы. При I стадии гипертонической болезни значимо снижается уровень ЦИКов средних размеров, что можно объяснить высокими адаптационными возможностями молодых людей. У больных II, III стадии гипертонической болезни показатели пропорциональны тяжести заболевания, что свидетельствует о снижении механизмов элиминации ЦИКов, что как следствие ведет к более выраженному повреждению эндотелия сосудов, развитию его дисфункции и формированию атеросклероза.

Известно, что окисленные ЛПНП (о-ЛПНП), обладают более атерогенными свойствами, чем нативные [24, 89, 130]. Поэтому, многие исследователи указывают на то, что не уровень общего ХС и ХС ЛПНП, а именно содержание о-ЛПНП является наиболее важным диагностическим маркером атеросклероза [24]. Установлено, что окисленные ЛПНП, проявляя иммуногенные свойства,

индуцируют образование специфических аутоантител к ним [55, 130, 179, 229]. Ряд авторов указывает на корреляцию между продукцией антителами к о-ЛПНП и прогрессированием атеросклероза. [168, 235]. С другой стороны, показано атеропротективное действие антител и потенциальный терапевтический эффект [306]. У человека антитела к о-ЛПНП регистрируются как у здоровых лиц, так и пациентов с ишемической болезнью сердца [141]. В литературе имеются единичные и противоречивые данные об изменении содержания о-ЛПНП и антител к ним в зависимости от возраста, стажа курения и сердечно-сосудистой патологии.

Проведенный нами сравнительный анализ концентрации о-ЛПНП и аутоантител к ним при сердечно-сосудистых заболеваниях, показал, что при гипертонической болезни (табл. 9) значения о-ЛПНП существенно не отличались от контрольных, однако при этом содержание антител у больных оказалось ниже контроля на 48,9% ($p < 0,05$). Данный факт может быть обусловлен либо снижением иммунной реакции на о-ЛПНП, либо усилением потребления антител из-за связывания их с антигенами на ранних стадиях атеросклероза. У лиц с ИБС наблюдалось повышение концентрации о-ЛПНП, причем с усилением тяжести заболевания их величины возрастают (табл. 9).

Согласно современным представлениям, нарушение баланса про- и противовоспалительных цитокинов играет большую роль в формировании и прогрессировании атеросклеротического процесса [123, 138, 206, 282]. Эти эндогенные полипептидные медиаторы, за счет оказания ими аутокринного и паракринного эффектов, регулируют межклеточные взаимодействия, физиологические функции и гомеостаз ткани. Аутокринный эффект обеспечивается секрецией ряда ростовых факторов, а паракринный – интерлейкинами (IL)-6, -4, -10 и т.д. [69, 334]. Мишенями паракринного действия цитокинов становятся эндотелиальные клетки, на которых индуцируется экспрессия адгезивных молекул, что вызывает миграцию лейкоцитов в очаг воспаления [92, 126, 128, 142, 193, 316], и тем самым, активации реакций врожденного и адаптивного иммунного ответа [355].

Увеличение содержания в плазме крови цитокинов можно расценить как неспецифический маркер воспалительного процесса [27, 47, 378]. Нами зарегистрирован рост уровней $INF\gamma$, $IL\ 1\beta$, $IL\ 2$, $IL\ 4$, $IL\ 10$, $IL\ 17$, $TNF\alpha$ как при системном воспалительном процессе – у больных гипертонической болезнью (табл. 11), ИБС (табл. 18), так и при местном – у пациентов, страдающих хроническими риносинуситами (табл. 24). Причем, увеличение концентраций этих веществ напрямую зависит от уровня гомоцистеина, что подтверждает наличие воспалительного процесса обусловленного ГГЦ.

Таким образом, подводя итог данному фрагменту исследования, можно выстроить следующую цепочку причинно-следственных взаимоотношений: высокие дозы Нсу, усиливая окислительные процессы, модифицируют ЛПНП, превращая их в неоантигены, тем самым стимулируется ответ иммунной системы. Следствием этого является появление аутоантител против о-ЛПНП и образование иммунных комплексов, фиксирующихся на эндотелиоцитах. Это в свою очередь приводит к активации антителозависимого фагоцитоза и антителозависимой клеточной цитотоксичности, направленной на элиминацию иммунного комплекса, что вызывает повреждение эндотелиоцитов, развитие дисфункции эндотелия (ЭД) и включает механизмы атерогенеза.

Принято считать, что дисбаланс между продукцией вазодилатирующих, ангиопротективных, антипролиферативных факторов, с одной стороны, и вазоконстрикторных, протромботических, пролиферативных факторов, с другой, является дисфункцией эндотелия [49, 161].

Одним из основных маркеров дисфункции эндотелия является увеличение числа циркулирующих эндотелиоцитов – зрелых клеток, появляющихся в циркуляции при слущивании их от сосудистой стенки при ее повреждении [70, 132, 213]. В норме их содержание в периферической крови низкое, так как при отсутствии каких-либо патологических воздействий на эндотелий наблюдается достаточно медленный процесс его обновления с одной стороны, а с другой – быстрое удаление из кровотока погибших клеток [35, 134]. В состав циркулирующих эндотелиоцитов входят десквамированные эндотелиоциты

(апоптические и митотические), специализированные прогениторные клетки (ЕСР). Для связывания лигандов и передачи сигналов активирующих ангиогенез независимо от фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) необходим эндоглин (CD105), являющийся маркером активации эндотелиоцитов [137, 178, 356].

У больных ГБ количество циркулирующих эндотелиоцитов превышало значения в группе контроля и зависело от степени тяжести заболевания. При этом практически все эндотелиальные клетки были живы (табл. 10). У больных второй и третьей стадией ГБ наблюдалось увеличение числа как ЕСР, так и клеток, несущих CD105 (АЕС) (табл. 10), что отображает наличие активных компенсаторных процессов, направленных на восстановление поврежденной сосудистой стенки. При проведении корреляционного анализа обнаружена связь слабой силы (0,287, $p < 0,05$) у больных первой стадией ГБ между уровнем гомоцистеина и эндотелиоцитами, несущими CD34+ антиген. Во вторую и третью стадию связь становится отрицательной и более сильной – -0,396 и -0,488 ($p < 0,05$) соответственно. Кроме этого появляется также отрицательная связь с АЕС – -0,381 и -0,452 ($p < 0,05$) соответственно. Проведенный корреляционный анализ, с одной стороны подтверждает гипотезу повреждающего действия гомоцистеина. С другой стороны – свидетельствует, что ГГЦ является иницирующим фактором в формировании эссенциальной гипертензии.

У лиц, страдающих ишемической болезнью сердца, число десквамированных эндотелиоцитов было больше, чем у больных ГБ. Максимальные значения зафиксированы в группе с острым коронарным синдромом без подъема сегмента ST. Число погибших эндотелиоцитов также было самым высоким у больных с хронической ишемической болезнью сердца (табл. 14).

Кроме циркулирующих эндотелиоцитов, потенциальными маркерами дисфункции эндотелия могут выступать некоторые субстанции, продуцируемые эндотелиоцитами либо при их активации, либо при их гибели. К ним, в частности, относятся провоспалительные цитокины: интерлейкины (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8), ФНО- α , фактор Виллебранда, селектины, С-реактивный белок и пр. [49, 50, 161,

282]. Мы наблюдали рост концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-17 α , интерферона гамма у лиц, страдающих гипертонической болезнью, коррелирующий с тяжестью заболевания.

Доказано, что ГГЦ вызывает усиление активации тромбоцитов, развивающейся как вследствие усиления продукции тромбоксана А₂, так и угнетения активности эктоАДФазы, приводящей к снижению синтеза в эндотелиоцитах простаглицлина [98, 107]. Кроме этого, установлено, что Нсу понижает активность антитромбина III и эндогенного гепарина, ингибирует тромбомодулинзависимую активацию протеинов С и S, что усиливает тромбогенный потенциал крови [160, 167, 211].

Нсу увеличивает экспрессию TF и инициирует внешний путь активации свертывания крови. Развивается тромбинемия, вызывающая усиление синтеза аутоантител к тромбину. В свою очередь появление тромбина приводит к активации факторов V, VIII и других, что неминуемо ведёт к возникновению тромбозов, и как следствие развитию инфаркта миокарда.

Нами показано, что у больных гипертонической болезнью и ИБС наблюдается гиперкоагуляция (табл. 13, 15, 16), сопровождающаяся ростом аутоантител к тромбину и коррелирующая с уровнем Нсу (табл. 19, 20).

Методом пошаговой множественной регрессии нами получено, что толщина комплекса интима-медиа зависит от таких факторов как уровня гомоцистеина, общего холестерина, триглицеридов, интерлейкина 2 и титра аутоантител к тромбину.

Объясняя данный факт, можно предложить следующий вариант событий: гомоцистеин повреждая эндотелий сосудов, с одной стороны, вызывает повышение проницаемости сосудистой стенки и увеличение потока липопротеидов в субэндотелий. Это в свою очередь приводит к активации фагоцитов, выбросу ими факторов роста и активации пролиферации гладкомышечных клеток стенки артерий. С другой стороны – активацию адаптивного звена иммунной системы (проявляющуюся в частности ростом концентрации интерлейкина 2) как за счет появления неоантигенов у поврежденных

эндотелиоцитов, так и за счет модификации липопротеидов, и активации иммунокомпетентных клеток, конкурируя с глутаматом за NMDA-рецептор. С третьей – инициацией гиперкоагуляции, тромбинемии и, как следствие – подъем титра аутоантител к тромбину. Тромбин, обладая провоспалительной активностью, может усиливать спазм сосудов, активировать моноциты и Т-лимфоциты [187, 195], тем самым, поддерживая вторичную альтерацию и хронизацию процесса. Поэтому, рост уровня аутоантител к тромбину – это не только снижение гиперкоагуляции и нормализации микроциркуляции, но и уменьшение воспалительного процесса в сосудистой стенке.

Влияние экзогенной гипергомоцистеинемии на организм животного

Для более глубокого изучения системного ответа на повреждающее воздействие ГГЦ со стороны иммунной системы, нами изучалось влияние экзогенной гипергомоцистеинемии в эксперименте на животных.

Для этого не линейным крысам внутрибрюшинно вводили Нсу в дозе 100 мкмоль на 1 мл ОЦК животного: однократно (первая опытная группа), один раз в сутки в течение 9 дней (вторая опытная группа) и 4 раза в сутки (каждые 6 часов) в течение 9 дней (третья опытная группа). Забор крови производили через 6 часов после последней инъекции Нсу. В первой опытной группе уровень аминотиола в плазме крови возрос практически в 2 раза ($p=0,0117$), у животных второй опытной группы его концентрация увеличилась в 2,7 раза ($p=0,0499$), а в третьей опытной группе – в 7,2 раза ($p=0,00001$) по сравнению с интактными животными. При этом уровень гомоцистеина внутри клеток не изменялся ни в одной из исследуемых групп (табл. 27).

При однократном введении Нсу наблюдалось выраженное снижение числа Т-лимфоцитов и их субпопуляций (табл. 28). На наш взгляд, это может быть обусловлено по крайней мере двумя механизмами: повышенной экспрессией молекул адгезии как эндотелиоцитами, так и лимфоцитами, что обеспечивает адгезию лимфоцитов к сосудистой стенке и тем самым сокращение пула

циркулирующих лимфоцитов, либо взаимодействием повышенной концентрации гомоцистеина с ионотропными рецепторами глутамата. Активация этих рецепторов приводит к усиленному входу ионов кальция и возрастанию уровня активных форм кислорода в клетках, что вызывает активацию как некроза, так и апоптоза и как следствие этого сокращению пула циркулирующих лимфоцитов.

При введении гомоцистеина один раз в сутки в течение недели у опытных животных, очевидно, включились механизмы адаптации, позволяющие животному инактивировать этот аминотиол, как ксенобиотик, вследствие чего зафиксированный нами уровень Нсу достиг лишь пограничных значений. Вероятно, поэтому же, в данной группе не наблюдались изменения ни в общем количестве лимфоцитов, ни в содержании Т-лимфоцитов. Однако, обнаружено резкое увеличение концентраций TNF α , ИФ- γ и особенно IL -17 α (табл. 29 и 30). Так, его уровень в первой опытной группе возрос в 11 раз по сравнению с интактными животными ($p=0,00001$), во второй – в 26 раз ($p=00008$), а в третьей – в 47 раз ($p=0,00001$). ИЛ-17 продуцируется Т-хелперами 17, функцией которых является защита от внеклеточных патогенов, которые не могут эффективно элиминироваться Т-хелперами 1 и 2-го типов [329].

Однако, совершенно иная картина зарегистрирована нами у животных третьей опытной группы, имеющих постоянную ГГЦ на протяжении 9 суток. У этих животных общее число лимфоцитов возрастало, особенно за счет субпопуляции Т-цитотоксических лимфоцитов.

Уровень Нсу у животных с индуцированным иммунодефицитом был выше в 2 раза ($p=0,0001$), чем у интактных животных (табл. 31), что подтверждает регуляторную роль иммунной системы в поддержании его концентрации в нормальном диапазоне.

Через 6 часов после инъекции Нсу его содержание в сыворотке крови у крыс с ИДС повышается и превышает значения группы контроля уже в 3 раза. На фоне введения Нсу-Т наблюдалось увеличение концентрации гомоцистеина (почти в 2 раза), что вероятно, происходит вследствие активации гомоцистеин-тиолактоназы [305].

По истечению девятидневного введения аминотиолов наблюдалось превышение содержания Нсу у иммунодефицитных животных в 2 раза по сравнению с интактными, при этом отличий от значений до нагрузки в этой опытной группе не зафиксировано (табл. 33), что вероятно, обусловлено включением других, механизмов элиминации тиолов [390-391]. При этом наблюдалось снижение числа цитотоксических лимфоцитов (CD3CD8) ($p=0,004$), резкое падение числа В-лимфоцитов – относительное количество снижалось в 4 раза ($p=0,005$), а абсолютное – в 10 раз ($p=0,0001$), что свидетельствует о влиянии повышенных концентраций Нсу на адаптивное звено иммунной системы.

Таким образом, в различных экспериментальных моделях нами получены разнонаправленные сдвиги, что вероятно объясняется динамикой саногенетических механизмов.

При моделировании экзогенной ГГЦ на животных нами показано увеличение экспрессии TF эндотелиоцитами и нейтрофилами. По нашему мнению, именно TF реализует тромбофилический сдвиг, так как является активатором внешнего пути коагуляции и в принципе 90-95% тромбозов связаны с экспрессией этого соединения [189]. Триггерный эффект Нсу в синтезе TF обусловлен как стимулирующим (активация NMDA-рецепторов), так и прямым повреждением клеток, содержащих в геноме матричную РНК тканевого фактора [357, 389]. В частности к таким клеткам относятся эндотелиоциты, экспрессирующие тканевой фактор при своем повреждении. Нами показано, что у животных с индуцированной ГГЦ концентрация эндотелина в сыворотке крови увеличивается более чем в 5 раз, а уровень нитратов и нитритов снижается ($p=0,005$) (табл. 34), что позволяет сделать вывод о развитии дисфункции эндотелия под влиянием избытка аминотиолов.

Таким образом, склонность к гиперкоагуляции при повышении уровня аминотиолов обусловлена в большей степени повышением экспрессии тканевого фактора поврежденными эндотелиоцитами и активированными лейкоцитами.

В экспериментальной модели *in vivo* нами продемонстрировано, что на фоне введения Нсу клетки миокарда погибают как путем апоптоза, так и некроза,

с преобладанием апоптоза (табл. 38). Некроз, как правило, является результатом несоответствия потребностей кардиомиоцитов в кислороде и его доставкой, что при ГГЦ объясняется развитием гиперкоагуляции и нарушением микроциркуляции. В тоже время, эти же процессы, могут запускать и процессы апоптоза. Кроме этого, летальную программу клеток может индуцировать и фактор некроза опухолей [70]. Нами получено значительное увеличение концентрации фактора некроза опухолей α – в 14 раз у экспериментальных животных ($p=0,003$).

Метод главных компонент (табл. 39, 40, 41) позволил нам ранжировать все выявленные нами данные и показал, что экзогенная гипергомоцистеинемия имеет тесную взаимосвязь с относительным содержанием Т-хелперов, цитотоксических лимфоцитов, уровнем интерлейкинов 1α , 17α , 4 и MCP-1, TNF α , INF γ , HNP1-3, LL-37, СРБ, эндотелина, концентрацией нитратов и нитритов, церуплазмину, титром аутоантител к тромбину и иммунными комплексами, а также маркерами апоптоза и некроза кардиомиоцитов. Это в свою очередь подтверждает тот факт, что у экспериментальных животных, помимо формирования очевидных синдромов – дисфункции эндотелия, коагулопатического, текут еще такие синдромы как – цитолитический, синдром системной воспалительной реакции, иммунопатологический.

Единый клеточно-гуморальный ответ организма на экзогенную гипергомоцистеинемия

Гомоцистеин прямо, или косвенно влияет практически на все клетки организма. Причем, низкие концентрации аминотиола вызывают рост, например фибробластов, а высокие – обладают цитотоксическим эффектом. Наиболее чувствительными к увеличению концентрации Hcy считаются эндотелиоциты [257]. Это обусловлено отсутствием у них фермента цистатион- β -синтазы и не возможностью такого пути катаболизма Hcy как транссульфирование [287].

Данный процесс клинически проявляется развитием и прогрессированием ИБС на фоне дисфункции эндотелия.

Некоторые исследователи объясняют токсический эффект Нсу синергизмом активации NMDA рецепторов и метаботропных рецепторов глутамата [18-20, 272].

Описана его способность связываться с группой глутаматных рецепторов, имеющих на нейронах и ряде других клеток: мегакариоцитах, тромбоцитах, эритроцитах, лимфоцитах, нейтрофилах, миокардиоцитах, фибробластах [18, 21, 29, 56, 92, 326].

В физиологических условиях концентрация аминотиолов в плазме крови низка, поэтому они не могут выступать в качестве конкурента при взаимодействии с лиганд-связывающим участком рецепторов. При высоких концентрациях Нсу конкурирует с глутаматом за связывание с рецепторами, вызывает их гиперактивацию, что влечет за собой развитие целого ряда различных эффектов, в том числе и инициацию апоптоза, и изменение функциональной активности иммунокомпетентных клеток [19, 275, 316].

В настоящее время описывают ряд веществ, осуществляющих регуляцию апоптоза и способных как стимулировать, так и ингибировать данный процесс. Одним из них является глутамат, реализующий свое действие через NMDA рецепторы. При концентрации этой аминокислоты свыше 3 мкмоль/л избирательно активируются AMPA-рецепторы, индуцирующие некротические процессы [241]. Исследования последних лет показали, что Нсу может взаимодействовать с сайтом связывания глутамата или глицина NMDA рецептора [18], а значит, может быть рассмотрен как новый эндогенный активатор глутаматных рецепторов [294, 338].

Нами в экспериментах *in vitro* по изучению апоптоза под влиянием Нсу и Нсу-Т показано, что аминотиолы увеличивают экспрессию поверхностного рецептора FAS и фосфотидилсерина на внешней мембране. Причем под воздействием Нсу количество клеток, несущих аннексин V возрастало в 165,3 раза ($p < 0,001$), а NMDA – в 16,3 раза ($p < 0,001$). Содержание Bcl-2 в пересчете на 1

клетку наиболее выражено увеличивалось при внесении NMDA – в 4,6 раз ($p < 0,001$). Гомоцистеин вызвал снижение этого показателя на 36,8% (табл. 49). При исследовании данных показателей на лейкоцитах периферической крови больных ИБС выявлено, что количество CD95+ позитивных лейкоцитов в 10,6 раза выше, чем у здоровых доноров, а содержание Ann V – позитивных клеток – в 108,0 раз ($p < 0,001$). Концентрация Vcl под влиянием Hcy в лизатах мононуклеаров осталась на том же уровне, что и в контроле инкубации. Глутамат повышал Vcl-2 примерно так же, как и в культуре клеток здоровых добровольцев (табл. 51) [64]. Vcl-2 является внутриклеточным мембраносвязанным белком, блокирующим запрограммированную клеточную гибель. Избыточная экспрессия Vcl-2 защищает клетки от смерти, а уменьшение его концентрации приводит клетки к апоптозу [54, 149]. Полученные данные свидетельствуют о том, что Hcy индуцирует запрограммированную клеточную гибель и при этом, механизмы, защищающие клетку от гибели, не включаются.

Активации апоптического процесса под влиянием изучаемых веществ в моноцитах периферической крови не выявлено ни в контрольной группе, ни у больных ИБС (табл. 62). В то время как другие субпопуляции лейкоцитов реагировали на внесение в культуру аминотиолов. Наблюдалось увеличение нейтрофилов, Т-лимфоцитов, несущих маркеры апоптоза, как на клетках здоровых доноров, так и больных ИБС. В-лимфоциты отвечали на повышенные концентрации Hcy и Hcy-T разнонаправлено в культурах клеток здоровых и больных ИБС (рис. 20 и 21), что свидетельствует о различных механизмах влияния Hcy и Hcy-T на клетки организма.

Одним из патофизиологических эффектов ГГЦ является увеличение синтеза коллагена в сосудистой стенке, что приводит к повышению ее плотности и повышению ригидности. Причем накопление коллагена происходит параллельно с нарастанием уровня Hcy [25, 73, 209, 259]. Опытным путем на кроликах установлено, что плотность культуры гладкомышечных клеток увеличивалась на 43% после добавления к ней Hcy. Последующие исследования продемонстрировали, что главную роль в этом процессе играет свободная

тиоловая группа Hcy [39]. Нами получено, что в диапазоне концентраций 12,5-25,0 мкмоль/л под влиянием Hcy усиливается пролиферация фибробластов. Добавление же Hcy в дозе 50,0 мкмоль/л вызывает гибель клеток, накопление в культуральной среде HSP70, IL-6 и резкое снижение IL 10 (табл. 66) [150].

Изучение влияния аминотиолов на функционирование клеток иммунной системы нами проводилось на культурах клеток периферической крови здоровых и больных ИБС. Оказалось, что у больных с атеросклеротическим процессом количество лимфоцитов практически в 2 раза превышает этот показатель в группе контроля ($p=0,001$) (табл. 45) за счет увеличения всех субпопуляций лимфоцитов. Причем наиболее выраженный прирост – в 22,7 раз – наблюдается со стороны T-NK.

Под влиянием аминотиолов количественные сдвиги наблюдались только в популяции T-лимфоцитов. Так, в образцах крови условно здоровых добровольцев под воздействием гипергомоцистеинемии наблюдалось снижение количества T-лимфоцитов за счет фракции T-хелперов. В пробах больных ИБС, под воздействием гипергомоцистеинемии, число T-лимфоцитов не имело значимых различий по сравнению с контролем, но при этом содержание T-хелперов уменьшалось так же, как в образцах крови условно здоровых добровольцев на 20% ($p=0,002$). Уровень цитотоксических лимфоцитов при добавлении Hcy в культуру клеток условно здоровых добровольцев увеличивался на 50% ($p=0,002$), а при добавлении Hcy-T – практически в 2 раза ($p=0,002$), в то время как у больных ИБС эта фракция лимфоцитов увеличивалась на 70% как под воздействием Hcy, так и Hcy-T ($p=0,04$ и $0,008$ соответственно). Уровень T-NK возрастал под влиянием изучаемых аминотиолов только в образцах крови условно здоровых добровольцев (табл. 50).

Полученные нами данные формируют закономерный вопрос – каким образом, при не измененном количестве клеток в культуре, возможны данные сдвиги?

Возможны следующие варианты ответов:

Во-первых, наличием дважды положительных Т-клеток (CD4+CD8+) – ДП Т-клетки, обнаруженных еще в конце прошлого столетия в периферической крови человека. В среднем, от общей популяции Т-лимфоцитов их число составляет от 1 до 3% [188, 192]. В то же время в отдельных случаях у здоровых людей в периферической крови может содержаться значительная доля ДП Т-клеток [195]. Показано, что большинство из них имеют фенотип клеток памяти и способны продуцировать более высокие уровни цитокинов, чем клетки, экспрессирующие по отдельности маркеры CD4+ и CD8+ [188, 199, 211, 215, 280, 284].

Во-вторых, возможна модификация рецепторного аппарата клеток Hсу и Hсу-Т. Так нами в предыдущих исследованиях было показано, что высокие концентрации Hсу вызывают модификацию белковых структур организма [65, 120]. Модификация возможна как за счет разрыва дисульфидных связей гомоцистеином [16], так и путем образования N-гомоцистеинилированных белков при взаимодействии с ними Hсу-Т. Тиолактон гомоцистеина является ацилирующим агентом и при нормальных условиях предпочтительнее реагирует с ϵ -аминогруппой бокового радикала лизина [194]. Кроме этого, доказано, что ГГЦ активирует процессы перекисного окисления липидов, и образовавшиеся в большом количестве свободные радикалы также могут изменять химическую структуру белковых молекул.

CD4 рецептор представляет собой одноцепочечную молекулу, состоящую из четырех иммуноглобулинподобных доменов. Домены D1 и D2, а также D3 и D4 образуют между собой парные, плотноупакованные, жесткие структуры. Эти пары соединены гибким шарнирным участком, в составе которого присутствует аминокислота лизин. CD8 структурно отличается от маркера Т-хелперов. Он представляет собой гетеродимер, каждая цепь которого включает один иммуноглобулинподобный домен [298]. Исходя из выше сказанного, можно предположить, что в первую очередь происходит модификация протеинов CD4 рецептора.

В-третьих, стимуляцией протеолитического шеддинга, являющегося в свою очередь следствием активации моноцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов на

фоне атеросклеротического процесса у больных ИБС [357]. Протеолитическое отщепление внеклеточной части мембранных белков с поверхности клеток или кливедж (расщепление) – процесс достаточно распространенный и в его реализации участвуют различные типы ферментов, как внеклеточные – цинк-зависимые, сериновые и аспартил-зависимые протеиназы, так и внутриклеточные протеолитические ферменты клеток, что приводит к образованию растворимых форм рецепторов. И, как следствие, уменьшению поверхностных структур.

Практически все Т-клеточные реакции усиливают течение атеросклероза, но при этом, некоторые Т-клеточные субпопуляции могут ограничивать воспаление и замедлять прогрессирование патологии. Так, охарактеризованы несколько популяций лимфоцитов с регуляторными свойствами: клетки, продуцирующие ИЛ-10 и ТФР-бета, CD8+CD28-Т-клетки, CD3+CD4-CD8-Т-клетки, гамма-дельта-Т-клетки [96, 103, 162, 290, 337]. Наиболее выраженными регуляторными функциями обладает субпопуляция клеток, экспрессирующих альфа-цепь рецептора ИЛ-2 (CD25+). Это является свидетельством ИЛ-2-зависимой стадии ответа Т-лимфоцитов на патоген, обеспечивающей вступление покоящихся Т-лимфоцитов в клеточный цикл [318]. CD25 позитивные моноциты осуществляют слаженность работы с Т-хелперами 1 типа.

В нашем исследовании CD25+ позитивных клеток было существенно больше в периферической крови больных ИБС, чем в пробах условно здоровых добровольцев, что так же является подтверждением вовлеченности иммунной системы в механизмы формирования атеросклеротического процесса.

При этом, ответ клеток, инкубированных с Нсу и Нсу-Т у здоровых и больных ИБС имел разнонаправленные сдвиги: под влиянием высоких доз Нсу в крови здоровых увеличивалось число Т-хелперов и моноцитов, а Нсу-Т – В-лимфоцитов и CD14+клеток (табл. 53). Биологическая роль CD4+CD25+Т-лимфоцитов заключается в поддержании клонального баланса среди различных популяций лимфоидных клеток для предотвращения избыточной активации иммунной системы [337]. Повышение их числа приводит к активации как аутоиммунных, так и воспалительных процессов. Таким образом, повышение

концентраций Нсу вызывает активацию клеточного звена иммунной системы, а Нсу-Т – гуморального.

В культуре клеток периферической крови больных ИБС возрастал уровень Т-хелперов только при инкубации с Нсу, и практически в 2 раза снижалось количество цитотоксических Т-лимфоцитов под влиянием как Нсу, так и Нсу-Т (табл. 52). Это, в свою очередь, указывает на угнетение клеточного звена иммунитета аминотиолами у больных с атеросклерозом, что вероятно обусловлено у них срывом механизмов адаптации к высоким значениям Нсу.

Еще одним маркером, характеризующим регуляторную функцию лимфоцитов, является α -цепь рецептора IL-7 (CD 127+). Показано, что клетки, несущие этот антиген, обладают высокой супрессивной активностью [191, 324]. Зарегистрированные нами сдвиги как в культуре клеток периферической крови относительно здоровых добровольцев, так и больных ИБС, носили однонаправленный характер, причем и при внесении Нсу, и Нсу-Т. Наблюдалось увеличение Т-хелперов, цитотоксических лимфоцитов и моноцитов, несущих этот маркер. Количественных сдвигов со стороны В-лимфоцитов в образцах здоровых добровольцев не обнаружено, в то время как в культуре клеток больных ИБС их количество увеличивалось почти в 2,5 раза (табл. 54).

Оценивая популяцию Т-регуляторных (CD3+ CD4+ CD25+ CD127-) в крови доноров и лиц, страдающих ИБС получено, что у больных с атеросклеротическим процессом их в 1,9 раз больше ($p=0,001$). Внесение в культуру клеток периферической крови аминотиолов и NMDA вызывало рост числа клеток с этим фенотипом, более выраженным в культуре клеток доноров.

Известно, что ответ иммунной системы на любой антиген сопровождается не только активацией эффекторных Т-лимфоцитов, направленной на элиминацию антигена, но и регуляторных Т-лимфоцитов, специфичных к данному антигену и необходимых для ограничения экспансии эффекторных клеток и иммунного ответа в целом [78].

Полученные нами данные свидетельствуют, что в нашем организме присутствуют антиген-специфические Treg к Нсу и Нсу-Т. Причем, у больных с

атеросклеротическим процессом наблюдается дезадаптация активации иммунной системы.

Экспрессия молекул адгезии на общей цитоплазматической мембране также характеризует функциональную активность клеток. Адгезивные взаимодействия необходимы для реализации 3 важных клеточных функций: миграции в очаги воспаления, хоминга в лимфоидную ткань и ко-стимуляции клеточной активации [12, 28, 81, 107, 193, 226]. В супернатанте культуры клеток периферической крови больных ИБС концентрация ICAM-1 и P-селектина была значительно выше, нежели чем в культуре клеток здоровых (табл. 48). Помимо этого, наблюдалось увеличение количества лиганда P-селектина (CD162) на Т-хелперах здоровых под воздействием Hcy в 3,3 раза ($p=0,003$), Hcy-T – в 1,6 раза ($p=0,047$); в популяции цитотоксических лимфоцитов – на 30% при внесении Hcy ($p=0,023$). Напротив, в культуре клеток периферической крови больных ИБС этот маркер снижался на 23% ($p=0,002$) под влиянием Hcy-T (табл. 55).

Изменения в экспрессии L-селектина (CD62L+) зафиксировано только на моноцитах. Причем, на клетках доноров под воздействием Hcy его количество возрастало на 15% ($p=0,002$), а Hcy-T – уменьшалось более чем в 2 раза ($p=0,002$). Клетки крови больных ИБС отвечали на введение аминотиолов однонаправленно – как под воздействием Hcy, так и Hcy-T число моноцитов, несущих L-селектин – увеличивалось в 2,2 ($p=0,002$) и 2,6 раза ($p=0,003$) соответственно (табл. 62).

Увеличение числа молекул лиганда для P-селектина на В-лимфоцитах и Т-хелперах может быть обусловлено их готовностью к межклеточной кооперации и активацией гуморального звена иммунной системы против модифицированных аминотиолами белковых структур организма. Это же подтверждается и более высоким содержанием P-селектина и ICAM-1 у больных ИБС, и ростом их концентраций в культурах периферической крови исследуемых групп под влиянием аминотиолов.

Уменьшение количества CD162 позитивных клеток и лиц, страдающих атеросклеротическим процессом, вероятно, обусловлено рядом причин:

- закрытие лиганда либо Р-селектином, находящемся, например, на поверхности микровезикулы, либо аутоантителами против данного антигена;
- стимуляция протеолитического шеддинга, являющегося в свою очередь следствием активации моноцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов на фоне атеросклеротического процесса у больных ИБС;
- вступлением клетки в процесс апоптоза после выполнения ею функции.

Внесение в культуры клеток периферической крови аминотиолов вызывало разнонаправленные сдвиги в изучаемых показателях у доноров и лиц, страдающих ИБС. Данный факт, вероятно, обусловлен, тем, что клетки, пациентов с атеросклеротическим процессом, в отличие от здоровых, адаптированы к высоким концентрациям Нсу и Нсу -Т.

Молекулы адгезии необходимы клеткам для выполнения практически всех своих функций. Любое межклеточное взаимодействие подразумевает участие разнообразных молекул адгезии. В частности, благодаря им, возможно образование коагрегатов, позволяющих клеткам, входящих в их состав более широко выполнять свои функции.

Нами установлено, что изначально число нейтрофило-тромбоцитарных и моноцитарно-тромбоцитарных коагрегатов у больных ИБС значимо выше, чем у здоровых добровольцев. Внесение Нсу и Нсу-Т в культуры клеток периферической крови здоровых доноров, так и лиц, страдающих атеросклерозом вызывали более сильный эффект, чем глутамат, но с соблюдением одной и тоже тенденции – рост числа коагрегатов, в большей степени в культурах клеток больных ИБС (рис. 23 и 24).

Число клеток, несущих на своей поверхности тканевой фактор (CD142) у больных ИБС больше, чем у относительно здоровых доноров. При этом, внесение в культуру клеток периферической крови Нсу и Нсу-Т вызывает увеличение числа CD142 позитивных моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов, с более выраженной реакцией лейкоцитов у больных ИБС. Так, экспрессия тканевого фактора моноцитами относительно здоровых доноров под воздействием Нсу возрастает в

1,9, а у больных ИБС – в 2,8 раз, лимфоцитами в 5,9 и 9,7 раз соответственно (табл. 57, рис. 25 и 26).

Уровень тканевого активатора плазминогена также существенно изменялся в культуральной среде клеток периферической крови, больных ИБС. Так, в культуре клеток доноров он увеличился на 23% только под воздействием Нсу-Т, в то время как в культуре клеток, больных ИБС на 55% как при влиянии Нсу, так и Нсу-Т. Напротив, концентрация ингибитора активатора плазминогена наиболее существенно возрастала в культуре клеток доноров (табл. 50). На фоне всех этих изменений коагулологическими методами зафиксирована прокоагулянтная активность культуральной среды опытных образцов (табл. 50).

Заключение

Таким образом, подводя итог нашему исследованию, можно с уверенностью констатировать, что экзогенная гипергомоцистеинемия оказывает доза-зависимое влияние, вызывая как функциональные, так и структурные изменения в организме. Причем повышение концентрации Нсу вызывает как прямое повреждение (например, гибели фибробластов при уровне Нсу 50 мкмоль/л в культуральной среде) в первую очередь, путем активации окислительного стресса, так и опосредованное (модификация белков организма, образование окисленных форм ЛПНП, конкурентное взаимодействие за глутаматные рецепторы и т.д.).

Показано, что повышение концентрации гомоцистеина в кровотоке приводит как к повреждению эндотелия сосудов, вызывая развитие его дисфункции, так и лейкоцитов. Причем, в большей степени, наблюдается реакция со стороны Т-лимфоцитов. Но, у здоровых лиц, и страдающих атеросклеротическим процессом, ответ разный. Так, у доноров высокие цифры аминотиолов вызывают снижение числа и активности Т-хелперов и увеличение цитотоксических Т-лимфоцитов. У больных ИБС – напротив резко уменьшается количество CD8-Т-лимфоцитов. При этом, во всех группах наблюдается

увеличение экспрессии молекул адгезии, тканевого фактора, маркеров апоптоза всеми видами лейкоцитов, более выраженное в культурах периферической крови больных ИБС.

В то же время, нами продемонстрировано, что низкие концентрации Hcy стимулируют рост фибробластов и синтез ими коллагена.

Активация единой клеточно-гуморальной системы защиты организма в первую очередь направлена на локализацию повреждения, элиминацию повреждающего фактора и восстановление нарушенной структуры и функции ткани. Но при этом, гиперкоагуляция способствует развитию тромбоэмболических осложнений, активация иммунной системы – образованию аутоантител к собственным структурам организма и запуску аутоиммунных процессов, в том числе атеросклерозу, стимуляция неспецифической резистентности организма – ускорение процесса перекисного окисления липидов, интенсификация образования лейкоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов, повышенному синтезу хемокинов, факторов роста, повышенная выработка IL-1 β , IL-6, TNF- α усиливает вторичную альтерацию и приводит к воспалительному каскаду событий, влияющих на течение фолатного цикла, что приводит к развитию ГГЦ.

Таким образом, нарушение поддержания аминотиолов на постоянном уровне инициирует, ускоряет и поддерживает развитие воспалительного процесса в организме.

Учитывая результаты, полученные нами в ходе исследования, а также литературные данные, механизм развития атеросклероза и артериальной гипертензии на фоне ГГЦ представлен в схеме, отраженной на рисунке 29.

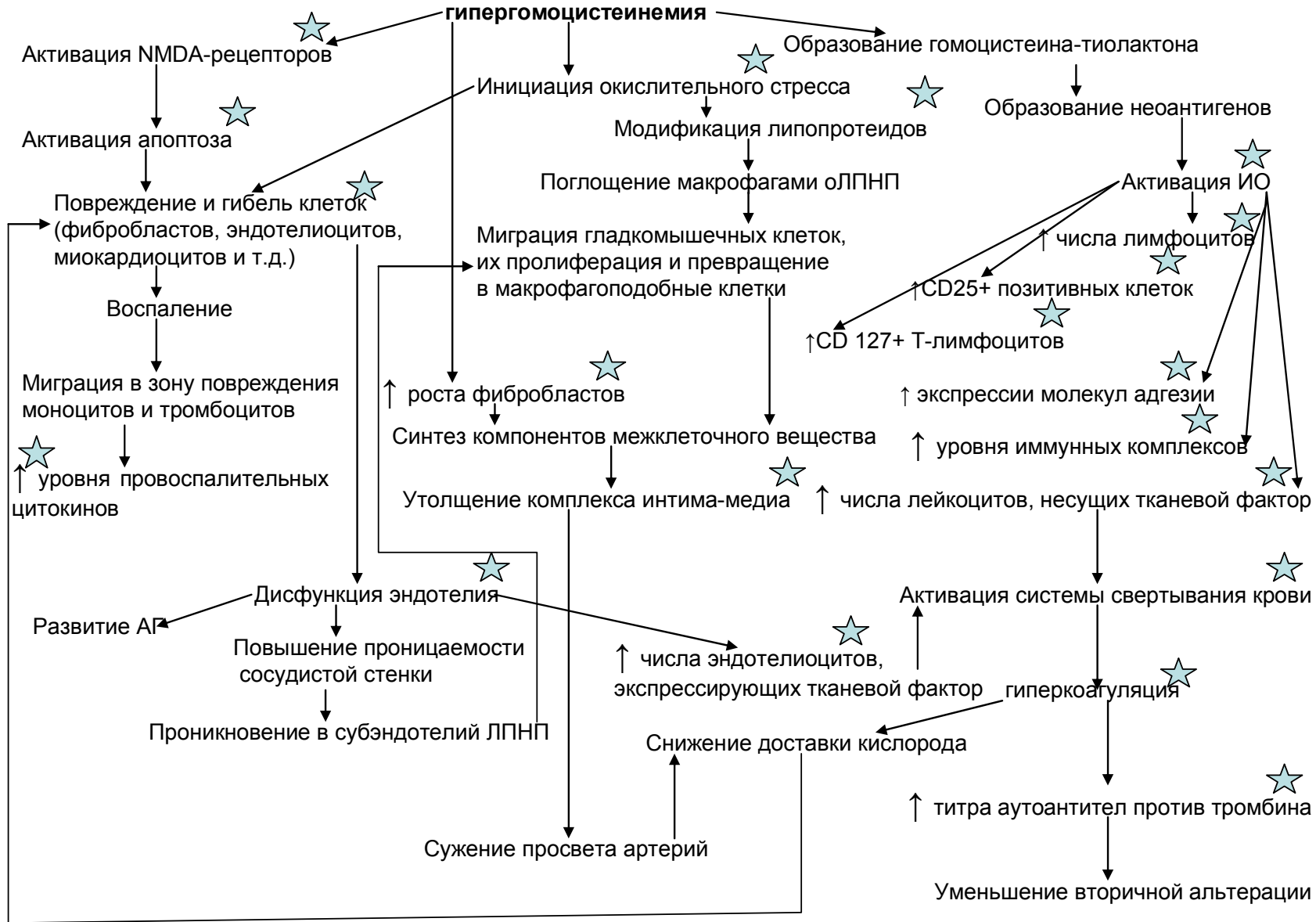


Рисунок 29. Патогенное действие гипергомоцистеинемии в схеме. Звездочкой обозначены собственные данные.

ВЫВОДЫ

1. Экзогенная гипергомоцистеинемия вызывает развитие дисфункции эндотелия, с увеличением числа циркулирующих эндотелиоцитов, уровня эндотелина, снижением концентрации нитратов и нитритов, формированием гиперкоагуляции, обусловленной повышенным представителем TF на мембранах эндотелиоцитов, нейтрофилов и фибробластов.
2. Наиболее высокий уровень окисленных липопротеидов и аутоантител к ним зафиксирован у здоровых людей в возрасте от 18 до 35 лет. Их концентрация зависит от уровня гомоцистеина, от курения, тяжести ИБС и стадии гипертонической болезни.
3. У больных с атеросклеротическим процессом концентрация гомоцистеина повышена, что сопровождается увеличением количества лимфоцитов в этой группе практически в 2 раза, за счет прироста всех субпопуляций лимфоцитов, повышением содержания CD25 и CD127 позитивных клеток, а также лейкоцитов, несущих на своей поверхности TF, накоплением в сыворотке крови молекул адгезии – ICAM-1, p-селектина.
4. Гипергомоцистеинемия вызывает повреждение структур организма путем активации окислительных процессов, апоптоза, образования конъюгатов, что сопровождается развитием дисфункции эндотелия, формированием гиперкоагуляции, сдвигами в цитокиновом профиле и стимуляции адаптивного иммунного ответа, с преобладанием клеточного звена иммунной системы.
5. По данным анализа пошаговой множественной регрессии к показателям, влияющими на толщину комплекса интима-медиа относятся уровень гомоцистеина, общего холестерина, триглицеридов, концентрация интерлейкина-2 и титр аутоантител к тромбину.
6. Гомоцистеин и гомоцистеин-тиолактон образуют конъюгаты с сывороточным альбумином. Выявлено наличие аутоантител к конъюгатам альбумина и гомоцистеина у интактных животных, и увеличение их количества при нагрузке тиолами. Максимальная концентрация аутоантител класса IgG в сыворотке крови

к модифицированному гомоцистеином альбумину наблюдается у больных стабильной и прогрессирующей стенокардией.

7. Изменения в иммунограмме у интактных и иммунодефицитных животных под влиянием высоких доз аминотиолов носят однонаправленный характер: однократное введение гомоцистеина сопровождается выраженным снижением числа Т-лимфоцитов и их субпопуляций. Постоянная гипергомоцистеинемия на протяжении 9 суток вызывает увеличение общего числа лимфоцитов, за счет цитотоксических Т-лимфоцитов.
8. Введение гомоцистеина вызывает развитие гиперкоагуляции, обусловленной повышенной экспрессией тканевого фактора. Так, в эндотелиоцитах его экспрессия увеличивалась тканевого фактора более чем в 3 раза, в нейтрофилах – практически в 10 раз.
9. У крыс с индуцированной гипергомоцистеинемии уменьшалось число кардиомиоцитов, за счет их гибели как путем апоптоза, так и некроза, с преобладанием процессов апоптоза.
10. Повышенные концентрации гомоцистеина вызывают снижение числа Т-хелперов и увеличение цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-НК в культуре периферической крови здоровых и больных ИБС. Высокая концентрация гомоцистеина-тиолактона приводит к росту количества Т-хелперов в популяции клеток доноров, и снижению у больных ИБС. При этом, в культуре клеток здоровых лиц в большей степени нарастает уровень цитотоксических Т-лимфоцитов.
11. Гипергомоцистеинемия сопровождается ростом числа клеток, несущих молекулы адгезии (CD162, CD62L) и тканевого фактора, а также увеличением CD25 и CD127 позитивных Т-хелперов как в культуре клеток здоровых, так и больных ИБС.
12. Уровень CD95 и аннексин V позитивных лейкоцитов у больных ИБС выше, чем у доноров. Введение в культуру клеток периферической крови аминотиолов вызывают рост CD95 и аннексин V-позитивных лейкоцитов, как в популяции CD 45 позитивных клеток, так и у отдельных подвидов, за исключением моноцитов.
13. Диапазон концентраций гомоцистеина от 12,5 до 25,0 мкмоль/л усиливает пролиферацию фибробластов, а доза в 50,0 мкмоль/л вызывает их гибель,

накопление в культуральной среде содержания HSP-70 b, IL-6 и резкое снижение уровня IL-10.

14. Гипергомоцистеинемия вызывает повреждение структур организма, что инициирует активацию единой клеточно-гуморальной системы защиты организма, проявляющуюся в развитии гиперкоагуляции, росте числа лейкоцитарно-тромбоцитарных коагратов, увеличение уровня аутоантител, цитокинов, молекул адгезии, изменение фенотипа лимфоцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абушик П.А. Механизмы нейротоксичности, вызванной активацией рецепторов глутамата в центральных и периферических нейронах крысы : специальность 03.03.01 : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Абушик Полина Александровна – Санкт-Петербург, 2014. – 113 с.
2. Аймагамбетова А.О. Цитокиновый профиль у больных инфаркт миокарда / А.О. Аймагамбетова, Л. К. Каражанова, А. Котляр // Клиническая медицина. – 2017. – Т. 95, № 3. – С. 233–237.
3. Активация макрофагов при атеросклерозе. Сообщение 1. Активация макрофагов в норме и в атеросклеротическом поражении / Н.Г. Никифоров, В.Ю. Корниенко, В.П. Карагодин [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2015. – Т. 59, № 3. – С. 128–131.
4. Активация макрофагов при атеросклерозе. Сообщение 2. Факторы, влияющие на активацию макрофагов / Н.Г. Никифоров, Н.В. Елизова, Н.А. Никитина [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2016. – Т. 60, № 1. – С. 59–64.
5. Аншелес А.А. Определение уровня эндотелиальных прогениторных клеток фенотипа CD34+CD133+CD309+ у больных ишемической болезнью сердца на фоне терапии различными дозами аторвастатина / А.А. Аншелес, А.В. Рвачева, И.В. Сергиенко // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2017. – № 1. – С. 23–26.
6. Апоптоз и рецепторная специфичность его механизмов при нейротоксическом действии глутамата / А.А. Евстратова, Е.В. Миронова, Е.А. Дворецкова [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2008. – № 94. – С. 380–393.

7. Арабидзе Г.Г. Клиническая иммунология атеросклероза – от теории к практике // Атеросклероз и дислипидемии. – 2013. – № 1. – С. 4–19.
8. Арзуманян Е.С. Механизмы токсического действия гомоцистеиновой кислоты на нейрональные клетки / Е.С. Арзуманян, М.С. Степанова // Нейрохимия. – 2010. – № 27 (3). – С. 251–256.
9. Атерогенез у человека – клинические аспекты циркулирующих иммунных комплексов / Я.Д. Бабинцева, А.М. Сергеева, В.П. Карагодин [и др.] // Клиническая медицина. – 2016. – Т. 94, № 5. – С. 325–332.
10. Аутоантитела к альбумину, модифицированному гомоцистеином, в эксперименте / С.В. Измestьев, Е.В. Фефелова, П.П. Терешков [и др.] // Забайкальский медицинский вестник. – 2013. – № 1. – С. 136–140.
11. Белушкина Н.Н. Заболевания, связанные с нарушением регуляции программируемой клеточной гибели / Н.Н. Белушкина, Т.Н. Хомякова, Ю.Н. Хомяков // Молекулярная медицина. – 2012. – № 2. – С. 3–10.
12. Бельченко Д.И. Активация межклеточных взаимодействий в циркулирующей крови и микроциркуляция / Д.И. Бельченко, А.В. Есипов, Е.Л. Кривошеина // Региональное кровообращение и циркуляция. – 2005. – Т. 4, № 4. – С. 53–57.
13. Березовская Г.А. Интенсивность образования тромбина и сократительная способность миокарда у больных ишемической болезнью сердца после коронарного стентирования / Г.А. Березовская, Е.С. Клокова // Региональное кровообращение и микроциркуляция. – 2017. – Т. 16, № 2 (62). – С. 63–69.
14. Биологическая активность фракций липопротеидов высокой плотности и их роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний / Я.Д. Бабинцева, Л. Камон, Д. Чепмен [и др.] // Терапевтический архив. – 2016. – Т. 88, № 9. – С. 111–118.
15. Биологическая роль свободных радикалов в развитии патологических состояний / А.О. Сыровая, Ф.С. Леонтьева, И.В. Новикова [и др.] // Международный медицинский журнал. – 2012. – № 3. – С. 98–104.
16. Блашко Э.Л. Исследование транспортных форм гомоцистеина при различных состояниях организма : диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук / Блашко Эдуард Львович – Санкт-Петербург, 2007. – 22 с.

17. Болдырев А.А. Свободные радикалы в нормальном и ишемическом мозге / А.А. Болдырев, М.Л. Куклей // Нейрохимия. – 2006. – Т. 23, № 3. – С. 165–172.

18. Болдырев А.А. NMDA-рецепторы в клетках иммунной системы / А.А. Болдырев, Е.А. Брюшкова, Е.А. Владыченская // Биохимия. – 2012. – Т. 77, №2. – С. 160–168.

19. Болдырев А.А. Гомоцистеиновая кислота вызывает окислительный стресс лимфоцитов, усиливая токсический эффект NMDA // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 140, № 7. – С. 39–44.

20. Болдырев А.А. Почему токсичен гомоцистеин // Природа. – 2009. – № 10. – С. 18–23.

21. Брюшкова Е.А. Влияние гомоцистеина на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами крыс : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Брюшкова Екатерина Александровна; Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова. – Москва, 2012. – 120 с.

22. Бутенко А.В. Гомоцистеин: влияние на биохимические процессы в организме человека // Молодой ученый. – 2016. – № 1. – С. 78–82. – URL: <https://moluch.ru/archive/105/24912/> (дата обращения: 30.01.2018).

23. Васина Л.В. Эндотелиальная дисфункция и ее основные маркеры / Л.В. Васина, Н.Н. Петрищев, Т.Д. Власов. – DOI 10.24884/1682-6655-2017-16-1-4-15 // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2017. – № 16 (1). – С. 4–15.

24. Взаимодействие нативных и модифицированных липопропротеидов низкой плотности с клетками интимы при атеросклерозе / Н.Г. Никифоров, А.Н. Грачев, И.А. Собенин [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная медицина. – 2013. – № 1. – С. 109–117.

25. Взаимосвязь значений гомоцистеина, пролина и глицина с клиническим течением пароксизмальной и персистирующей форм фибрилляции предсердий /

- В.А. Снежицкий, Е.С. Яцкевич, Е.М. Дорошенко [и др.] // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2015. – № 1 (49). – С. 56–62.
26. Виноградов В.Л. Гипергомоцистеинемия как фактор тромботического риска (дискуссия) / В.Л. Виноградов, Е.Б. Орел, С.А. Васильев // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2009. – № 3 (39). – С. 13–20.
27. Витковский Ю.А. Роль цитокинов в регуляции системы гемостаза : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Витковский Юрий Антонович; Читинский государственный институт. – Чита, 1997. – 39 с.
28. Витковский Ю.А. Патогенетическое значение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии / Ю.А. Витковский, Б.И. Кузник, А.В. Солпов // Медицинская иммунология. – 2006. – Т. 8, № 5-6. – С. 745-753.
29. Владыченская Е.А. Влияние гомоцистеина и гомоцистиновой кислоты на глутаматные рецепторы лимфоцитов крысы / Е.А. Владыченская, О.В. Тюлина, А.А. Болдырев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 142, № 7. – С. 55–58.
30. Влияние активности факторов внутреннего каскада коагуляции и гемостатических маркеров эндотелиальной дисфункции на тромботические осложнения у пациентов с атеросклеротическими заболеваниями периферических артерий / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе [и др.] // Новости хирургии. – 2017. – Т. 25, № 6. – С. 643–654.
31. Влияние гипергомоцистеинемии на систему гемостаза у никотинзависимых лиц / Е.В. Фефелова, Н.В. Исакова, П.П. Терешков [и др.] // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2014. – № 1 (57). – С. 62–65.
32. Влияние гомоцистеина на свойства нейтрофилов, активированных *in vivo* / Е.А. Брюшкова, Е.А. Владыченская, М.С. Степанова [и др.] // Биохимия. – 2011. – № 76 (4). – С. 573–580.
33. Влияние курения и артериальной гипертензии на содержание окисленных липопротеинов низкой плотности и антител к ним у практически здоровых лиц и пациентов с ишемической болезнью сердца / Е.В. Фефелова, М.В. Максименя,

- П.П. Терешков [и др.] // Забайкальский медицинский вестник. – 2014. – № 4. – С. 154–158. – URL: <http://chitgma.ru/zmv2> (дата обращения: 10.09.2017).
34. Гаврилюк Е.В. Роль иммунных нарушений в патогенезе артериальной гипертензии / Е.В. Гаврилюк, А.И. Конопля, А.В. Караулов // Иммунология. – 2016. – Т. 37, № 1. – С. 29–35.
35. Гетерогенность клеток эндотелия / М.К. Живень, И.С. Захарова, А.И. Шевченко [и др.] // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19, № 4/2. – С. 104–112.
36. Гипергомоцистеинемия в генезе оксидативных нарушений у больных с тяжелым течением гемофилии / В.Д. Каргин, В.Е. Солдатенков, С.И. Капустин [и др.] // Вестник гематологии. – 2017. – Т. 13, № 3. – С. 37.
37. Гомоцистеин – предиктор патологических изменений в организме человека / И.И. Мирошниченко, С.Н. Птицына, Н.Н. Кузнецова [и др.] // Российский медицинский журнал. – 2009. – Т. 17, № 4. – С. 224–227.
38. Гомоцистеин и психическое здоровье / И.И. Мирошниченко, Ю.М. Калмыков, О.Б. Яковлева [и др.] // Психиатрия. – 2010. – № 2. – С. 67–71.
39. Гомоцистеин как прогностический маркер предсердного ремоделирования и клинического течения у пациентов с пароксизмальной и персистирующей формой фибрилляции предсердий / В.А. Снежицкий, Е.С. Яцкевич, Е.М. Дорошенко [и др.] // Клиническая медицина. – 2016. – Т. 94, № 1. – С. 16–22.
40. Губский Ю.И. Смерть клетки: свободные радикалы, некроз, апоптоз : монография / Ю.И. Губский. – Винница : Нова Книга, 2015. – 360 с.
41. Гуморальный иммунный ответ на окисленные липопротеиды у никотинзависимых лиц в зависимости от стажа курения / Е.В. Фефелова, П.П. Терешков, Н.Н. Цыбиков [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2016. – № 2. – С. 39–43.
42. Давыдчик Э.В. Взаимосвязь гипергомоцистеинемии с ишемической болезнью сердца и сахарным диабет / Э.В. Давыдчик, В.А. Снежицкий, Л.В. Никонова // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2015. – № 1 (49). – С. 9–13.

43. Десалирированные липопротеины низкой плотности в крови человека / А.И. Рыжкова, В.П. Карагодин, В.Н. Сухоруков [и др.] // Клиническая медицина. – 2017. – Т. 95, № 3. – С. 216–221.
44. Диагностическая значимость показателей липидного профиля, общего гомоцистеина и NT-PROBNP у пациентов с прогрессирующим течением облитерирующего атеросклероза сосудов нижних конечностей / Ю.С. Винник, С.С. Дунаевская, Е.С. Подрезенко [и др.] // Хирургическая практика. – 2015. – № 3. – С. 33–35.
45. Динамика воспалительного процесса у больных с острым коронарным синдромом и больных со стабильной стенокардией. Сообщение 1. Биохимические и иммунологические аспекты / В.В. Кухарчук, К.А. Зыков, В.П. Масенко [и др.] // Кардиологический вестник. – 2007. – № 2 (14). – С. 48–55.
46. Динамика изменений АДФ и тромбин-индуцированной агрегационной активности тромбоцитов в присутствии избытка гомоцистеина *in vitro* / А.С. Роткина, Е.П. Романова, А.А. Московцев [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2012. – № 4. – С. 80–87.
47. Динамика уровня провоспалительных цитокинов при различных вариантах течения острого инфаркта миокарда / О.В. Солдатова, А.В. Кубышкин, А.В. Ушаков [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – № 16 (1). – С. 92–100.
48. Дисфункция эндотелия при экспериментальной гипергомоцистеинемии / Н.Н. Цыбиков, Е.В. Фефелова, П.П. Терешков [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2016. – Т. 60, № 3. – С. 42–46.
49. Дисфункция эндотелия. Патогенетическое значение и методы коррекции / под редакцией Н.Н. Петрищева. – Санкт-Петербург : ИИЦ ВМА, 2007. – 296 с.
50. Дремина Н.Н. Эндотелины в норме и патологии / Н.Н. Дремина, М.Г. Шурыгин, И.А. Шурыгина // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 10/2. – С. 210–214.
51. Дунаевская С.С. Развитие эндотелиальной дисфункции при облитерирующем атеросклерозе сосудов нижних конечностей и маркеры

- прогнозирования течения заболевания / С.С. Дунаевская, Ю.С. Винник // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – Т. 16, № 1. – С. 108–118.
52. Дутов А.А. Определение гомоцистеина и цистеина в плазме/сыворотке крови ВЭЖХ методом с УФ детекцией и твердофазной экстракцией на полимерном сорбенте / А.А. Дутов, Д.А. Никитин, А.А. Федотова // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56, вып. 5. – С. 609–615.
53. Евдонин А.Л. Внеклеточный белок теплового шока 70 и его функция / А.Л. Евдонин, Н.Д. Медведева // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 2. – С. 130–137.
54. Едранов С.С. Апоптоз как фактор организации посттравматического воспаления // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. – № 2. – С. 100-104.
55. Жданова О.Ю. Аутоантитела к модифицированным липопротеинам человека и их роль в атерогенезе : специальность 03.00.04 : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Жданова Ольга Юрьевна – Санкт-Петербург, 2005. – 17 с.
56. Зайнуллина Л.Ф. Регуляция NMDA-рецепторами функций Т-лимфоцитов человека : специальность 03.01.04 : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Зайнуллина Лиана Фанзилевна – Уфа, 2013. – 22 с.
57. Зобова Д.А. Роль гомоцистеина в патогенезе некоторых заболеваний / Д.А. Зобова, С.А. Козлов // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2016. – № 3 (39). – С. 132–144.
58. Иванов, А. В. Разработка аналитических методов фракционного исследования гомоцистеина и других аминотиолов плазмы крови для оценки ишемических повреждений головного мозга : специальность 14.03.03 : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Иванов Александр Владимирович. – Москва, 2015. – 124 с.
59. Изменение фенотипа лимфоцитов при экспериментальной гипергомоцистеинемии / Е.В. Фефелова, П.П. Терешков, С.В. Измestьев [и др.] // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, № 5. – С. 51.

60. Изменение фенотипа лимфоцитов периферической крови здоровых и больных ишемической болезнью сердца при экзогенной гипергомоцистеинемии / Е.В. Фефелова, П.П. Терешков, Н.Н. Цыбиков [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2020. – Т. 64, № 3. – С. 87-92.
61. Изменения структуры миокарда и сдвиги в периферической крови при экспериментальной гипергомоцистеинемии / Е.В. Фефелова, С.В. Измestьев, А. В. Сепп [и др.] // Забайкальский медицинский вестник. – 2014. – № 2. – С. 114–118. – URL: <http://chitgma.ru/zmv2> (дата обращения: 20.08.2019).
62. Измestьев С.В. Иммуные механизмы компенсации гипергомоцистеинемии : специальность 14.03.03 : автореферат диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Измestьев Сергей Валерьевич – Чита, 2013. – 22 с.
63. Иммуный статус и артериальное давление у пациентов с артериальной гипертонией / Е.В. Гаврилюк, В.П. Михин, А.И. Конопля [и др.] // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19, № 5. – С. 287.
64. Индукция апоптоза лейкоцитов под влиянием аминотиолов в краткосрочной культуре клеток / Е.В. Фефелова, П.П. Терешков, М.В. Максименя [и др.] // Забайкальский медицинский вестник. – 2016. – № 2. – С.98–106. – URL: <http://chitgma.ru/zmv2> (дата обращения: 20.06.2017).
65. Исследование уровня аутоантител к модифицированному сывороточному альбумину и тромбину / С.В. Измestьев, Е.В. Фефелова, П.П. Терешков [и др.] // Забайкальский медицинский вестник. – 2012. – № 2. – С. 112–115.
66. Ишемическая болезнь сердца и особенности периферической микроциркуляции в различных возрастных группах / О.В. Каменская, А.М. Караськов, А.М. Чернявский [и др.]. – DOI 10.15829/1560-4071-2014-8-78-83 // Российский кардиологический журнал. – 2014. – № 8 (112). – URL: <https://russjcardiol.elpub.ru/jour/article/view/173/168> (дата обращения 11.03.2017).
67. К патогенезу формирования гомоцистеином дисфункции эндотелия у никотинзависимых лиц / Е.В. Фефелова, С.В. Измestьев, П.П. Терешков [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2013. – № 5 (140). – С. 184–188.

68. Кайгородова Е.В. Белки теплового шока и митогенактивированные протеинкиназы JNK, P38: роль в адаптации и дизрегуляции клетки при стрессиндуцированном апоптозе / Е.В. Кайгородова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // Молекулярная медицина. – 2012. – № 1. – С. 3–9.
69. Каражанова Л.К. Гипергомоцистеинемия как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний (обзор литературы) / Л.К. Каражанова, А.С. Жунуспекова // Наука и здравоохранение. – 2016. – № 4. – С. 129–144.
70. Кетлинский С.А. Цитокины : монография / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. – Москва : Фолиант, 2008. – 552 с.
71. Киприна Е.С. Лабораторные маркеры эндотелиальной дисфункции в прогнозировании неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у больных острым коронарным синдромом, подвергшихся чрескожным коронарным вмешательствам : специальность 14.03.10 : специальность 14.01.05 : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Киприна Елена Сергеевна – Москва, 2011. – 168 с.
72. Клинические аспекты гипергомоцистеинемии : монография / В.А. Снежицкий, А.В. Пырочкин, В.В. Спас [и др.] ; под общей редакцией В.А. Снежицкого, В.М. Пырочкина. – Гродно : ГрГМУ, 2011. – 292 с.
73. Клинкова А.С. Резервы микроциркуляции и реактивность тканевого метаболизма у больных ИБС при различной стадии хронической сердечной недостаточности / А.С. Клинкова, О.В. Каменская // Российский кардиологический журнал. – 2016. – № 8 (136). – С. 42–47.
74. Козеко Л.Е. Белки теплового шока 90 КДА: разнообразие, структура и функции // Цитология. – 2010. – Т. 52, № 11. – С. 893–910.
75. Королевская Л.Б. Спектротурбидиметрическое определение размера иммунных агрегатов сывороток крови, образованных в полиэтиленгликоле / Л.Б. Королевская, К.В. Шмагель // Иммунология. – 2010. – № 2. – С. 108–111.
76. Костанян И.А. Взаимодействие L глутаминовой кислоты с T лимфоцитами человека / И.А. Костанян, Е.В. Наволоцкая, Р.И. Нуриева // Биоорганическая химия. – 1997. – Т. 23. – С. 805–808.

77. Кузник Б.И. Тималин как модулятор иммуногенеза и гемостаза / Б.И. Кузник, Г.Б. Будажабон, Н.Н. Цыбиков // Фармакология и токсикология. – 1984. – Т. 47, № 1. – С. 67–71. Кузник Б.И. Коррекция иммунитета и гемостаза пептидами из сумки Фабрициуса и костного мозга у эмбрионально бурсэктомированных цыплят / Б.И. Кузник, А.В. Степанов, Н.Н. Цыбиков / Фармакология и токсикология. – 1988. – Т. 51, № 1. – С. 53–55.
78. Кузник Б.И. Иммуногенез, гемостаз и неспецифическая резистентность организма / Б.И. Кузник, В.Н. Васильев, Н.Н. Цыбиков. – Москва : Медицина, 1989. – 320 с.
79. Кузник Б.И. Единая гуморальная система защиты организма / Б.И. Кузник, Н.Н. Цыбиков, Ю.А. Витковский // Забайкальский медицинский вестник. – 2004. – № 4. – С. 13–19.
80. Кузник Б.И. О роли тимуса и сумки Фабрициуса в регуляции системы гемостаза / Б.И. Кузник, Н.Н. Цыбиков // Успехи физиологических наук. – 1989. – Т. 20, № 4. – С. 77–93.
81. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии / Б.И. Кузник. – Чита : Экспресс издательство, 2010. – 828 с.
82. Кузник Б.И. Цитокины и система гемостаза 1. Цитокины и сосудисто-тромбоцитарный гемостаз // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2012. – № 2 (50). – С. 12–28.
83. Кузник Б.И. Цитокины и система гемостаза 2. Цитокины и коагуляционный гемостаз // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2012. – № 3 (51). – С. 9–29.
84. Латфуллин И.А. Атеросклероз (краткие сведения истории развития, причины, патогенез заболевания, факторы риска, принципы профилактики) / И.А. Латфуллин. – Казань : Изд-во Казан. ун-та, 2015. – 144 с. – ISBN 978-5-00019-567-3.
85. Машкина А.П. Обнаружение NMDA-рецепторов в лимфоцитах и их характеристика : специальность 03.01.04 : диссертация на соискание ученой

степени кандидата биологических наук / Машкина Анна Петровна – Москва, 2010. – 114 с.

86. Медведев Д.В. Метаболизм митохондрий клеток сердца при экспериментальной гипергомоцистеинемии у крыс / Д.В. Медведев, В.И. Звягина // *Фундаментальные исследования*. – 2015. – № 2. – С. 734–739.

87. Мельникова С.Л. Лейкоцитарный фибринолиз у онкологических больных / С.Л. Мельникова, А.В. Степанов // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 3-1. – С. 117–120.

88. Мельникова Ю.С. Эндотелиальная дисфункция как центральное звено патогенеза хронических болезней / Ю.С. Мельникова, Т.П. Макарова // *Казанский медицинский журнал*. – 2015. – Т. 96, № 4. – С. 659–665 ; 664–665.

89. Мельниченко А.А. Атерогенная модификация липопротеидов. Роль в атерогенезе / А.А. Мельниченко, А.Н. Орехов, И.А. Собенин. – Германия : LAP LAMBERT Academic Publishing, 2013. – 253 с. – ISBN 978-3-659-24312-7.

90. Механизм гиперкоагуляции при экспериментальной гипергомоцистеинемии / Е.В. Фефелова, Н.Н. Цыбиков, П.П. Терешков [и др.] // *Тромбоз, гемостаз и реология*. – 2015. – № 4 (64). – С. 27–30.

91. Микробные ассоциации при воспалительных заболеваниях лор - органов у детей / А.Я. Крупович, Э.Э. Гурожапова, А.Б. Аюшеев [и др.] // В сборнике: *Медицина завтрашнего дня. Материалы XVII межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 65-летию Читинской государственной медицинской академии* : сборник научных трудов. Читинская государственная медицинская академия. – 2018. – С. 211.

92. Миронова Е.В. Механизмы токсического действия глутамата в нейронах коры головного мозга : специальность 03.00.13 : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Миронова Елена Викторовна – Санкт-Петербург, 2007. – 26 с.

93. Михин В.П. Роль иммунных нарушений в формировании поражений органов - мишеней у больных артериальной гипертонией / В.П. Михин, Т.В. Юрочко, Е.В. Гаврилюк // *Innova*. – 2018. – № 2 (11). – С. 15–17.

94. Моноциты в развитии и дестабилизации атеросклеротической бляшки / Д.Н. Нозадзе, А.В. Рвачёва, Е.И. Казначеева [и др.] // Атеросклероз и дислипидемии. – 2012. – № 3. – С. 25–36.
95. Морфологические изменения стенки сосудов при эндотелиальной дисфункции / А.В. Шилов, М.В. Мнихович, Р.Е. Калинин [и др.] // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2017. – Т. 6, № 2. – С. 115–121.
96. Морфометрическое исследование Th1 и Th2 – клеток в сосудистой стенке при атерогенезе у человека / П.В. Пигаревский, С.В. Мальцева, А.Н. Восканьянц [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9, № 1. – С.13–16.
97. Морфофенотипические изменения миокарда крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии / Е.В. Фефелова, Н.Н. Цыбиков, П.П. Терешков [и др.] // Забайкальский медицинский вестник. – 2015. – № 4. – С. 145–150. – URL: <http://chitgma.ru/zmv2> (дата обращения: 12.08.2018).
98. Наумов А.В. Гомоцистеин в патогенезе микроциркуляторных и тромботических осложнений / А.В. Наумов, Т.Н. Гриневич, В.М. Найдина // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2012. – Т. 49, № 1. – С. 9–19.
99. Наумов А.В. Гомоцистеин. Медико-биологические проблемы : монография / А.В. Наумов. – Минск : Профессиональные издания, 2013. – 311 с.
100. Наумов А.В. Три пути реметилирования гомоцистеина / А.В. Наумов, И.В. Данильчик, Ю.В. Сарана // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2016. – № 2 (54). – С. 27–32.
101. Некоторые показатели иммунной системы при экспериментальной гипергомоцистеинемии / Е.В. Фефелова, П.П. Терешков, А.А. Дутов [и др.] // Иммунология. – 2015. – Т. 36, № 5. – С. 280–283.
102. Общие аминотиолы плазмы крови крыс при внутрибрюшинном и подкожном введении гомоцистеина / А.В. Иванов, А.А. Московцев, Е.А. Мартынова [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2013. – Т. 4. – С. 41–45.

103. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов / Л.С. Литвинова, А.А. Гуцол, Н.А. Сохоневич [и др.] // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 7–26 ; 18–26.
104. Особенности секреции цитокинов и хемокинов моноцитами крови человека при атеросклерозе / Н.Г. Никифоров, В.П. Карагодин, Н.В. Елизова [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2017. – Т. 23, № 3. – С. 18–22.
105. Ответ иммунной системы на модификацию аминотиолами белковых структур организма / Е.В. Фефелова, С.В. Измestьев, Н.Н. Цыбиков [и др.] // Забайкальский медицинский вестник. – 2017. – № 2. – С. 101–111. – URL: <http://chitgma.ru/zmv2> (дата обращения: 25.11.2017).
106. Оценка состояния системы гемостаза при эндотелиальной дисфункции / Н.Е. Корсакова, О.А. Смирнова, Н.Н. Силина [и др.] // Вестник гематологии. – 2017. – Т. 13, № 3. – С. 43–44.
107. Пальцев М.А. Межклеточные взаимодействия / М.А. Пальцев, А.А. Иванов, С.Е. Северин. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва, 2003. – 288 с.
108. Панасенко О.М. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах / О.М. Панасенко, И.В. Горудко, А.В. Соколов // Успехи биологической химии. – 2013. – Т. 53. – С. 195–244.
109. Параллели липидного обмена и гипергомоцистеинемии у больных с ИБС и метаболическим синдромом / О.А. Ефремова, Л.А. Камышникова, В.М. Никитин [и др.] // Научный результат. Серия: Медицина и фармация. – 2014. – Т. 1, № 1. – С. 48–52.
110. Парахонский А.П. Влияние курения на развитие атеросклероза // Успехи современного естествознания. – 2009. – № 9. – С. 165–166.
111. Паршина А.А. Иммунологические аспекты патогенеза атеросклероза / А.А. Паршина, Н.Н. Цыбиков // Забайкальский медицинский вестник. – 2018. – № 4. – С. 133–144. – URL: <http://chitgma.ru/zmv2> (дата обращения: 03.08.2019).
112. Пехова К.А. Иммунометаболические нарушения и структурно-функциональные свойства эритроцитов у больных гипертонической болезнью : специальность 17.01.2013 : автореферат диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук / Пехова Ксения Александровна – Курск, 2013. – 22 с.

113. Пигаревский П.В. Макрофаги и их роль в дестабилизации атеросклеротической бляшки / П.В. Пигаревский, В.А. Снегова, П.Г. Назаров. – DOI 10.18087/cardio.2019.4.10254 // Кардиология. – 2019. – № 59 (4). – С. 88-91.

114. Пизова Н.В. Тромбофилии: генетические полиморфизмы и сосудистые катастрофы / Н.В. Пизова. – Москва : ИМА-ПРЕСС, 2013. – 248 с.

115. Показатели системы гемостаза у пациентов с атеросклерозом периферических артерий / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе [и др.] // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. – 2018. – Т. 13, № 3. – С. 29-33.

116. Полевщиков А.В. С-реактивный белок и сывороточный амилоид Р в системе иммунорегуляции : специальность 14.00.36 : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Полевщиков Александр Витальевич – Санкт-Петербург, 1997. – 40 с.

117. Полякова А.П. Особенности аллельного полиморфизма генов, ассоциированных с эндотелиальной дисфункцией, у больных с ранним дебютом венозного тромбоза : специальность 14.01.21 : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Полякова Анастасия Павловна – Санкт-Петербург, 2014. – 129 с.

118. Приобретенные ингибиторы факторов свертывания крови / Л.П. Папаян, В.А. Кобилянская, О.А. Смирнова [и др.] // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2015. – № 4 (64). – С. 82–87.

119. Простой способ определения модифицированных липопротеинов низкой плотности / Б.Б. Шойбонов, В.Ю. Баронец, Л.Ф. Панченко [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2012. – № 2. – С. 77–83.

120. Роль аутоантител к гомоцистеинилированному альбумину / С.В. Измestьев, Е.В. Фефелова, П.П. Терешков [и др.] // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, № 5. – С. 22–23.

121. Роль гипергомоцистеинемии в механизмах развития гиперкоагуляции у больных ИБС / Е.В. Фефелова, П.П. Терешков, Н.В. Исакова [и др.] // Забайкальский медицинский вестник. – 2019. – № 2. – С. 90–98. – URL: <http://chitgma.ru/zmv2> (дата обращения: 03.09.2017).
122. Роль гипергомоцистеинемии в развитии тромбоемболических осложнений / В.М. Шмелева, С.И. Капустин, М.Н. Блинов [и др.] // Медицина экстремальных состояний. – 2012. – № 1 (39). – С. 106-117.
123. Роль интерлейкина-8 и Т-лимфоцитов в дестабилизации атеросклеротической бляшки у человека / П.В. Пигаревский, С.В. Мальцева, В.А. Снегова [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т. 16, № 2. – С. 51–55.
124. Роль определения уровня гомоцистеина при постромботическом синдроме нижних конечностей / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, А.С. Пшенников [и др.] // Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева : материалы Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием. – 2016. – С. 100–104.
125. Роль форменных элементов крови в формировании гемокоагуляционных сдвигов при гипертонической болезни / Б.И. Кузник, С.О. Давыдов, Е.С. Гусева [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2018. – Т. 62, № 4. – С. 84–92.
126. Роль цитокинов в патогенезе ишемической болезни сердца / Ф.Н. Палеев, И.С. Белокопытова, Б.И. Минченко [и др.] // Креативная кардиология. – 2011. – № 1. – С. 75–80.
127. Роль эндотелиальных прогениторных клеток при атеросклерозе / А.Е. Семенова, И.В. Сергиенко, А.Л. Домбровский [и др.] // Атеросклероз и дислипидемии. – 2012. – № 3. – С. 14–24.
128. Саранчина Ю.В. Значение IL-1 β при развитии воспаления / Ю.В. Саранчина, Е.С. Агеева, О.В. Штыгашева // Забайкальский медицинский вестник. – 2013. – № 2. – С.149–153.

129. Сергеев П.В. Рецепторы физиологически активных веществ / П.В. Сергеев, Н.Л. Шимановский, В.И. Петров. – Волгоград : Семь ветров, 1999. – 640 с.
130. Сергиенко И.В. Атеросклероз и дислипидемии: современные аспекты патогенеза, диагностики и лечения / И.В. Сергиенко, А.А. Аншелес, В.В. Кухарчук. – Москва, 2017. – 142 с. – ISBN 978-5-90363-088-2
131. Скворцов Ю.И. Гомоцистеин как фактор риска развития ИБС (Обзор) / Ю.И. Скворцов, А.С. Королькова // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2011. – Т. 7, № 3. – С. 619–624.
132. Смирнова В.Ю. Диагностическое значение лабораторных маркеров повреждения эндотелия при нестабильной стенокардии : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Смирнова Вероника Юрьевна – Москва, 2009.
133. Современные методы и подходы к изучению апоптоза в экспериментальной биологии / И.В. Кудрявцев, А.С. Головкин, А.В. Зурочка [и др.] // Медицинская иммунология. – 2012. – Т.14, № 6. – С. 461–482.
134. Современные методы оценки эндотелиальной дисфункции и возможности их применения в практической медицине / А.В. Шабров, А.Г. Апресян, А.Л. Добкес [и др.] // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2016. – № 12 (6). – С. 733–742.
135. Содержание окисленных липопротеидов низкой плотности и антител к ним у здоровых лиц и у пациентов с сердечно-сосудистой патологией / Е.В. Фефелова, Б.С. Хышиктуев, М.В. Максименя [и др.] // Дальневосточный медицинский журнал. – 2013. – № 1. – С. 6–9.
136. Содержание цитокинов, циркулирующих эндотелиоцитов и аутоантител к альбумину, модифицированному гомоцистеином у никотинзависимых лиц / Е.В. Фефелова, С.В. Измestьев, П.П. Терешков [и др.] // Дальневосточный медицинский журнал. – 2014. – № 1. – С. 22–24.
137. Содержание эндотелиальных прогениторных клеток фенотипа CD 34+/CD 133+/CD 309+, а также факторов ангиогенеза в крови у больных ИБС / А.Л.

Домбровский, И.В. Сергиенко, А.В. Рвачева [и др.] // Терапевт. – 2015. – № 7. – С. 23–29.

138. Соотношение IFN- γ / IL-4 как критерий оценки степени стеноза коронарных артерий / А.С. Гольдерова, С.Д. Ефремова, В.М. Николаев [и др.] // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, № 5. – С. 293.

139. Структурная реорганизация миокарда крыс и численность кардиомиоцитов при действии доксорубина и тритерпеноидов / Е.Л. Лушникова, Л.М. Непомнящих, Н.А. Молодых [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 6. – С. 98–102.

140. Субпопуляции лимфоцитов и уровень цитокинов при экспериментальной гипергомоцистеинемии / Е.В. Фефелова, П. П. Терешков, А. А. Дутов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159, № 3. – С. 336–338.

141. Сухоруков В.Н. Атерогенные модификации липопротеинов низкой плотности. / В.Н. Сухоруков, В.П. Карагодин, А.Н. Орехов // Биомедицинская химия. – 2016. – Т. 62, № 4. – С. 391–402.

142. Титов В.Н. О биологической функции эндоэкологии (чистота межклеточной среды), которую реализуют две биологические реакции: реакция экскреции и реакция воспаления – утилизация *in vivo*, *in situ* катаболитов большой молекулярной массы // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – Т. 63, № 11. – С. 668–676.

143. Титов В.Н. Филогенетическая теория общей патологии. Формирование семи биологических функций, семи специфических, этиологических факторов метаболических пандемий, единого за миллионы лет патогенеза и основ профилактики // Клиническая лабораторная диагностика. – 2017. – Т. 62, № 8. – С. 452–462.

144. Традиционные и новые факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний и предрасположенность к развитию атеросклероза / И.А. Собенин, А.В. Желанкин, Е.В. Чернова [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2015. – Т. 59, № 1. – С. 4–11.

145. Тромбоэмболия легочной артерии в дебюте наследственной гематогенной тромбофилии / В.В. Войцеховский, Ю.С. Ландышев, Н.Д. Гоборов [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2016. – № 62. – С. 89–100.
146. Уровень гомоцистеина в крови и смешанной слюне после метиониновой нагрузки у больных гипертонической болезнью / С.В. Измestьев, Е.В. Фефелова, А.А. Дутов [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2013, № 1. – С. 88–91.
147. Фефелова Е.В. Изменение адгезивных свойств лейкоцитов под воздействием гипергомоцистеинемии // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2010. – № 3. – С. 267–269.
148. Филиппова О.И. Риски тромботических осложнений в хирургии / О.И. Филиппова, В.В. Колосков // Вестник хирургии. – 2017. – Т. 176, № 2. – С. 119–123.
149. Фильченков А.А. Реактиваторы апоптоза как препараты целевой противоопухолевой терапии // Биомедицинская химия. – 2013. – Т. 59, вып. 2. – С. 119–143.
150. Функциональные свойства фибробластов в культуре под действием различных концентраций гомоцистеина / Е.В. Фефелова, Н.Н. Цыбиков, М.В. Максименя [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2015. – № 4. – С. 24–28.
151. Хышиктуев Б.С. Прикладные и фундаментальные аспекты изучения адаптационных и дизадаптационных реакций в норме и патологии // Забайкальский медицинский вестник. – 2008. – № 2. – С. 14–20.
152. Цитокиновое звено и система комплемента у больных артериальной гипертонией и взаимосвязь с поражением органов-мишеней / В.П. Михин, Е.В. Гаврилюк, А.И. Конопля [и др.] // Курский научно-практический вестник. Человек и его здоровье. – 2018. – № 4. – С. 5–12.
153. Цыбиков Н.Н. Доказательство иммунного механизма регуляции ферментов гемостаза // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1982. – № 5. – С. 8–9.

154. Цыбиков Н.Н. Материалы по взаимосвязи иммуногенеза и гемостаза в эксперименте : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Цыбиков Намжил Нанзатович. – Ленинград, 1984. – 20 с.
155. Цыбиков Н.Н. Роль гомоцистеина в патологии человека / Н.Н. Цыбиков, Н.М. Цыбикова // Успехи современной биологии. – 2007. – Т. 127, № 5. – С. 471–482.
156. Чулков В.С. Динамика изменений уровня гомоцистеина крови и его прогностическая значимость при различных формах артериальной гипертензии у беременных // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=19401> (дата обращения: 07.02.2018).
157. Шевченко О.П. Гомоцистеин и его роль в клинической практике (лекция) // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 11. – С. 25–32.
158. Широкова А.В. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 5. – С. 385–394.
159. Шмелева В.М. Оксидативный стресс – основа эндотелиальной дисфункции при гипергомоцистеинемии / В.М. Шмелева, А.А. Гуржий, Л.П. Рыбакова // Клиническая гемостазиология и реология в сердечно-сосудистой хирургии : материалы Всероссийской научной конференции. – Москва, 2007. – С. 262–263.
160. Шмелева В.М. Роль гипергомоцистеинемии в формировании протромботических нарушений системы гемостаза : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Шмелева Вероника Михайловна; Российский НИИ гематологии и трансфузиологии. – Санкт-Петербург, 2010. – 117 с.
161. Эндотелий: функция и дисфункция / З.А. Лупинская, А.Г. Зарифьян, Т.Ц. Гурович, С.Г. Шлейфер. – Бишкек : КРСУ, 2008. – 373 с.
162. Ярилин А.А. Естественные регуляторные Т клетки // Российский медицинский журнал. – 2007. – № 1. – С. 43–48.
163. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes / C.J. Boushey, S.A.

- Beresford, G.S. Omenn [et al.]. – DOI 10.1001/jama.1995.03530130055028 // JAMA. – 1995. – Vol. 274. – P. 1049–1057. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7563456> (date of the application: 15.04.2013).
164. A. IL-2, IL-7, and IL-15: Multistage regulators of CD4(+) T helper cell differentiation / K.A. Read, M.D. Powell, P.W. McDonald [et al.]. – DOI 10.1016/j.exphem.2016.06.003 // Exp Hematol. – 2016. – Vol. 44 – P. 799–808. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27423815> (date of the application: 02.03.2015).
165. Aberrant DNA methylation of the PDGF gene in homocysteine mediated VSMC proliferation and its underlying mechanism / X.B. Han, H.P. Zhang, C.J. Cao [et al.]. – DOI 10.3892/mmr.2014.2249 // Mol Med Rep. – 2014. – Vol. 10 (2). – P. 947–954. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24841643> (date of the application: 05.05.2016).
166. Acquired Factor V Inhibitor / D. Hirai, Y. Yamashita, N. Masunaga [et al.]. – DOI 10.2169/internalmedicine.55.6459 // Intern Med. – 2016. – Vol. 55 (20). – P. 3039–3042. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5109576> (date of the application: 14.05.2017).
167. Activation of the factor XII-driven contact system in Alzheimer's disease patient and mouse model plasma / D. Zamolodchikov, Z.-L. Chen, B.A. Conti [et al.]. – DOI 10.1073/pnas.1423764112 // PNAS. – 2015. – Vol. 112 (13). – P. 4068–4073. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25775543> (date of the application: 22.02.2017).
168. Aday A.W. Targeting Residual Inflammatory Risk: A Shifting Paradigm for Atherosclerotic Disease / A.W. Aday, P.M. Ridker. – DOI 10.3389/fcvm.2019.00016. eCollection 2019 // Front Cardiovasc Med. – 2019. – Vol. 6. – P. 16. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30873416> (date of the application: 13.06.2018).
169. Adhesion and activation of platelets from subjects with coronary artery disease and apparently healthy individuals on biomaterials / S. Braune, M. Groß, M. Walter [et al.]. – DOI 10.1002/jbm.b.33366 // J Biomed Mater Res B Appl Biomater. – 2016. – Vol. 104. – P. 210–217. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25631281> (date of the application: 14.08. 2014).

170. Aird W.C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms / W.C. Aird. – DOI 10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a // *Circ Res.* – 2007. – Vol. 100 (2). – P. 158–173. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17272818> (date of the application: 13.06.2018).
171. Allen D.H. Human coagulation factor V is activated to the functional cofactor by elastase and cathepsin G expressed at the monocyte surface / D.H. Allen, P.B. Tracy. – DOI 10.1074/jbc.270.3.1408 // *J Biol Chem.* – 1995. – Vol. 270 (3). – P. 1408–1415. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7836408> (date of the application: 13.06.2018).
172. AnandBabu K. (2019) Oxidized LDL, homocysteine, homocysteine thiolactone and advanced glycation end products act as pro-oxidant metabolites inducing cytokine release, macrophage infiltration and pro-angiogenic effect in ARPE-19 cells. / K. AnandBabu, P. Sen, N. Angayarkanni – DOI 10.1371/journal.pone.0216899 // *PLoS ONE* – 2019 – Vol. 14(5). – P. e0216899. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0216899> (date of the application: 24.01.2020).
173. Angelillo-Scherrer A. Leukocyte-derived microparticles in vascular homeostasis / A. Angelillo-Scherrer. – DOI 10.1038/sj.eye.6703062 // *Circ Res.* – 2012. – Vol. 110 (2). – P. 356–369. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18084236> (date of the application: 12.09.2018).
174. Anticytokine autoantibodies in chronic rhinosinusitis / N.N. Tsybikov, E.V. Egorova, B.I. Kuznik [et al.]. – DOI 10.2500/aap.2015.36.3880 // *Allergy and Asthma Proceedings.* – 2015. – Nov; 36 (6). – P. 473-80. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26534753/> (date of the application: 12.09.2019).
175. Arderiu G. Angiogenic microvascular endothelial cells release microparticles rich in tissue factor that promotes postischemic collateral vessel formation / G. Arderiu, E. Pena, L. Badimon. – DOI 10.1161/ATVBAHA.114.303927 // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2015. – Vol. 35. – P. 348–357. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25425620> (date of the application: 12.09.2018).

176. Association of prehypertension and hyperhomocysteinemia with subclinical atherosclerosis in asymptomatic Chinese: a cross-sectional study / B. Liu, Z. Chen, X. Dong [et al.]. – DOI 10.1136/bmjopen-2017-019829 // *MJ Open*. – 2018. – Vol. 8 (3). – P. e019829. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29555791> (date of the application: 28.01.2019).
177. Astaxanthin inhibits homocysteine induced endothelial cell dysfunction via the regulation of the reactive oxygen species dependent VEGF VEGFR2 FAK signaling pathway / W. Xian Jung, T. Da Chen, W. Feng-Wen [et al.]. – DOI 10.3892/mmr.2019.10162 // *Molecular Medicine REPORTS*. – 2019. – Vol. 19. – P. 4753–4760. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31059085> (date of the application: 15.04.2017).
178. Austin R.C. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease / R.C. Austin, S.R. Lentz, G.H. Werstuck. – DOI 10.1038/sj.cdd.4401451// *Cell Death Differ*. – 2004. – Vol. 11. – P. 56. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15243582> (date of the application: 11.09.2018).
179. Autoantibodies against homocysteinylated protein in a mouse model of folate deficiency-induced neural tube defects. *Birth Defects Res A* / K.J. Denny, C.F. Kelly, V. Kumar [et al.]. – DOI 10.1002/bdra.23483 // *Clin Mol Teratol*. – 2016. – Vol. 106. – P. 201–207. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26900104> (date of the application: 24.09.2017).
180. Balda M.S. Tight junctions at a glance / M.S. Balda, K. Matter. – DOI 10.1242/jcs.023887 // *Journal of Cell Science*. – 2008. – Vol. 121. – P. 3677–3682. – URL: <https://jcs.biologists.org/content/121/22/3677> (date of the application: 11.11.2018).
181. Barroso M. The Link Between Hyperhomocysteinemia and Hypomethylation: Implications for Cardiovascular Disease / M. Barroso, D.E. Handy, R. Castro. – DOI 10.1177/2326409817698994 // *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening*. – 2017. – Vol. 5. – P. 1–15. – URL: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2326409817698994> (date of the application: 01.12.2018).

182. Beltowsk J. Protein homocysteinilation: a new mechanism of atherogenesis? // Postery Hig Med Dosw. – 2005. – Vol. 59. – P. 392–404. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1610624> (date of the application: 01.03.2017).
183. Biomarker assessment in chronic rhinitis and chronic rhinosinusitis: endothelin-1, TARC/CCL17, neopterin, and α -defensin // N.N. Tsybikov, E.V. Egorova, B.I. Kuznik [et al.]. – DOI 10.2500/aap.2016.37.3899 // Allergy and Asthma Proceedings. – 2016. – 37 (1). – P. 35-42. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26831845/> (date of the application: 15.04.2019).
184. Bode M.F. Protective and pathological roles of tissue factor in the heart / M.F. Bode, N. Mackman. – DOI 10.5482/HAMO-14-09-0042 // Hamostaseologie. – 2014. – Vol. 35 (1). – P. 37–46. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25434707> (date of the application: 17.03.2017).
185. Boncler M. The Multiple Faces of C-Reactive Protein – Physiological and Pathophysiological Implications in Cardiovascular Disease / M. Boncler, Y. Wu, C. Watala. – DOI 10.3390/molecules24112062 // Molecules. – 2019. – Vol. 24 (11). – P. 2044–2062. – URL: <https://doi.org/10.3390/molecules24112062> (date of the application: 17.05.2019).
186. Borissoff J.I. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis / J.I. Borissoff, H.M. Spronk, H. ten Cate. – DOI 10.1056/NEJMra1011670 // N Engl J Med. – 2011. – Vol. 364. – P. 1746–1760. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21542745> (date of the application: 13.05.2014).
187. Bouchard B.A. The participation of leukocytes in coagulant reactions / B.A. Bouchard, P.B. Tracy. – DOI 10.1046/j.1538-7836.2003.00089.x // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2003. – Vol. 1. – P. 464–469. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1538-7836.2003.00089.x> (date of the application: 13.05.2014).
188. Boyde S.V. Natural Antibodies and the Immune Response / S.V. Boyde. – DOI 10.1016/S0065-2776(08)60271-0 // Advances in Immunology. – 1966. – Vol. 5 – P. 1–28. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065277608602710> (date of the application: 15.04.2013).

189. Butenas S. Tissue Factor Structure and Function / S. Butenas. – DOI 10.6064/2012/964862 // *Scientifica*. – 2012. – Vol. 2012. – article ID 964862. – 15 p. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24278763> (date of the application: 04.08.2015).
190. Cater J.H. Alpha-2-Macroglobulin, a Hypochlorite-Regulated Chaperone and Immune System Modulator / J.H. Cater, M.R. Wilson, A.R. Wyatt. – DOI 10.1155/2019/5410657 // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2019. – Vol. 2019. – article ID 5410657. – 9 p. – URL: <http://downloads.hindawi.com/journals/omcl/2019/5410657.pdf> (date of the application: 24.01.2020).
191. Carrette F. IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the control of T cell homeostasis / F. Carrette, C.D. Surh. – DOI 10.1016/j.smim.2012.04.010 // *Semin Immunol*. – 2012. – Vol. 24. – P. 209–217. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22551764> (date of the application: 24.08.2017).
192. CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells: more than just a developmental stage? / N.H. Overgaard, J.W. Jung, R.J. Steptoe [et al.]. – DOI 10.1189/jlb.1RU0814-382 // *J Leukoc Biol*. – 2015. – Vol. 97 (1). – P. 31–38. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25360000> (date of the application: 25.01.2017).
193. Čejková S. Monocyte adhesion to the endothelium is an initial stage of atherosclerosis development / S. Čejková, I. Králová-Lesná, R. Poledne. – DOI 10.1016/j.crvasa-2015.08.002 // *Cor Vasa*. – 2016. – Vol. 58. – P. e419–e425. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010865015000818> (date of the application: 14.08.2018).
194. Chemical proteomic profiling of protein N-homocysteinylation with a thioester probe / N. Chen, J. Liu, Z. Qiao [et al.]. – DOI 10.1039/C8SC00221E // *Chem Sci (Camb)*. – 2018. – Vol. 9. – P. 2826–2830. – URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/sc/c8sc00221e#!divAbstract> (date of the application: 14.03.2019).
195. Chemotactic response of monocytes to thrombin / R. Bar-Shavit, A. Kahn, J. W. Fenton [et al.]. – DOI 10.1083/jcb.96.1.282 // *J Cell Biol*. – 1983. – Vol. 96 (1). – P.

282–285. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6826648> (date of the application: 01.02.2016).

196. Choi D.W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent / D.W. Choi. – DOI 10.1016/0304-3940(85)90069-2 // *Neurosci Lett.* – 1985. – Vol. 58, № 3. – P. 293–297. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2413399> (date of the application: 21.03.2013).

197. Circulating B-vitamins and smoking habits are associated with serum polyunsaturated Fatty acids in patients with suspected coronary heart disease: a cross-sectional study / E. Skeie, E. Strand, E.R. Pedersen [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0129049 // *PloS one.* – 2015. – Vol. 10 (6). – P. e0129049. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26039046> (date of the application: 25.01.2017).

198. Circulating endothelial cells, arterial stiffness, and cardiovascular risk stratification in Hypertension / C.J. Boos, D.A. Lane, M. Karpha [et al.]. – DOI 10.1378/chest.07-0428 // *Chest.* – 2007. – Vol. 132. – P. 1540–1547. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17998358> (date of the application: 17.05.2019).

199. Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry / M.L. Blue, J.F. Daley, H. Levine [et al.] // *J. Immunol.* – 1985. – Vol. 134. – P. 2281–2286. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2982943> (date of the application: 17.03.2017).

200. Comparison of Protein N-Homocysteinylation in Rat Plasma under Elevated Homocysteine Using a Specific Chemical Labeling Method / T. Zang, L.P. Pottenplackel, D.E. Handy [et al.]. – DOI 10.3390/molecules21091195 // *J.Molecules.* (Sep 8.) – 2016. – Vol. 21 (9). – P. 16–20. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27617989> (date of the application: 22.02.2017).

201. Comparison of the effect of homocysteine and its thiolactone on the fibrinolytic system using human plasma and purified plasminogen / J. Kolodziejczyk, J. Malinowska, P. Nowak [et al.]. – DOI 10.1007/s11010-010-0545-z // *Mol Cell Biochem.* – 2010. – Vol. 344. – P. 217–220. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20658177> (date of the application: 29.11.2017).

202. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species / D.A. Hildeman, Th. Mitchell, B. Aronow [et al.]. – DOI 10.1073/pnas.1936213100 // PNAS. – 2003. – Vol. 100 (25). – P. 15035–15040. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657380> (date of the application: 25.04.2014).
203. Coronary Microvascular and Cardiac Dysfunction Due to Homocysteine Pathometabolism / A. Koller, A. Szenas, G. Dornyei [et al.]. – DOI 10.2174/1381612824666180625125450 // A Complex Therapeutic Design. Curr Pharm Des. – 2018. – Vol. 24 (25). – P. 2911–2920. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/325985499> (date of the application: 09.12.2018).
204. C-reactive protein and inflammation: Conformational changes affect function / Y. Wu, L.A. Potempa, E. Kebir [et al.]. – DOI 10.1515/hsz-2015-0149 // Biol. Chem. – 2015. – Vol. 396. – P. 1181–1197. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26040008> (date of the application: 15.04.2017).
205. C-reactive protein impairs coronary arteriolar dilation to prostacyclin synthase activation: Role of peroxynitrite / T.W. Hein, E. Qamirani, Y. Ren [et al.]. – DOI 10.1016/j.yjmcc.2009 // J. Mol. Cell Cardiol. – 2009. – Vol. 47. – P. 196–202. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19410579> (date of the application: 15.03.2018).
206. C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh Artery Study / I. Tzoulaki, G.D. Murray, A.J. Lee [et al.]. – DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.513085 // Circulation. – 2005. – Vol. 112 (7). – P. 976–983. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16087797> (date of the application: 07.09.2018).
207. Cyclic supplementation of 5-MTHF is effective for the correction of hyperhomocysteinemia / P. Ambrosino, R. Lupoli, A. Di Minno [et al.]. – DOI 10.1016/j.nutres.2015.02.006 // Nutr Res. – 2015. – Vol. 35. – P. 489–495. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25841618> (date of the application: 11.06.2018).
208. Darbousset R. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation / R. Darbousset, G.M. Thomas, S. Mezouar [et al.]. –

DOI 10.1182/blood-2012-06-437772 // Blood. – 2012. – Vol. 120 (10). – P. 2133–2143. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22837532> (date of the application: 14.05.2015).

209. Dayal S. Murine models of hyperhomocysteinemia and their vascular phenotypes / S. Dayal, S.R. Lentz. – DOI 10.1161/ATVBAHA.108.166421// Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2008. – Vol. 28, № 9 – P. 1596–1605. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18556571> (date of the application: 14.03.2017).

210. Deficiency of superoxide dismutase promotes cerebral vascular hypertrophy and vascular dysfunction in hyperhomocysteinemia / S. Dayal, G.L. Baumbach, E. Arning [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0175732 // PLoS One. – 2017. – Vol. 12. – P. e0175732. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28414812>. (date of the application: 14.03.2018).

211. Den Heijer M. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies / M. Den Heijer, S. Lewington, R. Clarke. – DOI 10.1111/j.1538-7836.2005.01141.x // J Thromb Haemost. – 2005. – Vol. 3. – P. 292–299. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15670035> (date of the application: 14.03.2016).

212. Descriptive study of the relationship between the subclinical carotid disease and biomarkers, carotid femoral pulse wave velocity in patients with hypertension. / X. Zhao, L. Bo, H. Zhao [et al.]. – DOI 10.1080/10641963.2017.1368537 // Clin Exp Hypertens. – 2018. – Vol. 40 (3). – P. 274–280. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29227169> (date of the application: 22.01.2019).

213. Detection and Validation of Circulating Endothelial Cells, a Blood-based Diagnostic Marker of Acute Myocardial Infarction / C. Li, Q. Wu, B. Liu [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0058478 // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8 (3). – P. e58478. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23484031> (date of the application: 27.04.2015).

214. Deyhim M.R. Plasma Homocysteine Level and Risk of Thrombosis / M.R. Deyhim, F. Khoshnaghsh // J. Appl. Environ. Biol. Sci. – 2016. – Vol. 6 (2). – P. 189–193. – URL: <https://pdfs.semanticscholar.org/783b/1a4e62edd4a59fe8f518e17ce7e95d2575b2.pdf> (date of the application: 04.03.2017).

215. Distribution of CD4+CD8+ double positive T cells in a mouse model of allergic asthma / M. Zuśka-Prot, H. Ziółkowski, J.J. Jaroszewski [et al.]. – DOI 10.1515/pjvs-2016-0026 // Polish Journal of Veterinary Sciences. – 2016. – Vol. 19, № 1. – P. 217–219. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27096807>. (date of the application: 25.11.2017).
216. Ebnet K. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines / K. Ebnet, D. Vestweber // *Histochem Cell Biol.* – 1999. – Vol. 112 (1) – P. 1–23. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10461808> (date of the application: 10.03.2013).
217. Effects of C-reactive protein on the neutrophil respiratory burst in vitro / M.R. Ling, I.L. Chapple, A.J. Creese [et al.]. – DOI 10.1177/1753425913493199 // *Innate Immun.* – 2014. – Vol. 20 (4). – P.339–349. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23839528> (date of the application: 28.04.2014).
218. Effect of human granulocytic elastase on isolated human antithrombin III / M. Jochum, S. Lander, N. Heimburger [et al.] // *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* – 1981. – Vol. 362 (2). – P. 103–112. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6783500> (date of the application: 28.04.2014).
219. Ekim M. Study on relationships among deep vein thrombosis, homocysteine and related B group vitamins / M. Ekim, H. Ekim, Y.Y. Keser. – DOI 10.12669/pjms.312.6049 // *Pakistan Journal of Medical Sciences.* – 2015. – Vol. 31 (2). – P. 398–402. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4476350> (date of the application: 17.07.2016).
220. Eldibany M.M. Hyperhomocysteinemia and thrombosis / M.M. Eldibany, J.A. Caprini. – DOI 10.1043/1543-2165(2007)131[872:HATAO]2.0.CO;2 // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2007. – Vol. 131. – P. 872–884. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550314> (date of the application: 21.08.2017).
221. Elevated homocysteine levels in type 2 diabetes induce constitutive neutrophil extracellular traps / M.B. Joshi, G. Baipadithaya, A. Balakrishnan [et al.]. – DOI 10.1038/srep36362 // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 363–362. – URL: <https://www.nature.com/articles/srep36362> (date of the application: 23.05.2017).

222. Endoplasmic reticulum stress in the heart: insights into mechanisms and drug targets / S. Wang, P. Binder, Q. Fang [et al.]. – DOI 10.1111/bph.13888 // *Br J Pharmacol.* – 2018. – Vol. 175 (8). – P. 1293–1304. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28548229> (date of the application: 09.02.2019).
223. Endothelial Aquaporins and Hypomethylation: Potential Implications for Atherosclerosis and Cardiovascular Disease / I. Silva, M. Barroso, T. Moura [et al.]. – DOI 10.3390/ijms19010130 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19. – P. 130. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5796079/> (date of the application: 05.01.2019).
224. Endothelial dysfunction and type of cigarette smoked: the impact of light versus regular cigarette smoking / C.M. Papamichael, K.A. Aznaouridis, K.S. Stamatelopoulos [et al.]. – DOI 10.1191/1358863x04vm529oa // *Vascular Medicine.* – 2004. – Vol. 9 (2). – P. 103–105. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15521699> (date of the application: 20.03.2019).
225. Endothelial glycocalyx, apoptosis and inflammation in an atherosclerotic mouse model / M. Cancel Limary, E. Ebong Eno, S. Mensah [et al.]. – DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.930 // *Atherosclerosis.* – 2016. – Vol. 252. – P. 136–146. – pmid. 27529818. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5035621> (date of the application: 44.08.2017).
226. Enhanced P-selectin expression on platelet-a marker of platelet activation, in young patients with angiographically proven coronary artery disease / R. George, A. Bhatt, J. Narayani [et al.]. – DOI 10.1007/s11010-016-2756-4 // *Mol Cell Biochem.* – 2016. – Vol. 419. – P. 125–133. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27406211> (date of the application: 22.11.2018).
227. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation / C.T. Ammollo, F. Semeraro, J. Xu [et al.]. – DOI 10.1111/j.1538-7836.2011.04422.x // *J Thromb Haemost.* – 2011. – Vol. 9 (9). – P. 1795–1803. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21711444> (date of the application: 12.06.2018).

228. Fateeva V.V. Nitric oxide: From the mechanism of action to pharmacological effects in cerebrovascular diseases / V.V. Fateeva, O.V. Vorobyova. – DOI 10.17116/jnevro2017117101131-135 // Zh Nevrol Psikhiatr Im S.S. Korsakova. – 2017. – Vol. 117. – P. 131–135. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29171501> (date of the application: 21.09.2018).
229. Folic acid administration and antibodies against homocysteinyllated proteins in subjects with hyperhomocysteinemia / A. Undas, E. Stepien, R. Glowacki [et al.]. – DOI 10.1160/TH06-04-0228 // Thromb Haemost. – 2006. – Vol. 96. – P. 342–347. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16953277> (date of the application: 03.12.2016).
230. Folic Acid and Homocysteine in Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease Progression: Which Comes First? / G. Cianciolo, A. De Pascalis, L. Di Lullo [et al.]. – DOI 10.1159/000471813 // Cardiorenal Med. – 2017. – Vol. 7 (4). – P. 255–266. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29118764> (date of the application: 22.01.2018).
231. Folic acid attenuates homocysteine and enhances antioxidative capacity in atherosclerotic rats / S. Cui, W. Li, X. Lv [et al.]. – DOI 10.1139/apnm-2017-0158 // Appl Physiol Nutr Metab. – 2017. – Vol. 42 (10). – P. 1015–1022. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28575637> (date of the application: 22.05.2018).
232. Fu Y. Hyperhomocysteinaemia and vascular injury: advances in mechanisms and drug targets / Y. Fu, X. Wang, W. Kong. – DOI 10.1111/bph.13988 // Br J Pharmacol. – 2018. – Vol. 175 (8). – P. 1173–1189. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28836260> (date of the application: 21.12.2018).
233. Fuchs T.A. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis / T.A. Fuchs, A. Brill, D.D. Wagner. – DOI 10.1161/ATVBAHA.111.242859 // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2012. – Vol. 32 (8). – P. 1777–1783. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22652600> (date of the application: 11.11.2017).
234. Ganguly P. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease / P. Ganguly, J. Nutr, S. Sreyoshi. – DOI 10.1186/1475-2891-14-6 // Nutrition Journal. –

2015. – Vol. 14. – P. 6. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25577237> (date of the application: 21.11.2017).

235. Gao S. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and atherosclerotic cardiovascular disease / S. Gao, J. Liu. – DOI 10.1016/j.cdtm.2017.02.008 // *Chronic Diseases and Translational Medicine*. – 2017. – Vol. 3, Issue 2. – P. 89–94. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29063061> (date of the application: 21.12.2017).

236. Gimbrone M.A. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis / M. A.Gimbrone , G. García-Cardena, G. García-Cardena. – DOI 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301// *Endothelial*. – *Circ. Res.* – 2016. – Vol. 118. – P. 620–636. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4762052/> (date of the application: 02.12.2018).

237. Gliadin IgG antibodies and circulating immune complexes / A. Eisenmann, C. Murr, D. Fuchs [et al.]. – DOI 10.1080/00365520802449328 // *Scand J Gastroenterol*. – 2009. – Vol. 44 (2). – P. 168–71. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18819035> (date of the application: 17.07.2017).

238. Global DNA methylation analysis of human atherosclerotic plaques reveals extensive genomic hypomethylation and reactivation at imprinted locus 14q32 involving induction of a miRNA cluster / E. Aavik, H. Lumivuori, O. Leppänen [et al.] // *Eur Heart J*. – 2014. – Vol. 36 (16). – P. 993–1000. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25411193> (date of the application: 13.06.2015).

239. Global histone H3 lysine 27 triple methylation levels are reduced in vessels with advanced atherosclerotic plaques / R.J. Wierda, I.M. Rietveld, M.C. Van Eggermond [et al.]. – DOI 10.1016/j.lfs.2014.10.010 // *Life Sci*. – 2015. – Vol. 129. – P. 3–9. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25445221> (date of the application: 19.05.2017).

240. Glowacki R. Cross-talk between Cys34 and lysine residues in human serum albumin revealed by N-homocysteinylation / R. Glowacki, H. Jakubowski. – DOI 10.1074/jbc.M313268200 // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279 (12). – P. 10864–10870.

– URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14701829> (date of the application: 02.10.2016).

241. Glutamate mediates platelet activation through the AMPA receptor / C.N. Morrell, H. Sun, M. Ikeda [et al.]. – DOI 10.1084/jem.20071474 // *J Exp Med.* – 2008. – Vol. 205. – P. 575–584. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18283118> (date of the application: 01.05.2016).

242. Glycosaminoglycans, proteoglycans and sulodexide and the endothelium: biological roles and pharmacological effects / V. Masola, G. Zaza, M. Onisto [et al.] // *Int Angiol.* – 2014. – Vol. 33 (3). – P. 243–254. – pmid: 24936533. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24936533> (date of the application: 21.03.2016).

243. Gortz P. Implications for hyperhomocysteinemia: not homocysteine but its oxidized forms strongly inhibit neuronal network activity / P. Gortz, A. Hoinkes. – DOI 10.1016/j.jns.2003.11.009 // *J Neurol Sci.* – 2004. – Vol. 218, № 1-2. – P. 109–114. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759642> (date of the application: 02.01.2019).

244. Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer / E.M. Egorina, M.A. Sovershaev, J.O. Olsen [et al.]. – DOI 10.1182/blood-2007-08-107698 // *Blood.* – 2008. – Vol. 111 (3). – P. 1208–1216. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17947506> (date of the application: 10.05.2016).

245. Gurağaç A. The neutrophil-to-lymphocyte ratio in clinical Practice / A. Gurağaç, Z. Demirer. – DOI 10.5489/cuaj.3587 // *Can Urol Assoc J.* – 2016. – Vol.10. – P. 141. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4839997/> (date of the application: 09.06.2017).

246. Hankey G.J. Homocysteine and vascular disease / G.J. Hankey, J.W. Eikelboom. – DOI 10.1016/S0140-6736(98)11058-9 // *Lancet.* – 1999. – Vol. 354. – P. 407–413. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10437885> (date of the application: 05.05.2016).

247. Hansson G.K. The immune system in atherosclerosis / G.K. Hansson, A. Hermansson. – DOI 10.1038/ni.2001// *Nat. Immunol.* – 2011. – Vol. 12. – № 3. – P.

- 204–212. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21321594> (date of the application: 05.08.2014).
248. Harpel P.C. Homocysteine and haemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis / P.C. Harpel, X. Zhang, W. Borth. – DOI 10.1093/jn/126.suppl_4.1285S // *J Nutr.* – 1996. – Vol. 126. – P. 1285S–1289S. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8642472> (date of the application: 05.08.2014).
249. Hassan A. Prognostic impact of homocysteine levels and homocysteine thiolactonase activity on long-term clinical outcomes in patients undergoing percutaneous coronary intervention / A. Hassan, T. Dohi, K. Miyauchi [et al.]. – DOI 10.1016/j.jjcc.2016.08.013 // *J Cardio.* – 2017. – Vol. 169. – P. 830–835. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27692567> (date of the application: 15.03.2018).
250. Hermann W. Hyperhomocysteinemia: a critical review of old and new aspects / W. Hermann, M. Hermann, R. Obeid // *Curr Drug Metab.* – 2007. – Vol. 8(1). – P. 17–31. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266521> (date of the application: 15.03.2015).
251. High levels of circulating folate concentrations are associated with DNA methylation of tumor suppressor and repair genes p16, MLH1, and MGMT in elderly Chileans / H. Sanchez, M.B. Hossain, L. Lera [et al.]. – DOI 10.1186/s13148-017-0374-y // *Clin Epigenetics.* – 2017. – Vol. 9. – P. 24. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28748002> (date of the application: 02.05.2018).
252. High-sensitivity C-reactive protein, lipoprotein(a) and homocysteine are risk factors for coronary artery disease in japanese patients with peripheral arterial disease / H. Kumakura, K. Fujita, H. Kanai [et al.]. – DOI 10.5551/jat.25478 // *J Atheroscler Thromb.* – 2015. – Vol. 22. – P. 344–354. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25296963> (date of the application: 29.12.2016).
253. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity / I.I. Kruman, C. Culmsee, S.L. Chan [et al.]. // *J Neurosci.* – 2000. – Vol. 20 (18). – P.6920–6926. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10995836> (date of the application: 11.11.2018).

254. Homocystamides promote free-radical and oxidative damage to proteins / M. Sibirian–Vazquez, J.O. Escobedo, S. Lim [et al.]. – DOI 10.1073/pnas.0909737107 // Proc Natl Acad Sci. USA. – 2010. – Vol.107. – P. 551–554. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080717> (date of the application: 05.10.2016).
255. Homocysteine and arterial thrombosis: Challenge and opportunity / M.N.D. Di Minno, E. Tremoli, A. Coppola [et al.]. – DOI 10.1160/TH09-06-0393 // Thromb Haemost. – 2010. – Vol. 103. – P. 942–961. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20352150> (date of the application: 14.03.2016).
256. Homocysteine causes vascular endothelial dysfunction by disrupting endoplasmic reticulum redox homeostasis / X. Wu, L. Zhang , Y. Miao [et al.]. – DOI 10.1016/j.redox.2018.09.021 // Redox Biol. – 2019. – Vol. 20. – P. 46–59. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30292945> (date of the application: 11.04.2019).
257. Homocysteine Induces Apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells via Mitochondrial Dysfunction and Endoplasmic Reticulum Stress / Z. Zhang, C. Wei, Y. Zhou [et al.]. – DOI 10.1155/2017/5736506 // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1–13. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28630659> (date of the application: 02.03.2018).
258. Homocysteine induces cytoskeletal remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes / S.O. Loureiro, L. Romão, T. Alves [et al.]. – DOI 10.1016/j.brainres.2010.07.071 // Brain Res. – 2010. – Vol. 1355. – P. 151–164. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20659431> (date of the application: 24.09.2016).
259. Homocysteine inhibits angiogenesis through cytoskeleton remodeling / L. Pan, G. Yu, J. Huang [et al.]. – DOI 10.1042/BSR20170860 // Biosci Rep. – 2017. – Vol. 37. – P. BSR20170860. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28864781> (date of the application: 25.11.2018).
260. Homocysteine inhibits inactivation of factor Va by activated protein C / A. Undas, E.B. Williams, S. Butenas [et al.]. – DOI 10.1074/jbc.M004124200 // J Biol Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 4389–4397. – URL: <http://www.jbc.org/content/276/6/4389.full> (date of the application: 03.12.2016).

261. Homocysteine is a marker for metabolic syndrome and atherosclerosis / B. Sreckovic, V.D. Sreckovic, I. Soldatovic [et al.]. – DOI 10.1016/j.dsx.2016.08.026 // *Diabetes Metab Syndr.* – 2017. – Vol. 11 (3). – P. 179–182. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27600468> (date of the application: 21.02.2019).
262. Homocysteine is associated with exaggerated morning blood pressure surge in patients with acute ischemic stroke / X. Jun-Chao, L. Ying-Ying, L. Xiao-Hui [et al.]. – DOI 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.05.032 // *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases.* – 2018. – Vol. 27, № 10. – P. 2650–2656. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.05.032> (date of the application: 23.01.2019).
263. Homocysteine levels influence platelet reactivity in coronary artery disease patients treated with acetylsalicylic acid / M. Verdoia, A. Schaffer, P. Pergolini [et al.]. – DOI 10.1097/FJC.0000000000000240 // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 2015. – Vol. 66. – P. 35–40. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714593> (date of the application: 03.12.2016).
264. Homocysteine regulates fatty acid and lipid metabolism in yeast / M. Visram, M. Radulovic, S. Steiner [et al.]. – DOI 10.1074/jbc.M117.809236 // *Biol Chem.* – 2019. – Jan 8. – Vol. 20 (1). – P. 5544–5555. – URL: <http://www.jbc.org/content/293/15/5544.full> (date of the application: 09.02.2019).
265. Homocysteine thiolactone and N-homocysteinylation induce pro-atherogenic changes in gene expression in human vascular endothelial cells / D. Gurda, L. Handschuh, W. Kotkowiak [et al.]. – DOI 10.1007/s00726-015-1956-7 // *Amino Acids.* – 2015. – Vol. 47. – P. 1319–1339. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25802182> (date of the application: 09.06.2017).
266. Homocysteine-induced changes in cell proliferation and differentiation in the chick embryo spinal cord: implications for mechanisms of neural tube defects (NTD) / K. Kobus-Bianchini, G.F. Bourckhardt, D. Ammar [et al.]. – DOI 10.1016/j.reprotox.2017.02.011 // *Reprod Toxicol.* – 2017. – Vol. 69. – P. 167–173. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28242235> (date of the application: 09.11.2018).

267. Homocysteine-lowering therapy and risk for venous thromboembolism: a randomized trial / J.G. Ray, C. Kearon, Q. Yi [et al.]. – DOI 10.7326/0003-4819-146-11-200706050-00157 // *Ann Intern med.* – 2007. – Vol. 146 (11). – P. 761–767. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470822> (date of the application: 02.03.2015).
268. Homocysteinemia attenuates hemodynamic responses to nitric oxide in vivo. / W. Fua, N. Dudmana, M. Perryb [et al.]. – DOI 10.1016/S0021-9150(01)00654-2 // *Atherosclerosis.* – 2002. – Vol. 161 (1). – P. 69–76. – URL: [https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150\(01\)00654-2/pdf](https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150(01)00654-2/pdf) (date of the application: 21.05.2016).
269. Hop C.E. Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation: mechanistic studies with model peptides and proteins / C.E. Hop, R. Bakhtiar. – DOI 10.1002/rcm.681// *Rapid Commun Mass Spectrom.* – 2002. – Vol.16. – P. 1049–1053. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992506> (date of the application: 25.04.2014).
270. Hotoleanu C. Mesenteric venous thrombosis: clinical and therapeutical approach / C. Hotoleanu, O. Andercou, A. Andercou // *Int. Angiol.* – 2008. – Vol. 27 (6). – P. 462–465. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19078907/> (date of the application: 27.05.2014).
271. Hsieh K.-Y. YC-1 Prevents tumor-associated tissue factor expression and procoagulant activity in hypoxic conditions by inhibiting p38/NF- κ B signaling pathway / K.Y. Hsieh, C.K. Wei, C.C. Wu. – DOI 10.3390/ijms20020244 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20. – P. 244. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30634531> (date of the application: 27.04.2019).
272. Human Heart Glutamate Receptors – Implications for Toxicology, Food Safety, and Drug Discovery / S. Gill, J. Veinot, M. Kavanagh [et al.]. – DOI 10.1080/01926230701230361// *Toxicol. Pathol.* – 2007. – Vol. 35. – P. 411–417. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17455090> (date of the application: 22.11.2018).
273. Human neutrophil cathepsin G is a potent platelet activator / C.A. LaRosa, M.J. Rohrer, S.E. Benoit [et al.]. – DOI 10.1016/s0741-5214(94)70106-7 // *J Vasc Surg.* –

1994. – Vol. 19 (2). – P. 306–318. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7509416> (date of the application: 22.01.2016).
274. Hyperglycemia via activation of thromboxane A2 receptor impairs the integrity and function of blood-brain barrier in microvascular endothelial cells / Z. Zhihong, H. Jue, G. Xiaoping [et al.]. – DOI 10.18632/oncotarget.16273 // *Oncotarget*. – 2017. – № 8. – P. 30030–30038. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28415790> (date of the application: 25.11.2018).
275. Hyperhomocysteinemia alters retinal endothelial cells barrier function and angiogenic potential via activation of oxidative stress / R. Mohamed, I. Sharma, A. S. Ibrahim [et al.]. – DOI 10.1038/s41598-017-09731-y // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 119–152. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-09731-y> (date of the application: 01.09.2018).
276. Hyperhomocysteinemia and DNA hypomethylation, reduced the monoamines synthesis in depression: a case control study / R. Kumari, A. Agrawal, G.P.I. Singh [et al.]. – DOI 10.15761/JSIN.1000108 // *J Syst Integr Neurosci*. – 2015. – Vol. 1. – P. 36–40. – URL: <https://www.oatext.com> (date of the application: 21.10.2018).
277. Hyperhomocysteinemia and Risk of First Venous Thrombosis: The Influence of (Unmeasured) Confounding Factors / M. Ospina-Romero, W. Lijfering, S. C. Cannegieter [et al.]. – DOI 10.1093/aje/kwy004 // *Am J Epidemiol*. – 2018. – Vol. 187 (7). – P. 1392–1400. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29370361> (date of the application: 15.02.2019).
278. Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor and Potential Nutraceutical Target for Certain Pathologies. / C. Tinelli, A. Di Pino, E. Ficulle [et al.]. – DOI 10.3389/fnut.2019.00049 // *Front. Nutr.* – 2019. – Vol. 6. – P. 49. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31069230> (date of the application: 02.05.2019).
279. Hyperhomocysteinemia suppresses bone marrow CD34+/VEGF receptor 2+ cells and inhibits progenitor cell mobilization and homing to injured vasculature—a role of β 1-integrin in progenitor cell migration and adhesion / J. Nelson, Y. Wu, X. Jiang [et al.]. – DOI 10.1096/fj.14-267989 // *FASEB J.* – 2015. – Vol. 29. – P. 3085–3099. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25854700> (date of the application: 22.12.2017).

280. Hypertonic Saline Suppresses NADPH oxidase-dependent neutrophil extracellular trap formation and promotes apoptosis / A. Nadesalingam, J.H.K. Chen, A. Farahvash [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2018.00359 // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 359. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29593709> (date of the application: 12.03.2019).
281. Increased plasma S-adenosylhomocysteine-accelerated atherosclerosis is associated with epigenetic regulation of endoplasmic reticulum stress in apoE^{-/-} mice / Y. Xiao, W. Huang, J. Zhang [et al.]. – DOI 10.1161/ATVBAHA.114.303817 // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2015. – Vol. 35(1). – P.60–70. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25359864> (date of the application: 15.04.2017).
282. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis / S. Kaptoge, S.R. Seshasai, P. Gao [et al.]. – DOI 10.1093/eurheartj/ehz367 // *European heart journal.* – 2014. – Vol. 35 (9). – P. 578–589. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24026779> (date of the application: 20.07.2017).
283. Intermediate and severe hyperhomocysteinemia with thrombosis: a study of genetic determinants / M. Gaustadnes, N. Rudiger, K. Rasmussen [et al.] // *Thromb Haemost.* – 2000. – Vol. 83, № 4. – P. 554–558. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10780316> (date of the application: 20.10.2015).
284. Intestinal double-positive CD4⁺CD8⁺ T cells are highly activated memory cells with an increased capacity to produce cytokines / B. Pahar, A.A. Lackner, R.S. Veazey [et al.]. – DOI 10.1002/eji.200535520 // *Eur. J. Immunol.* – 2006. – Vol. 36. – P. 583–592. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16506292> (date of the application: 22.05.2016).
285. Investigating the Effects of Homocysteine as an Agonist on Invertebrate Glutamatergic Synapses / E. Grau, A.E. Stanback, A. Bradley [et al.] // *Biology Faculty Publications.* – 2018. – Vol. 146. – URL: https://uknowledge.uky.edu/biology_facpub/146 (date of the application: 02.01.2019).
286. Jakubowski H. Anti-N-homocysteinylated protein autoantibodies and cardiovascular disease / H. Jakubowski. – DOI 10.1515/CCLM.2005.177 // *Clin. Chem.*

- Lab. Med. – 2005. – Vol. 43(10). – P. 1011–1014. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16197290> (date of the application: 20.04.2016).
287. Jakubowski H. Chemical biology of homocysteine thiolactone and related metabolites / H. Jakubowski, R. Głowacki // *Adv Clin Chem.* – 2011. – Vol. 55. – P. 81–103. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22126025> (date of the application: 20.04.2016).
288. Jakubowski H. Homocysteine Modification in Protein Structure / H. Jakubowski. – DOI 10.1152/physrev.00003.2018 // *Function and Human Disease.* – 2019. – Vol. 99, Issue 1. – P. 555–604. – URL: <https://www.physiology.org/doi/abs/10.1152/physrev.00003.2018> (date of the application: 22.05.2019).
289. Jakubowski H. Protective mechanisms against protein damage in hyperhomocysteinemia: systemic and renal detoxification of homocysteine-thiolactone / H. Jakubowski. – DOI 10.15761/BGG.1000108 // *Biomed Genet Genom.* – 2016. – Vol. 1. – P. 40–43. – URL: <https://www.oatext.com/Protective-mechanisms-against-protein-damage-in-hyperhomocysteinemia-Systemic-and-renal-detoxification-of-homocysteine-thiolactone.php> (date of the application: 20.05.2017).
290. Janeway C.A. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation / C.A. Janeway. – DOI 10.1146/annurev.iy.10.040192.003241 // *Annu Rev Immunol.* – 1992. – Vol. 10. – P.645-674. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1534242> (date of the application: 28.04.2014).
291. Kabil O. Heme-dependent metabolite switching regulates H₂S synthesis in response to endoplasmic reticulum (ER) stress / O. Kabil, V. Yadav, R. Banerjee. – DOI 10.1074/jbc.C116.742213 // *J Biol Chem.* – 2016. – Vol. 291(32). – P.16418–16423. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27365395> (date of the application: 21.05.2017).
292. Karolczak K. Inhibition of glutamate receptors reduces the homocysteineinduced whole blood platelet aggregation but does not affect superoxide anion generation or platelet membrane fluidization / K. Karolczak, A. Pieniazek, C. Watala. – DOI

- 10.1080/09537104.2016.1204438 // Platelets. – 2017. – Vol. 28. – P. 90–98. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27560773> (date of the application: 02.08.2018).
293. Karolczak K. Mechanism of action of homocysteine and its thiolactone in hemostasis system / K. Karolczak, B. Olas // *Physiol. Res.* – 2009. – Vol. 58. – P. 623–633. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19093716> (date of the application: 02.08.2018).
294. Kim W.K. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptor and free radical in homocysteine-mediated toxicity on rat cerebellar granule cells in culture / W.K. Kim, Y.S. Pae. – DOI: 10.1016/0304-3940(96)13011-1 // *Neurosci. Lett.* 216. – P.117–120. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26201664> (date of the application: 22.11.2018).
295. Kohler H. The Promise of Anti-idiotypic Revisited / H. Kohler, A. Pashov, T. Kieber-Emmons. – DOI: 10.3389/fimmu.2019.00808 // *Front. Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – Articles – 808. – URL: <file:///C:/Documents%20and%20Settings/fefelova.e/Мои%20документы/fimmu-10-00808> (date of the application: 22.01.2020).
296. Lai W.K.C. Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction / W.K.C. Lai, M.Y. Kan. – DOI 10.1159/000437098 // *Nutr. Metab.* – 2015. – Vol. 67. – P. 1–12. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26201664> (date of the application: 22.11.2018).
297. Laridan E. Neutrophil Extracellular Traps in Arterial and Venous Thrombosis / E. Laridan, K. Martinod, Simon F. De Meyer. – DOI 10.1055/s-0038-1677040 // *Semin Thromb Hemost.* – 2019. – Vol. 45 (01). – P. 086–093. – URL: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0038-1677040> (date of the application: 21.01.2020).
298. Leahy D.J. A structural view of CD4 and CD8 / D.J. Leahy. – DOI 10.1096/fasebj.9.1.7821755// *FASEB J.* – 1995. – Vol. 9 (1). – P. 17–25. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7821755> (date of the application: 22.01.2016).
299. Lijfering W.M. The risk of venous and arterial thrombosis in hyperhomocysteinemic subjects may be a result of elevated factor VIII levels / W.M. Lijfering, N.J. Veeger, J.L. Brouwer. – DOI 10.3324/haematol.11611// *Haematologica.*

- 2007. – Vol. 92, № 12. – P. 1703–1706. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18055997> (date of the application: 27.04.2015).
300. Lin J. Impact of MCP-1 in atherosclerosis / J. Lin, V. Kakkar, X. Lu. – DOI 10.2174/1381612820666140522115801 // *Curr Pharm Des.* – 2014. – Vol. 20 (28). – P. 4580–4588. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24862889> (date of the application: 27.04.2015).
301. Litvinov R.I. Role of red blood cells in haemostasis and thrombosis / R.I. Litvinov, J.W. Weisel. – DOI 10.1111/voxs.12331 // *ISBT Sci Ser.* – 2017. – Vol. 12 (1). – P. 176–183. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5404239/pdf/nihms828160.pdf> (date of the application: 21.09.2018).
302. Loscalzo J. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease (2013 Grover Conference series) / J. Loscalzo, D.E. Handy. – DOI 10.1086/675979 // *Pulm Circ.* – 2014. – Vol. 4 (2) – P. 169–174. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25006435> (date of the application: 22.08.2016).
303. Low nourishment of B-vitamins is associated with hyperhomocysteinemia and oxidative stress in newly diagnosed cardiac patients / M.I. Waly, A. Ali, A. Al-Nassri [et al.]. – DOI 10.1177/1535370215596860 // *Exp. Biol.Med.* – 2016. – Vol. 241. – P. 46–51. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26246496> (date of the application: 09.02.2019).
304. Lubos E. Homocysteine and glutathione peroxidase-1 / E. Lubos, J. Loscalzo, D.E. Handy. – DOI 10.1089/ars.2007.1771 // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2007. – Vol. 9, № 11. – P. 1923–1940. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17822368> (date of the application: 24.10.2017).
305. Lymphocytes subpopulations and cytokine levels in experimental hyperhomocysteinemia – DOI <https://doi.org/10.1007/s10517-015-2962-1> / E.V. Fefelova, P.P. Tereshkov, A.A. Dutov [et al.] // *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2015. – Vol. 159, №3. – P. 358-360. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10517-015-2962-1> (date of the application: 12.09.2019).

306. Maiolino G. The Role of Oxidized Low-Density Lipoproteins in Atherosclerosis: the myths and the facts / G. Maiolino, G. Rossitto, P. Caielli. – DOI 10.1155/2013/714653 // *Mediators of Inflammation*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 13. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3816061/> (date of the application: 24.10.2017).
307. Maru L. Homocysteine as predictive marker for pregnancy-induced hypertension-a comparative study of homocysteine levels in normal versus patients of PIH and its complications / L. Maru, M. Verma, N. Jinsiwale. – DOI 10.1007/s13224-015-0832-4 // *J Obstet Gynaecol India*. – 2016 – Vol. 66. – P.167–171. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27651597> (date of the application: 29.07.2018).
308. McCully K.S. Vascular pathology of homocysteinemia: Implications for the pathogenesis of arteriosclerosis // *Am J Pathol*. – 1969. – Vol. 56. – P. 111–128. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2013581/> (date of the application: 05.06.2015).
309. Mechanisms in hypertension and target organ damage: Is the role of the thymus key? (Review) / X. Dai, L. Hua, Y. Chen [et al.]. – DOI 10.3892/ijmm.2018.3605 // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2018. – Vol. 42. – P. 3–12. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5979885> (date of the application: 22.05.2019).
310. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis / D.A. Chistiakov, A.A. Melnichenko, V.A. Myasoedova [et al.]. – DOI 10.1007/s00109-017-1575-8 // *J. Mol. Med*. – 2017. – Vol. 95. – P. 1153–1165. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28785870> (date of the application: 20.03.2019).
311. Mechanisms of Vascular Dysfunction in COPD and Effects of a Novel Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor in Smokers / L. Yang, J. Cheriyan, D.D. Gutterman [et al.]. – DOI 10.1016/j.chest.2016.10.058 // *Chest*. – 2017. – Vol. 151(3). – P. 555–563. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5332206/> (date of the application: 10.12.2018).
312. Methionine metabolism influences genomic architecture and gene expression through H3K4me3 peak width / Z. Dai, S.J. Mentch, X. Gao [et al.]. – DOI

- 10.1038/s41467-018-04426-y // Nat. Commun. – 2018. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29769529> (date of the application: 22.05.2019).
313. Mild hyperhomocysteinemia is associated with increased TAFI levels and reduced plasma fibrinolytic potential / M. Colucci, M. Cattaneo, I. Martinelli [et al.]. – DOI 10.1111/j.1538-7836.2008.03070.x // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2008. – Vol. 6. – P. 1571–1577. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18624976> (date of the application: 22.05.2012).
314. Moderate physical exercise induces the oxidation of human blood protein thiols / T. Inayama, J. Oka, M. Kashiba [et al.]. – DOI 10.1016/s0024-3205(02)01490-x // Life Sci. – 2002. – Vol. 70. – P. 2039–2046. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12148696> (date of the application: 22.05.2016).
315. Modification of fibrinogen by homocysteine thiolactone increases resistance to fibrinolysis: a potential mechanism of the thrombotic tendency in hyperhomocysteinemia / D.L. Sauls, E. Lockhart, M.E. Warren [et al.]. – DOI 10.1021/bi052076j // Biochem. – 2006. – Vol. 45. – P. 2480–2487. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16489740> (date of the application: 09.08.2018).
316. Moretti R. The Controversial Role of Homocysteine in Neurology: From Labs to Clinical Practice / R. Moretti, P. Caruso. – DOI 10.3390/ijms20010231// Int., J. Mol: From Labs to Clinical Practice. – 2019. – Vol. 820 (1). – P. E231. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30626145> (date of the application: 05.04.2019).
317. Mori H. Structure and function of the NMDA receptor channel / H. Mori, M. Mishina. – DOI 10.1016/0028-3908(95)00109-j // Neuropharmacology. – 1995. – Vol. 34 (10). – P. 1219-1237. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8570021> (date of the application: 01.04.2015).
318. Mottet C. CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use / C. Mottet, D. Golshayan. – DOI 2007/45/smw-11916 // SWISS MED WKLY. – 2007. – Vol. 137. – P. 625–634. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18027108> (date of the application: 11.09.2015).

319. Nakamura S. Tissue factor in neutrophils: yes / S. Nakamura, T. Imamura, K. Okamoto // *J Thromb Haemost.* – 2004. – Vol. 2 (2). – P. 214–217. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14995980> (date of the application: 22.05.2017).
320. Nandi S.S. H₂S and homocysteine control a novel feedback regulation of cystathionine beta synthase and cystathionine gamma lyase in cardiomyocytes / S.S. Nandi, P.K. Mishra. – DOI 10.1038/s41598-017-03776-9 // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 36–39. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28623294> (date of the application: 22.12.2017).
321. Natural antibodies – facts known and unknown / J. Palma, B. Tokarz-Deptuła, W. Deptuła [et al.]. – DOI 10.5114/ceji.2018.81354 // *Central European Journal of Immunology.* – 2018. – Vol. 43 (4). – P. 466–475. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6384419/pdf/CEJI-43-81354.pdf> (date of the application: 22.05.2019).
322. Neutrophils phagocytose activated platelets in vivo: a phosphatidylserine, P-selectin, and beta2 integrin-dependent cell clearance program / N. Maugeri, P. Rovere-Querini, V. Evangelista [et al.]. – DOI 10.1182/blood-2008-09-180794 // *Blood.* – 2009. – Vol. 113 (21). – P. 5254–5265. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19264679> (date of the application: 02.04.2017).
323. New fundamentals in hemostasis / H.H. Versteeg, J.W. Heemskerk, M. Levi [et al.]. – DOI 10.1152/physrev.00016.2011 // *Physiol Rev.* – 2013. – Vol. 93. – P. 327–358. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23303912> (date of the application: 03.12.2016).
324. Nguyen V. Interleukin-7 and Immunosenescence / V. Nguyen, A. Mendelsohn, J.W. Larrick. – DOI 10.1155/2017/4807853 // *J Immunol Res.* – 2017. – Vol. 4807853. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28484723> (date of the application: 02.02.2018).
325. Nichols J. Testing for homocysteine in clinical practice / J. Nichols. – DOI 10.1177/0260106016686094 // *Nutr. Health.* – 2017. – Vol. 23. – P. 13–15. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28068865> (date of the application: 12.02.2018).

326. NMDA receptors are expressed in lymphocytes activated both in vitro and in vivo / A.P. Mashkina, D. Cizkova, I. Vanicky [et al.]. – DOI 10.1007/s10571-010-9519-7 // Cellular and Molecular Neurobiology. – 2010. – T.30, Vol. 6. – P. 901–907. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2041471> (date of the application: 21.03.2016).
327. Nutraceutical approaches to homocysteine lowering in hypertensive subjects at low cardiovascular risk: a multicenter, randomized clinical trial / A. Mazza, A. F. Cicero, E. Ramazzina [et al.] // J Biol Regul Homeost Agents. – 2016. – Vol. 30. – P. 921–927. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27655522> (date of the application: 09.07.2017).
328. Olas B. May modifications of human plasma proteins stimulated by homocysteine and its thiolactone induce changes of haemostatic function of plasma in vitro? / B. Olas, J. Kolodziejczyk, J. Malinowska // Gen Physiol Biophys. – 2010. – Vol. 29. – P. 186–193. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20577030> (date of the application: 12.12.2016).
329. Ouyang W. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in Inflammation / W. Ouyang, J. K. Kolls, Y. Zheng. – DOI 10.1016/j.immuni // Immunity. – 2008. – Vol. 28 (4). – P. 454–467. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400188> (date of the application: 25.01.2017).
330. Paradoxical absence of a prothrombotic phenotype in a mouse model of severe hyperhomocysteinemia / D. Sanjana, K. Anil, J. Melissa [et al.]. – DOI 10.1182/blood-2011-09-380568 // Blood. – 2012. – Vol. 119. – P. 3176–3183. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3321876/> (date of the application: 02.09.2017).
331. Paraoxonase 1 Q192R genotype and activity affect homocysteine thiolactone levels in humans / J. Perła-Kaján, K. Borowczyk, R. Głowacki [et al.]. – DOI 10.1096/fj.201800346R // FASEB J. – 2018. – Vol. 32. – P. 6019–6024. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29782204> (date of the application: 22.08.2016).
332. Perła-Kajan J. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans / J. Perła-Kajan, T. Twardowski, H. Jakubowski. – DOI 10.1007/s00726-006-0432-9 // Amino Acids. –

2007. – Vol. 32. – P. 561–572. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17285228> (date of the application: 22.08.2016).
333. PKC/NADPH oxidase are involved in the protective effect of pioglitazone in high homocysteine-induced paracrine dysfunction in endothelial progenitor cells / S. Xu, Y. Zhao, C. Jin [et al.] // *Am J Transl Res.* – 2017. – Vol. 9. – P. 1037–1048. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5375996/> (date of the application: 10.12.2018).
334. Plasma cytokines and risk of coronary heart disease in the PROCARDIS study / R. Clarke, E. Valdes-Marquez, M. Hill [et al.]. – DOI 10.1136/openhrt-2018-000807 // *Open Heart.* – 2018. – Vol. 5. – P. e000807. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5922567/> (date of the application: 22.04.2019).
335. Plasma homocysteine involved in methylation and expression of thrombomodulin in cerebral infarction / Y. Zhifuang, W. Lizhenang, X. WeiZhang [et al.]. – DOI 10.1016/j.bbrc // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 2016. – Vol. 473, Vol. 4. – P. 1218–1222. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27079234> (date of the application: 25.11.2018).
336. Platelet derived CXC chemokines: old players in new games / E. Brandt, A. Ludwig, F. Petersen [et al.] // *Immunol.* – 2000. – Vol. 17. – P. 204–216. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11138777> (date of the application: 14.08.2014).
337. Plitas G. Regulatory T Cells: Differentiation and Function / G. Plitas, A.Y. Rudensky. – DOI 10.1158/2326-6066.CIR-16-0193 // *Cancer Immunol Res.* – 2016. – Vol. 4 (9). – P. 721–725. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27590281> (date of the application: 28.09.2018).
338. Poddar R. Homocysteine-NMDA receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase leads to neuronal cell death / R. Poddar, S. Paul. – DOI 10.1111/j.1471-4159.2009.06207.x // *J. Neurochem.* – 2009. – T. 110, Vol. 3. – P. 1095–1106. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19508427> (date of the application: 21.03.2016).

339. Prechl J. A generalized quantitative antibody homeostasis model: maintenance of global antibody equilibrium by effector functions / J. Prechl. – DOI 10.1038/cti.2017.50 // Clin Transl Immunology. – 2017. – Vol. 6 (11). – P. e161. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5704100/> (date of the application: 20.04.2018).
340. Protein N-homocysteinylation: From cellular toxicity to neurodegeneration / G.S. Sharma, T. Kumar, T.A. Dar [et al.]. – DOI 10.1016/j.bbagen.2015.08.013 // Biochim Biophys Acta. – 2015. – Vol. 1850 (11). – P. 2239–2245. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26318987> (date of the application: 09.10.2017).
341. Protein N-linked homocysteine is associated with recurrence of venous thromboembolism / A. Szlauer, A. Mielimonka, R. Głowacki [et al.]. – DOI 10.1016/j.thromres.2015.09.002 // Thromb. Res. – 2015. – Vol. 136. – P. 911–916. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26371408> (date of the application: 24.11.2018).
342. Pushpakumar S. Endothelial dysfunction: the link between homocysteine and hydrogen sulfide / S. Pushpakumar, S. Kundu, U. Sen. – DOI 10.2174/0929867321666140706142335 // Curr Med Chem. – 2014. – Vol. 21 (32). – P. 3662–3672. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25005183> (date of the application: 02.09.2017).
343. Ray J.G. Hyperhomocysteinemia: no longer a consideration in the management of venous thromboembolism / J.G. Ray. – DOI 10.1097/MCP.0b013e328307ee38 // Curr Opin Pulm Med. – 2008. – Vol. 14 (5). – P. 369–373. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18664964> (date of the application: 02.03.2015).
344. Reactive oxygen species: key regulators in vascular health and diseases / Q. Chen, Q. Wang, J. Zhu [et al.]. – DOI 10.1111/bph.13828 // Br J Pharmacol. – 2018. – Vol. 175 (8). – P. 1279–1292. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28430357> (date of the application: 20.03.2019).
345. Recombinant production of human α_2 -macroglobulin variants and interaction studies with recombinant G-related α_2 -macroglobulin binding protein and latent transforming growth factor- β_2 . / L. Marino-Puertas, L. del Amo-Maestro, M. Taulés [et

al.]. – DOI 10.1038/s41598-019-45712-z // Sci Repro – 2019. – Vol. 9. – P. 9186–9198. URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-45712-z.pdf> (date of the application: 21.12.2019).

346. Reduction of Na⁺, K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically-induced hyperhomocysteinemia / E.L. Streck, C. Matte, P.S. Vieira [et al.]. – DOI 10.1023/a:1021670607647 // Neurochem. – 2002. – Vol. 27. – P. 1585–1590. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12515310> (date of the application: 21.10.2015).

347. Regeneration of glycocalyx by heparan sulfate and sphingosine 1-phosphate restores inter-endothelial communication / S.A. Mensah, M.J. Cheng, H. Homayoni [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0186116 // PLoS ONE. – 2017. – Vol. 12(10). – P. e0186116. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29023478> (date of the application: 01.09.2018).

348. Rehman A. A. α -2-Macroglobulin: a physiological guardian / A.A. Rehman, H. Ahsan, F.H. Khan. – DOI 10.1002/jcp.24266 // J Cell Physiol. – 2013. – Vol. 228. – P. 1665–1675. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23086799> (date of the application: 02.03.2015).

349. Reverse Cholesterol Transport: Molecular Mechanisms and the Non-medical / L.R. Marques, T.A. Diniz, B.M. Antunes [et al.]. – DOI 10.3389/fphys.2018.00526 // Approach to Enhance HDL Cholesterol. Front. Physiol. – 2018. – Vol. 9. – P. 526. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29867567> (date of the application: 25.03.2019).

350. Role of Ca²⁺ stores in metabotropic L-glutamate receptor-mediated supralinear Ca²⁺ signaling in rat hippocampal neurons / M.G. Rae, D.J. Martin, G.L. Collingridge [et al.] // J. Neurosci. – 2000. – Vol. 20, № 23. – P. 8628–8636. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102467> (date of the application: 02.03.2015).

351. Role of Homocysteine in the Ischemic Stroke and Development of Ischemic Tolerance / J. Lehotský, B. Tothová, M. Kovalská [et al.]. – DOI 10.3389/fnins.2016.00538 // Front Neurosci. – 2016. – Vol. 10. – P. 538. e ; 17–25. –

URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5120102/> (date of the application: 21.03.2018).

352. Role of homocysteinylation of ACE in endothelial dysfunction of arteries / A. Huang, J.T. Pinto, G. Froogh [et al.]. – DOI 10.1152/ajpheart.00577.2014 // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2015. – Vol. 308. – P. H92–H100. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25416191> (date of the application: 22.05.2016).

353. Role of Hyperhomocysteinemia and Hyperuricemia in Pathogenesis of Atherosclerosis / J. Zhao, H. Chen, N. Liu [et al.]. – DOI 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.10.012 // *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* – 2017. – Vol. 26. – P. 2695–2699. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28986198> (date of the application: 02.03.2018).

354. Role of S-adenosylhomocysteine in cardiovascular disease and its potential epigenetic mechanism / Y. Xiao, X. Su, W. Huang [et al.]. – DOI 10.1016/j.biocel.2015.06.015 // *Int. J. Biochem. – Cell Biol.* – 2015. – Vol. 67. – P. 158–166. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26117455> (date of the application: 15.04.2017).

355. Rose-John S. The soluble interleukin-6 receptor and related proteins / Rose- John S. – DOI 10.1016/j.beem.2015.07.001 // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* – 2015. – Vol. 29. – P. 787–797. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26522462> (date of the application: 02.03.2015).

356. S-adenosylhomocysteine induces inflammation through NFκB: A possible role for EZH2 in endothelial cell activation. *Biochim* / M. Barroso, D. Kao, H.J. Blom [et al.]. – DOI 10.1016/j.bbadis.2015.10.019 // *Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* – 2016. – Vol. 1862. – P. 82–92. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26506125> (date of the application: 01.12.2018).

357. Samodova A.V. The role of shedding in the activity of immunocompetent cells with the reagin protective mechanism / A.V. Samodova, L.K. Dobrodeeva // *Human Physiology*. – 2012. – Vol. 38 (4). – P. 438–443. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23101374> (date of the application: 12.04.2015).

358. Santilli F. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase, folate status and atherothrombosis: a mechanistic and clinical perspective / F. Santilli, G. Davì, C. Patrono. – DOI 10.1016/j.vph.2015.06.009 // *Vascul Pharmacol.* – 2016. – Vol. 78. – P.1–9. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26111718> (date of the application: 09.08.2018).
359. Serum PON1 arylesterase activity in relation to hyperhomocysteinaemia and oxidative stress in young adult central retinal venous occlusion patients / N. Angayarkanni, S. Barathi, T. Seethalakshmi [et al.]. – DOI 10.1038/sj.eye.6703062 // *Eye.* – 2008. – Vol. 22, № 7. – P. 969–974. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18084236> (date of the application: 12.09.2018).
360. Sharif S. Effect of Nicotine on Hematology, Lipid Profile and Liver Enzymes in Adult Male Mice (*Mus Musculus*) / S. Sharif. – DOI 10.14737/journal.aavs/2014/2.4.222.225 // *Advances in Animal and Veterinary Sciences.* – 2014. – Vol. 2 (4). – P. 222–225. – URL: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143178598> (date of the application: 09.10.2017).
361. Sharma G.S. Conformational status of cytochrome c upon N-homocysteinylation: Implications to cytochrome c release / G.S. Sharma, L.R. Singh. – DOI 10.1016/j.abb.2016.12.006 // *Arch Biochem Biophys.* – 2017. – Vol. 614. – P. 23–27. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2800309> (date of the application: 03.11.2018).
362. Shokal U. Evolution and function of thioester-containing proteins and the complement system in the innate immune response / U. Shokal, I. Eleftherianos. – DOI 10.3389/fimmu.2017.00759 // *Front Immunol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 759. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28706521> (date of the application: 08.12.2018).
363. Should plasma homocysteine be used as a biomarker of venous thromboembolism? A case-control study / V. Ducros, C. Barro, J. Yver [et al.]. – DOI 10.1177/1076029608322548 // *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* – 2009. – Vol. 15 (5). – P. 517–522. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18818229>. (date of the application: 14.03.2016).

364. Sibarov D.A. Giniatullin R GluN2A Subunit-Containing NMDA Receptors Are the Preferential Neuronal Targets of Homocysteine / D.A. Sibarov, P.A. Abushik, S.M. Antonov. – DOI 10.3389/fncel.2016.00246 // *Front. Cell. Neurosci.* – 2016. – Vol. 10. – P. 246. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5088185/> (date of the application: 08.12.2018).
365. Smoking in adolescence and young adulthood and mortality in later life: Prospective observational study / P. McCarron, G. Smith, M. Okasha [et al.]. – DOI 10.1136/jech.55.5.334 // *J Epidemiol Community Health.* – 2001. – Vol. 55 (5). – P. 334-335. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1731897/> (date of the application: 05.06.2015).
366. Sproston N.R. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection / N.R. Sproston, J.J. Ashworth. – DOI 10.3389/fimmu.2018.00754 // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 754. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29706967> (date of the application: 21.02.2019).
367. Stachydrine protects eNOS uncoupling and ameliorates endothelial dysfunction induced by homocysteine / X. Xie, Z. Zhang, X. Wang [et al.]. – DOI 10.1186/s10020-018-0010-0 // *Mol. Med.* – 2018. – Vol. 24. – P. 10. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26117455> (date of the application: 10.12.2018).
368. Stewart J. Primary prevention of cardiovascular disease / J. Stewart, G. Manmathan, P. Wilkinson. – DOI 10.1177/2048004016687211 // *A review of contemporary guidance and literature. JRSM Cardiovasc. Dis.* – 2017. – Vol. 6. – P. 204800–401668. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28286646> (date of the application: 20.12.2018).
369. Structural changes of fibrinogen molecule mediated by the N-homocysteinylation reaction / V. Genoud, P.G. Quintana, S. Gionco [et al.]. – DOI 10.1007/s11239-017-1574-1 // *J. Thromb. Thrombolysis.* – 2018. – Vol. 45. – P. 66–76. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29075923> (date of the application: 20.12.2018).
370. Subclinical arterial wall damage in patients at low to moderate cardiovascular risk / S.A. Boytcov, S.J. Urazalina, V.V. Kukharchuk [et al.]. – DOI 10.2143/AC.70.3.3080631 // *Acta Cardiologica.* – 2015. – T. 70, Vol. 3. – C. 274–281.

- URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26226700> (date of the application: 14.04.2016).
371. Swystun L.L. The role of leukocytes in thrombosis / L.L. Swystun, P.C. Liaw. – DOI 10.1182/blood-2016-05-718114 // *Blood*. – 2016. – Vol. 128 (6). – P. 753–762. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27354721> (date of the application: 24.11.2018).
372. SXXB pill suppresses homocysteine-induced vascular smooth muscle cells dedifferentiation by inhibiting NLRP3 inflammasomes activation via ERK/p38 MAPK pathways / L.B. Liu, H.F. Shen, W. Cha [et al.]. – PMID: PMC6413280 // *Am J Transl Res*. – 2019. – Vol. 11 (2). – P. 806–818. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30899381> (date of the application: 20.05.2019).
373. Tabas I. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis / I. Tabas, G. García-Cardena, G.K. Owens. – DOI 10.1083/jbs.201412052 // *J. Cell Biol*. – 2015. – Vol. 209. – P. 13–22. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25869663> (date of the application: 20.12.2017).
374. Takagi H.A meta-analysis of circulating homocysteine levels in subjects with versus without abdominal aortic aneurysm / H. Takagi, T. Umemoto // *Int Angiol*. – 2015. – Vol. 34. – P. 229–237. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24732583> (date of the application: 22.12.2016).
375. Targeting vascular (endothelial) dysfunction / A. Daiber, S. Steven, A. Weber [et al.]. – DOI 10.1111/bph.13517 // *Br J Pharmacol*. – 2017. – Vol. 174 (12). – P. 1591–1619. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27187006>. (date of the application: 14.04.2018).
376. Thaker A. Prolongation of PTT by CRP Is Magnified in the Setting of Heparin and Warfarin Therapy / A. Thaker, W. Chandler. – DOI 10.1093/ajcp/aqw191.004 // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2017. – Vol. 147, Issue suppl. 2. –P. S153. – URL: https://academic.oup.com/ajcp/article/147/suppl_2/S153/3059220 (date of the application: 02.01.2019).
377. The Coagulation Factors Fibrinogen, Thrombin, and Factor XII in Inflammatory Disorders – A Systematic Review / K. Göbel, S. Eichler, H. Wiendl [et al.]. – DOI

10.3389/fimmu.2018.01731 // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 1731–1744. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6077258/> (date of the application: 02.01.2019).

378. The co-existence of elevated high sensitivity C-reactive protein and homocysteine levels is associated with increased risk of metabolic syndrome: A 6-year follow-up study / J. Kim, S. Pyo, D.W. Yoon [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0206157 // *PLoS ONE.* – 2018. – Vol. 13 (10). – P. e0206157. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30352089> (date of the application: 09.01.2019).

379. The contribution of homocysteine metabolism disruption to endothelial dysfunction / R. Esse, M. Barroso, I.T. Almeida [et al.]. – DOI 10.3390/ijms20040867 // *State-of-the-art International Journal of Molecular Sciences.* – 2019. – P. E867. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30781581> (date of the application: 21.05.2019).

380. The endothelial cell annexin A2 system and vascular fibrinolysis / M. Dassah, A.B. Deora, K. He [et al.] // *Gen Physiol Biophys.* – 2009. – Vol. 28. – P. 20–28. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20093722> (date of the application: 24.04.2012).

381. The immunoregulatory effects of homocysteine and its intermediates on T-lymphocyte function / H. Dawson; G. Collins, R. Pyle [et al.]. – DOI 10.1016/j.mad.2003.11.013 // *Mech Ageing Dev.* – 2004. – Vol. 125. – P. 107–1010. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15037011> (date of the application: 24.03.2016).

382. The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health / A. Kumar, H.A. Palfrey, R. Pathak [et al.]. – DOI 10.1186/s12986-017-0233-z // *Nutr. Metab.* – 2017. – Vol. 14. – P. 78. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29299040> (date of the application: 21.10.2018).

383. The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health / H. Škovierová, E. Vidomanová, S. Mahmood [et al.]. – DOI 10.3390/ijms17101733 // *Int J Mol Sci.* – 2016. – Vol. 17. – P. E1733. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27775595> (date of the application: 25.02.2017).

384. The Multiple Faces of C-Reactive Protein—Physiological and Pathophysiological Implications in Cardiovascular Disease / M. Boncler, Y. Wu, C. Watala [et al.]. – DOI 10.3390/molecules24112062 // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24 (11). – P. 2062–2080. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6600390/pdf/molecules-24-2062.pdf> (date of the application: 13.12.2019).
385. The relationship between serum homocysteine and highly sensitive C-reactive protein levels in children on regular hemodialysis / M. Abdel-Salam, S. Ibrahim, S.A. Pessar [et al.]. – DOI 10.4103/1319-2442.206442 // *Kidney Dis Transpl.* – 2017. – Vol. 28. – P. 483–490. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28540883> (date of the application: 13.06.2018).
386. Thomas M.J. The role of free radicals and antioxidants: how we know they are working? / M.J. Thomas. – DOI 10.1080/10408399509527683 // *Crit.Rev.Food Sci.Nutr.* – 1995. – Vol. 35. – P. 21–39. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7748477> (date of the application: 22.12.2016).
387. Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils / R. Bizios, L. Lai, J.W. Fenton [et al.]. – DOI 10.1002/jcp.1041280318 // *J Cell Physiol.* – 1986. – Vol. 128 (3). – P. 485–490. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/374528> (date of the application: 11.03.2017).
388. Toohey J.I. Possible Involvement of Hydrosulfide in B₁₂-Dependent Methyl Group Transfer / J.I. Toohey. – DOI 10.3390/molecules22040582 // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22. – P. 5–82. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28379205> (date of the application: 07.09.2018).
389. Undas A. Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence / A. Undas, J. Brozek, A. Szczeklik. – DOI 10.1160/TH05-05-0313 // *Thromb Haemost.* – 2005. – Vol. 94. – P. 907–915. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16363230> (date of the application: 03.12.2016).
390. Urinary excretion of homocysteine thiolactone and the risk of acute myocardial infarction in coronary artery disease patients / K. Borowczyk, J. Piechocka, R. Głowacki [et al.]. – DOI 10.1111/joim.12834 // *The WENBIT trial. J. Intern. Med.* –

2018. – Vol. 285. – P. 232–244. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30193001> (date of the application: 13.04.2019).
391. Urinary homocysteine thiolactone predicts acute myocardial infarction in a randomized controlled homocysteine-lowering B-vitamin trial / H. Jakubowski, K. Borowczyk, R. Glowacki [et al.]. – DOI 10.1111/joim.12834 // *Circulation*. – 2015. – Suppl 3, Vol. 132. – P. A19250. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30193001/> (date of the application: 21.04.2016).
392. Wai Keung C. Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction / C. Wai Keung, M. Lai, K. Yin. – DOI 10.1159/000437098 // *Ann Nutr Metab*. – 2015. – Vol. 67. – P. 1–12. – URL: <https://www.karger.com/Article/FullText/437098> (date of the application: 09.02.2019).
393. Weyrich A.S. Platelets: signaling cells in the immune continuum / A.S. Weyrich, G.A. Zimmerman. – DOI 10.1016/j.it.2004.07.003 // *Trends Immunol*. – 2004. – Vol. 25 (9). – P. 489–495. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15324742> (date of the application: 29.02.2016).
394. William P.F. Homocysteine and thrombosis: guilt by association? / P.F. William. – DOI 10.1182/blood-2012-01-401513 // *Blood*. – 2012. – Vol. 119. – P. 2977–2978. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22461473> (date of the application: 19.05.2017).
395. Yau J. W. Endothelial cell control of thrombosis / J.W. Yau, H. Teoh, S. Verma. – DOI 10.1186/s12872-015-0124-z // *BMC Cardiovasc Disord*. – 2015. – Vol.15. – P.130. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26481314> (date of the application: 10.12.2018).
396. Yuyun M.F. Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5-methyltetrahydrofolate in cardiovascular disease / M.F. Yuyun , L.L. Ng , G.A. Ng. – DOI 10.1016/j.mvr.2018.03.012 // *Microvasc Res*. – 2018. – Vol. 119. – P. 7–12. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29596860> (date of the application: 12.02.2019).
397. Zhang Z. Principal components analysis in clinical studies / Z. Zhang, A. Castelló. – DOI 10.21037/atm.2017.07.12 // *Ann Transl Med*. – 2017. – Vol. 5(17). –

P. 351. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28936445> (date of the application: 02.03.2018).