



На правах рукописи

Фефелова Елена Викторовна

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ В
ЭКСПЕРИМЕНТЕ И КЛИНИКЕ**

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Чита – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Цыбиков Намжил Нанзатович

Официальные оппоненты:

Каде Азамат Халидович – доктор медицинских наук, профессор.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой общей и клинической патофизиологии, г. Краснодар

Шолохов Леонид Федорович – доктор медицинских наук, профессор.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» Министерства науки и высшего образования РФ, руководитель лаборатории физиологии и патологии эндокринной системы, г. Иркутск

Шахматов Игорь Ильич – доктор медицинских наук, профессор.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой нормальной физиологии, г. Барнаул

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Хабаровск

Защита диссертации состоится «23 июня» 2021 года в __.⁰⁰ на заседании диссертационного совета Д 208.118.02 при ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (672000, г.Чита, ул. Горького, 39а)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте: <http://chitgma.ru>

Автореферат разослан «__»_____ 2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 208.118.02

доктор медицинских наук, доцент

Наталья Анатольевна Мироманова



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 [Каражанова Л.К., 2016; Сергиенко И.В., 2017; Снежицкий В.А., 2016; Barros M., 2017; Cancel Limary M., 2016; Dayal S., 2017; Gao S., 2017; Mazza A., 2016].

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 [Бутенко А.В., 2016].

Патологическое накопление Hcy чаще развивается на фоне генетически детерминированных дефектов ферментов фолатного цикла [Dayal S., 2017] либо недостатка витаминов группы В и фолиевой кислоты в пищевом рационе [Cianciolo G., 2017]. Большинство авторов придерживается той точки зрения, что избыток Hcy оказывает прямое повреждающее действие на сосудистую стенку [Каргин В.Д., 2017; Cianciolo G., 2017; Grau E., 2018]. Предположительных механизмов повреждающего действия ГГЦ довольно много. Так, показано, что данное состояние сопровождается активацией окислительного стресса [Бутенко А.В., 2016; Каргин В.Д., 2017; Moretti R., 2019], что вызывает повреждение эндотелиоцитов [Дунаевская С.С., 2017; Lehotský J., 2016], инактивацию оксида азота, модификацию различных структур организма [Fateeva V.V., 2017], в том числе и ЛПНП [Marques L.R., 2018], что приводит к развитию воспалительного процесса, и как следствие атеросклерозу и гипертонической болезни [Шилов А.В., 2017; Aday A.W., 2019]. Наряду с этим было показано, что в нейронах и астроцитах Hcy оказывал антиоксидантный эффект [Hassan A. 2017; Morretti R., 2019; Ospina-Romero N., 2016]. Такие противоположные данные можно объяснить только тем, что механизмы активации окислительного стресса под влиянием ГГЦ изучены недостаточно.

Кроме того, Hcy изменяет активность факторов XII и V [Daisuke H., 2016; Zamolodchikov D., 2018], угнетает образование протеина С [Папаян Л.П., 2015], снижает экспрессию тромбомодулина [Zhifu Y., 2018] и гепарансульфатов [Mensah S.A., 2017], повышает синтез тромбоксана А₂ в тромбоцитах, увеличивает экспрессию Р-селектина и снижает образование оксида азота тромбоцитами [Zhihong Z., 2016; George R., 2016] что приводит к развитию гиперкоагуляции [Калинин Р.Е., 2017; Mohammad R.D., 2017].

Однако, J. Ray (2008) считает, что самостоятельная роль ГГЦ в тромбообразовании отсутствует. С ним согласился ряд исследователей, считающих, что протромботический потенциал Hcy реализуется только при

наличии врождённых и/или приобретенных факторов риска [Santilli F., 2016; Wu X., 2019].

Нсу активирует NF-κB – фактор транскрипции, который, стимулируя синтез цитокинов, хемокинов, молекул адгезии лейкоцитов, усиливает миграцию лейкоцитов в стенку сосуда, что приводит к инициации процесса атерогенеза [Сергиенко И.В., 2017; Chen N., 2018].

Кроме этого, показано, что Нсу вызывает повреждение различных структур организма путем гомоцистеинилирования белковых структур. Показано, что некоторые гомоцистеинилированные белки плазмы, например альбумин, вызывают воспалительный ответ и усиливают адгезию моноцитов к эндотелию сосудов [Sejkova S., 2016; Jakubowski H., 2016; Liu L.B., 2018]. Кроме того, такие измененные белки способствуют апоптозу [Cancel Limary M., 2016]. 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 [Grau E., 2018; Karolczak K., 2017; Sibarov D.A., 2016]. 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 аминотиола 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.

Степень разработанности темы исследования. Гипергомоцистеинемия является индуктором различных заболеваний, начиная от атеросклеротического повреждения сосудистой стенки до дефектов нервной трубки плода [Каражанова Л.К., 2016; Barroso M., 2016; Kumakura H., 2015]. Гипотеза, что ГГЦ является причиной атеросклероза, была предложена McCully в 1969 году [McCully K.S., 1969]. Ретроспективные исследования случай-контроль показали, что 10% всех заболеваний ИБС связаны с высокими уровнями Нсу или, что повышение уровня Нсу в крови на 5 мкмоль/л повышает риск развития ИБС на 84% [Hassan A., 2017].

Взгляды на патогенетические механизмы возникновения и воздействия на организм ГГЦ не однозначны. Нсу 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 [Jun-Chao X., 2018]. В плазме основная масса Hcy находится в дисульфидной форме, реагируя со свободными тиолсодержащими молекулами, такими как Hcy, цистеин, белки (например, альбумин) [Jakubowski H., 2016]. Только небольшая часть Hcy плазмы остается в восстановленной форме [Lehotský J., 2016].

Одним из механизмов неблагоприятного действия Hcy является активация окислительного стресса, ведущая в первую очередь к повреждению эндотелия с развитием его дисфункции [Каргин В.В., 2017; Aday A.W., 2019; Chen Q., 2018; Esse R., 2019].

Hcy также может способствовать атерогенезу, опосредуя апоптотическую гибель эндотелиоцитов и клеток гладких мышц [Denny K.J., 2016]. 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 [Шилов А.В., 2017; Xie X., 2018]. Считается, что пролиферация гладкомышечных клеток в стенке артерий является ключевым событием в развитии атеросклероза [Stewart J., 2017].

Кроме этого, Hcy инициируя активность моноцитов, Т-лимфоцитов, эндотелиоцитов вызывает развитие хронического воспаления в месте атеросклеротического поражения [Каражанова Л.К., 2016; Сергиенко И.В., 2017].

Дополнительные исследования с использованием эндотелиальных клеток человека показывают, что повышенный уровень АФК, стресс эндоплазматического ретикулума и образование Hcy-тиолактона способствуют развитию Hcy-индуцированному апоптозу [Chistiakov D.A., 2017; Nadesalingam A., 2018; Zhang Z., 2017].

Воздействие на эндотелиальные клетки ГГЦ вызывает увеличение экспрессии тканевого фактора, фактора V и активации фактора XII [Ospina-Romero N., 2016], что приводит к гиперкоагуляции [Mohammad R.D., 2016]. Кроме того, эффект Hcy усиливается за счет инактивации белка C и фактора свертывания крови XIV, а также за счет ингибирования фибринолитического процесса [Genoud V., 2018].

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

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 параметры 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 дозозависимое 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 Vcl-2. В моноцитах крови аминотиолы не вызывают активации

апоптического процесса. Нейтрофилы и лимфоциты здоровых и больных ИБС реагируют не однотипно при контакте с Hcy и Hcy-T.

В диапазоне концентраций Hcy 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 конъюгат сывороточного альбумина как крысы, так и человека с Hcy и Hcy-T и впервые показано, что у животных на фоне введения Hcy и Hcy-T 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 Hcy сопровождается выраженным снижением числа T-лимфоцитов и их субпопуляций. Постоянная ГГЦ на протяжении 9 суток вызывает увеличение общего числа лимфоцитов, за счет цитотоксических T-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 явиться 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.

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 коагратов 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 коагратов.

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.

Методология и методы исследования. Проведено комплексное исследование 111 пациентов с диагнозом «ишемическая болезнь сердца» и 60 - с диагнозом «гипертоническая болезнь», 23 человека, страдающих хроническим риносинуситом в стадии рецидива и ремиссии. 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.

Внедрение результатов исследования. Результаты настоящего исследования о механизмах повреждающего действия ГГЦ внедрены в научно-исследовательскую деятельность и учебный процесс на кафедре патологической физиологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России.

Степень достоверности. Научные положения и выводы обоснованы достаточным объемом клинического и экспериментального материала с использованием современных методов, сертифицированного оборудования и реактивов, с применением статистической обработки полученных результатов при непосредственном участии автора в получении и анализе данных.

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, 2011); III Международной научно-практической конференции «Имунофизиология: 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 гемореологии (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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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).

Исследование влияния экзогенной гипергомоцистеинемии на функциональную активность клеток

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 ИБС (стабильная стенокардия 2 функционального класса). Кровь забирали 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 гомотеина в концентрации 50 мкмоль/л, NMDA в концентрации 50 мкмоль/л. В третью (контрольную) – эквивалентный объем физиологического раствора. После 4-х часов инкубации при 37⁰С в 4,8% CO₂ определяли фенотип лейкоцитов, маркеры активации и экспрессию маркеров апоптоза и активации клеток на проточном цитофлюориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США).

Математическую обработку цитометрических данных проводили при помощи программ СХР v. 2.2 и KaluzaTM v.1.2 (Beckman Coulter, США).

Культура мононуклеаров

Получение мононуклеарных лейкоцитов проводили с помощью осаждения клеток на градиенте плотности фиколла – 1,077 (Histopaque®-1077, Sigma, США). Количество клеток определяли на проточном цитофлюориметре "Cytomics FC-500" (Beckman Coulter, USA). 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).

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 мМ L-глутамин и 10 мМ NEPES. Для исследования использовали культуру 4-6 пассажа с исходной концентрацией 20000 клеток на 1см³. В лунки вносили 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 37⁰С. Затем клетки фотографировали при увеличении x1500. Пробы культуральной среды из каждой лунки разливали в микропробирки и замораживали при -80⁰С для последующих исследований. Фибробласты фиксировали 1% глутаровым альдегидом 30 минут, промывали раствором Хенкса и окрашивали кристаллическим фиолетовым.

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).

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.

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.).

Моделирование гипергомоцистеинемии у интактных крыс и животных с иммунодефицитом (ИДС)

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

Модель ИДС получали путем внутрибрюшинного введения раствора циклофосфана (ООО «ЛЭНС-фарм». Регистрационный номер: Р N 000459/01) в дозе 100 мг/м² 2 раза в неделю. Наличие ИДС подтверждали иммунограммой. Кровь забирали из подключичной вены в vacutainer, содержащий динатриевую соль ЭДТА, объемом 0,5 мл.

В последующем, десяти интактным и десяти крысам с ИДС вводили внутрибрюшинно Hcy в концентрации 100 мкмоль на 1 мл ОЦК. Расчет ОЦК крысы проводили в соответствии с соотношением 5-7 мл/100 г веса. Другим десяти интактным и десяти крысам с ИДС вводили Hcy-T в той же дозе. 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.

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. Отмытый осадок фиксированных эритроцитов в объеме 0,5 мл добавляли к 2,5 мл раствора модифицированного альбумина в 0,15 М фосфатном буфере с рН 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).

Определение концентрации гомоцистеина

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

Определение циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК)

ЦИК определяли методом преципитации с раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ) (Sigma, США) в концентрации 3,5%; 7% и 10%.

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 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.

Для гистологического исследования ткани сердца фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Серийные парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм изготавливали по стандартной методике, окрашивали гематоксилин-эозином и 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.

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.

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).

Изучение влияния экзогенной ГГЦ 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). Цитофлуорометрию 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). Клетки считали на проточном цитофлуориметре "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).

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

Содержание СРБ измеряли методом иммунотурбидиметрии с латексным усилением.

Концентрацию церулоплазмينا измеряли путем оценки его ферроксидазной активности в сыворотке крови.

Коагулогические показатели регистрировали в венозной крови. 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 (ТФ) оценивали иммуногистохимическим методом. 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 (Хи-квадрат).

Влияние гипергомоцистеинемии на организм человека

Характеристика исследуемых групп

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 при ФГБОУ ВО ЧГМА (протокол № 2 от 06.11.2009 г.). Все исследования проводились с информированного согласия испытуемых, после подписания ими формы добровольного информированного согласия.

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".

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 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). 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).

Третья группа – пациенты с гипертонической болезнью II стадии, 2 – 3 степени подъема артериального давления, со степенью риска 3 (20 человек).

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).

Пятая группа – ИБС: стабильная стенокардия III ФК, осложнения: НК II А, III ФК (28 человек).

Шестая группа – ИБС: острый коронарный синдром без подъема сегмента ST, осложнения: НК II А, III ФК (20 человек).

Седьмая группа – больные с Q-инфарктом миокарда в острую стадию (20 человек). 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 данного фрагмента 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, коагулограмму, общий анализ крови, биохимические показатели крови, общий анализ мочи, эхокардиографию, дуплексное сканирование брахиоцефальных сосудов.

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.

Концентрацию гомоцистеина в образцах устанавливали методом ВЭЖХ.

Количество циркулирующих эндотелиоцитов (СЕС, ЦЭК) определяли методом проточной цитофлуориметрии на аппарате FC (BC) 500.

Определялось количество CD146+CD45- клеток на 500 000 клеток белой крови (реактивы фирмы Beckman Coulter).

Уровни цитокинов измерялись ИФА методом с диагностическими наборами производства ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ» (Россия).

Абсолютное число тромбоцитов подсчитывали на гематологическом анализаторе PENTRA 120 Retic-.

Исследование агрегации тромбоцитов производили отечественным агрегометром марки «Биола» с использованием АДФ и ристомицина.

Оценка характера изменений параметров коагуляционного гемостаза проведена по общепринятым показателям.

Пространственный рост фибринового сгустка наблюдали с помощью прибора «Регистратор Тромбодинамики Т-2» («Гемакор», Москва).

Уровень аутоантител к тромбину определялся по методу Цыбикова Н.Н., 1988.

В сыворотке крови всех обследуемых регистрировался уровень окисленных ЛПНП и антител к ним методом ИФА (тест-наборов «Biomedica» (Германия)), параметры липидного спектра.

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

Иммунные комплексы, содержащие холестерин и триглицериды, определялись по методу Б.Б. Шойбонова, 2012.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакетов прикладных программ Microsoft Excel и Statistica 6. Достоверность различий оценивали непараметрическим критерием Вилкоксона для сравнения двух зависимых переменных; для определения достоверности различий между независимыми переменными при нормальном распределении признака использовали t-критерий Стьюдента, а при отсутствии нормального распределения – непараметрический критерий Манна-Уитни. Для сравнения между группами категориальных переменных использовали χ^2 -критерий Пирсона. Корреляционный анализ проводили по методу Спирмена. Показатели приведены в виде медианы и 25 и 75 перцентиля. Статистически достоверными считались различия при значениях $p < 0,05$.

Для изучения вклада изучаемых показателей и их взаимосвязи на формирование дисфункции эндотелия, развития гиперкоагуляции использовался метод главных компонент. При построении математической модели оценки влияния различных факторов в изменение поперечного размера сосудистой стенки использовался метод множественной пошаговой регрессии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние гипергомоцистеинемии на состояние организма человека

Содержание общего гомоцистеина в исследуемых группах представлено на рисунке 1. Наблюдалось повышение концентрации Нсу в крови лиц с риском развития сосудистых катастроф, ГБ 3 стадии и ИБС. Максимальные концентрации наблюдались у больных в острую стадию инфаркта миокарда.

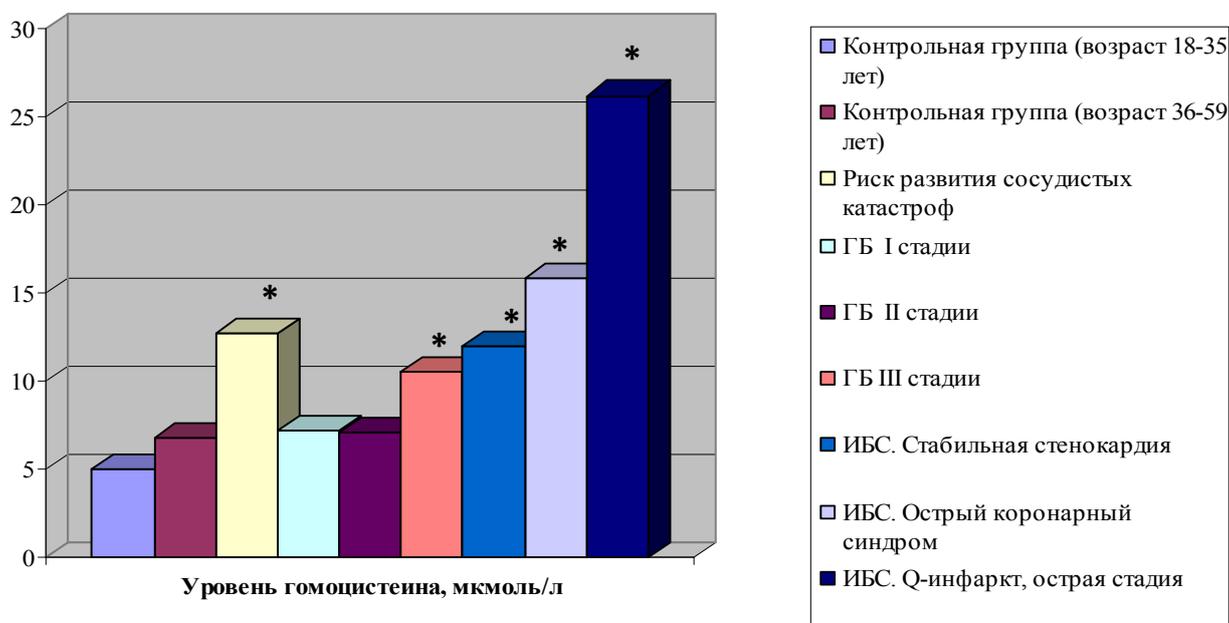


Рисунок 1. Уровень общего гомоцистеина в обследуемых группах.

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

При этом, максимальный уровень о-ЛПНП зафиксирован в группе с риском сосудистых катастроф (рис. 2).

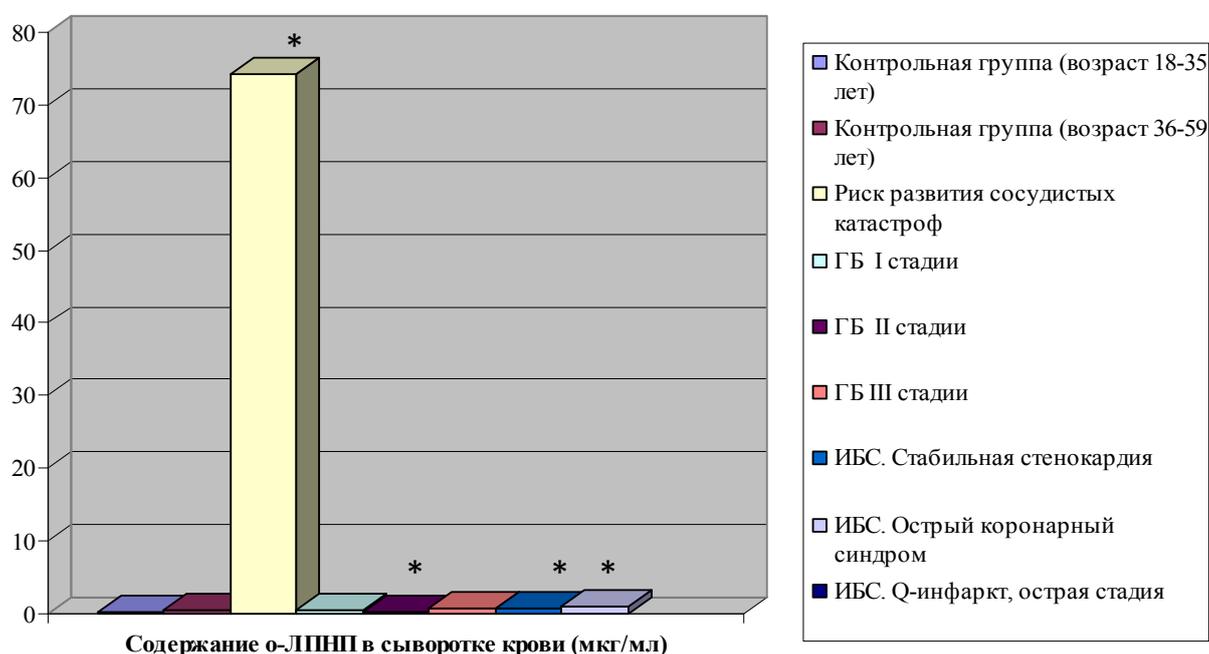


Рисунок 2. Содержание о-ЛПНП в обследуемых группах (мкг/мл)
 Примечание: * – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой контроля.

Титр аутоантител к о-ЛПНП был также наибольшим в группе с риском развития сосудистых катастроф (рис. 3).

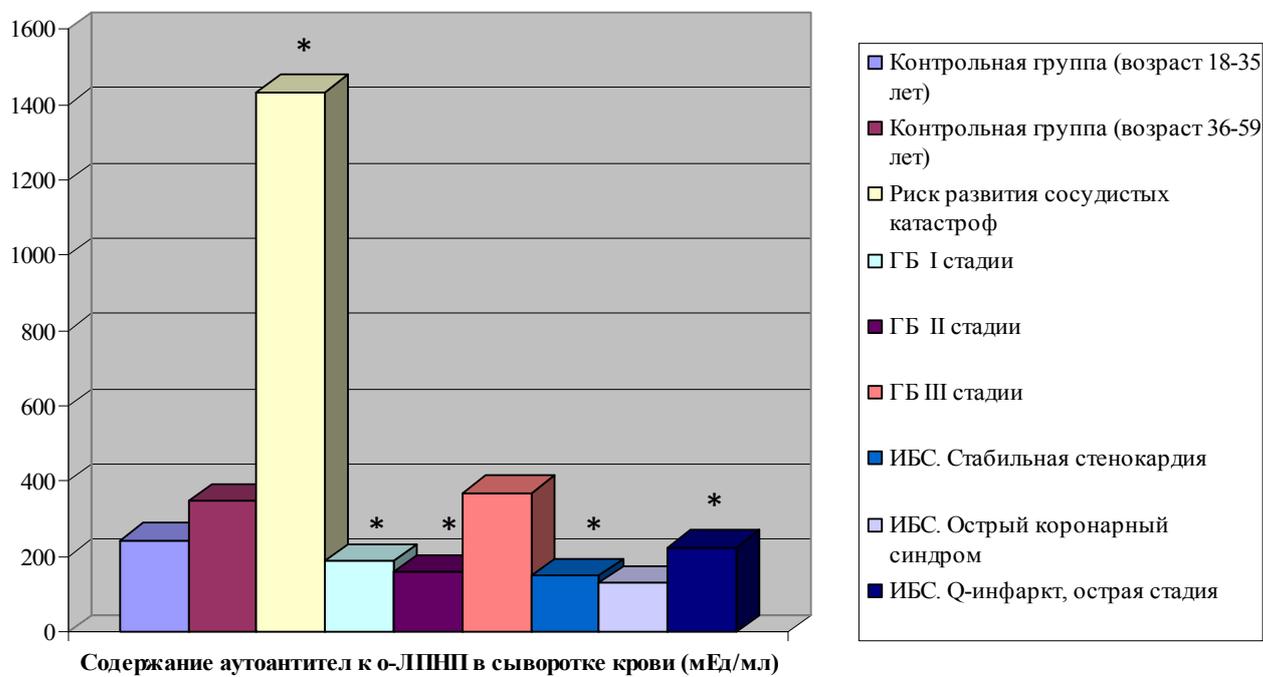


Рисунок 3. Уровень аутоантител к окисленным липопротеидам в обследуемых группах

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

Признанным прямым маркером дисфункции эндотелия выступают циркулирующие эндотелиоциты (СЕС). Число СЕС у больных ГБ превышало значения в группе контроля и зависело от степени тяжести страдания. При этом практически все эндотелиальные клетки были живы. Число СЕС у больных ИБС отличалось, как от группы контроля, так и от их количества у лиц, страдающих ГБ, с максимальным уровнем у больных с ОКС. У лиц, страдающих Q-инфаркт миокарда, в первые сутки их величина в 1,6 раз была меньше по сравнению с ОКС, однако, практически половина этих клеток была мертва (рис.4).

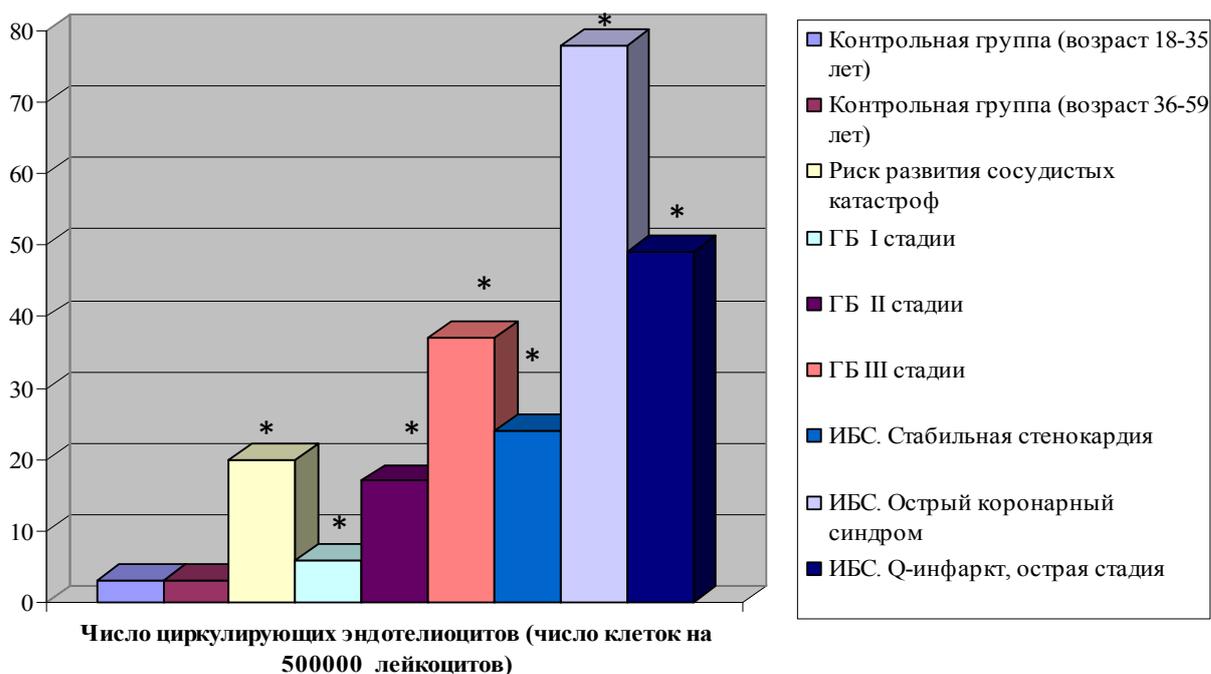


Рисунок 4. Содержание циркулирующих эндотелиоцитов у больных ГБ и ИБС

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

Изучение параметров стандартной коагулограммы у больных ГБ выявило разницу только в содержании фибриногена – наблюдался его рост у больных II и III стадией ГБ ($p=0,0001$).

Однако, показатели пространственного роста сгустка у больных ГБ начали меняться уже на I стадии заболевания – увеличилась стационарная скорость тромбообразования ($p < 0,0001$), а также размер фибринового сгустка на ($p=0,013$). Во вторую и третью стадию ГБ зафиксированы более выраженные сдвиги, свидетельствующие о наличии гиперкоагуляции.

У пациентов с различными формами ИБС наблюдалась гипокоагуляция на фоне введения достаточно высоких доз непрямых антикоагулянтов больным и на различных этапах лечения.

Однако, изучение пространственного роста фибринового сгустка у пациентов с ОКС без подъема сегмента ST, выявило увеличение времени задержки роста сгустка, его начальной и стационарной скорости. Одновременно с этим возрастал общий размер сгустка и его плотность, что свидетельствует о наклонности к тромбообразованию у этой группы лиц.

Наблюдался рост аутоантител к тромбину. Так, в первую стадию ГБ их уровень возрастает в 2,5 раза ($p < 0,0001$), во вторую – 3,5 раза ($p < 0,0001$), в третью – 6 раз ($p < 0,0001$), в 2,6 раз у лиц, страдающих стабильной стенокардией ($p < 0,0001$), в 4,3 раза – у больных ОКС ($p < 0,0001$), и в 8,3 раз в острую стадию ИМ ($p < 0,0001$) по сравнению с показателями крови доноров.

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 Нсу и уровнем аутоантител к тромбину (0,494, $p < 0,05$).

Методом главных компонент показал, что содержание гомоцистеина влияет на липидный спектр, состояние системы гемостаза, состояние эндотелия сосудов и толщину комплекса интима-медиа. У лиц, страдающих ГБ и ИБС, эти тенденции сохраняются, но при этом усиливаются корреляционные взаимоотношения, нарастают иммуновоспалительный и коагулопатические синдромы.

К факторам, наиболее связанным с утолщением стенки сонных артерий метод отнес уровень гомоцистеина, общего холестерина, триглицеридов, концентрация интерлейкина 2 и титр аутоантител к тромбину, что позволило построить математическую модель определения толщины комплекса интима-медиа. Она равна $= 0,128 + 0,073 \cdot \text{концентрация гомоцистеина, мкмоль/л} + 0,055 \cdot \text{ОХ, ммоль/л} - 0,025 \cdot \text{ТАГ} + 1,832 \cdot \text{АТ к тромбину} - 0,052 \cdot \text{IL 2, пг/мл}$.

Влияние экзогенной гипергомоцистеинемии в экспериментах *in vivo*

Через 6 часов после однократного введения Нсу уровень аминотиола в плазме крови возрос практически в 2 раза ($p = 0,0117$), при введении Нсу один раз в сутки в той же дозе в течение 9 дней его концентрация увеличилась в 2,7 раза ($p = 0,0499$), а при 4 разовых инъекциях в сутки в той же дозе (каждые 6 часов) в течение 9 дней – 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.

Изменения в иммунограмме экспериментальных животных представлены на рисунке 5.

абс. в 1 мкл крови

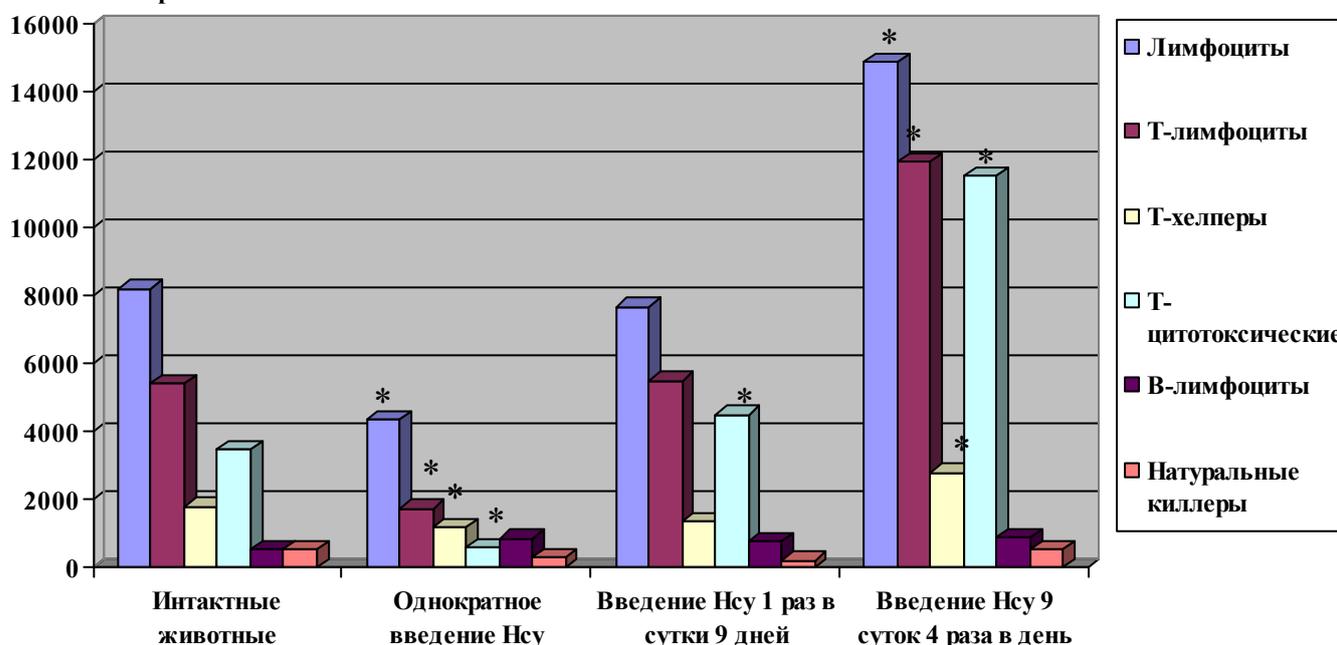


Рисунок 5. Показатели иммунограммы крыс при экспериментальной экзогенной ГГЦ

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

Общий пул лимфоцитов у животных при однократном введении Нсц 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, при этом зафиксирован рост концентрации IL-1 α в 5 раз ($p=0,00001$), IL-4 (в 71 раз ($p=0,00001$), IL-17 в 11 раз ($p=0,00001$). При субхроническом введении гомоцистеина 1 раз в сутки наблюдалось увеличение уровня Т-цитотоксических лимфоцитов в 1,2 раза ($p=0,012$) и снижение популяции натуральных киллеров в 1,4 раза ($p=0,012$) на фоне падения количества IL-1 α в 7,5 раз ($p=0,0001$), и роста концентраций IL-4 (в 4300 раз ($p=0,00001$)) и IL-17 (в 26 раз ($p=0,00008$)). Введение Нсц каждые 6 часов в течение 9 дней сопровождалось резким увеличением абсолютного количества всех лимфоцитов, за счет Т-лимфоцитов ($p=0,01$), минимальным содержанием IL-1 α и максимальным ростом уровня IL-4 и IL-17.

Со стороны врожденного звена иммунной системы наблюдалась та же тенденция.

Зафиксировано сокращение показателей коагуляционного гемостаза у экспериментальных животных, что свидетельствует о развитии гиперкоагуляции.

При исследовании экспрессии тканевого фактора (TF) под воздействием высоких доз гомоцистеина в клетках миокарда экспериментальных животных 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.

Масса сердца у крыс на 10 сутки введения Нсу каждые 6 часов не изменялась по сравнению с интактными животными. Однако, при этом, в этой группе снизилось как абсолютное количество кардиомиоцитов (КМЦ) (8, 01 (7,75; 8,3), 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: межклеточный 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 межклеточной строме отмечалось формирование диффузных лимфогистиоцитарных инфильтратов с примесью плазматических клеток, фибриноидное набухание периваскулярной стромы и признаки васкулитов.

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 (рис. 6).

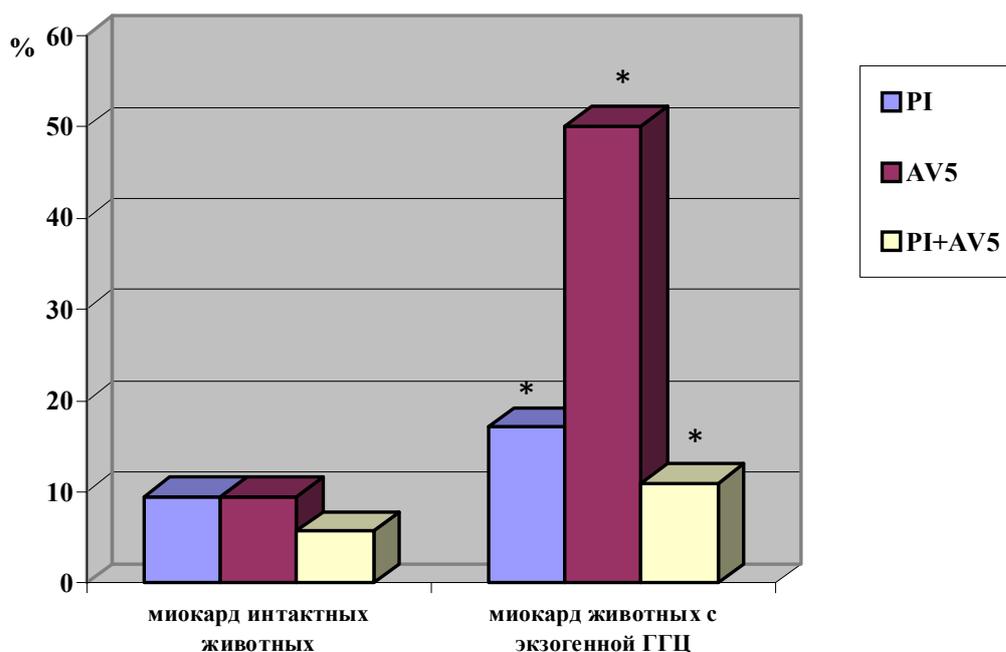


Рисунок 6. Маркеры клеточной гибели в миокарде крыс с экспериментальной гипергомоцистеинемией

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

Проведенный анализ факторов, при моделировании экзогенной гипергомоцистеинемии *in vivo*, позволяет выделить у экспериментальных животных, наличие следующих синдромов: цитолитического, системной воспалительной реакции, коагулопатического, иммунопатологического, дисфункции эндотелия. Они и определяют своеобразие функционального состояния организма животного в реальный момент времени.

Гипергомоцистеинемия у иммунодефицитных животных

Иммунодефицитное состояние вызывали путем введения экспериментальным животным циклофосфана, и подтверждали показателями иммунограммы. У иммунодефектных животных отмечались изменения как в гуморальном звене иммунной системы – снижалось абсолютное количество В-лимфоцитов на 30% ($p=0,01$); так и в клеточном – уменьшалось соотношение Т-хелперы/Т-цитотоксические лимфоциты в 2 раза ниже контроля ($p=0,0005$), на фоне снижения Т-хелперов (CD3+, CD4+) на 43,1 % ($p=0,003$) и увеличение процентного количества Т-лимфоцитов на 23,4 % ($p=0,001$) по сравнению с соответствующими показателями у интактных крыс.

Содержание Нсу у иммунодефектных крыс было практически в 2 раза выше ($p=0,0001$) чем у интактных животных. Через 6 часов после инъекции Нсу его концентрация в сыворотке крови у крыс с ИДС превышала значения в группе контроля в 3 раза ($p=0,0003$); после введения Нсу-Т уровень эндогенного Нсу – почти в 2 раза ($p=0,004$). На 10 сутки введения аминотиолов уровень Нсу был практически в 2 раза выше у крыс с ИДС по сравнению с концентрацией у интактных ($p=0,005$ и $p=0,002$), при этом не отличался от содержания его до нагрузки тиолами.

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, $p=0,0001$).

Ответ организма на модификацию аминокислотами белковых структур организма

Нами получен комплекс сывороточного альбумина с Hcy, что подтверждает возможность образования конъюгатов Hcy с белками *in vitro*. 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).

У интактных крыс до нагрузки Hcy и Hcy-T были обнаружены аутоантитела к альбумину, модифицированному Hcy. Через 6 часов после введения аминокислот титр аутоантител класса IgG повысился в 8 раз ($p=0,01$), а титр всех классов Ig увеличился более выражено: в 24 раза после введения Hcy ($p=0,01$) и в 32 раза после нагрузки животных Hcy-T ($p=0,001$).

На фоне введения в течение девяти дней Hcy титр аутоантител всех классов оставался столь же высоким, в то время как нагрузка Hcy-T приводила к резкому падению концентрации аутоантител до уровня контроля (рис. 7). Титр аутоантител к комплексу альбумина с Hcy-T у интактных животных был таким же, как и к комплексу альбумина и Hcy, но при этом, динамика его на фоне введения тиолов отсутствовала.

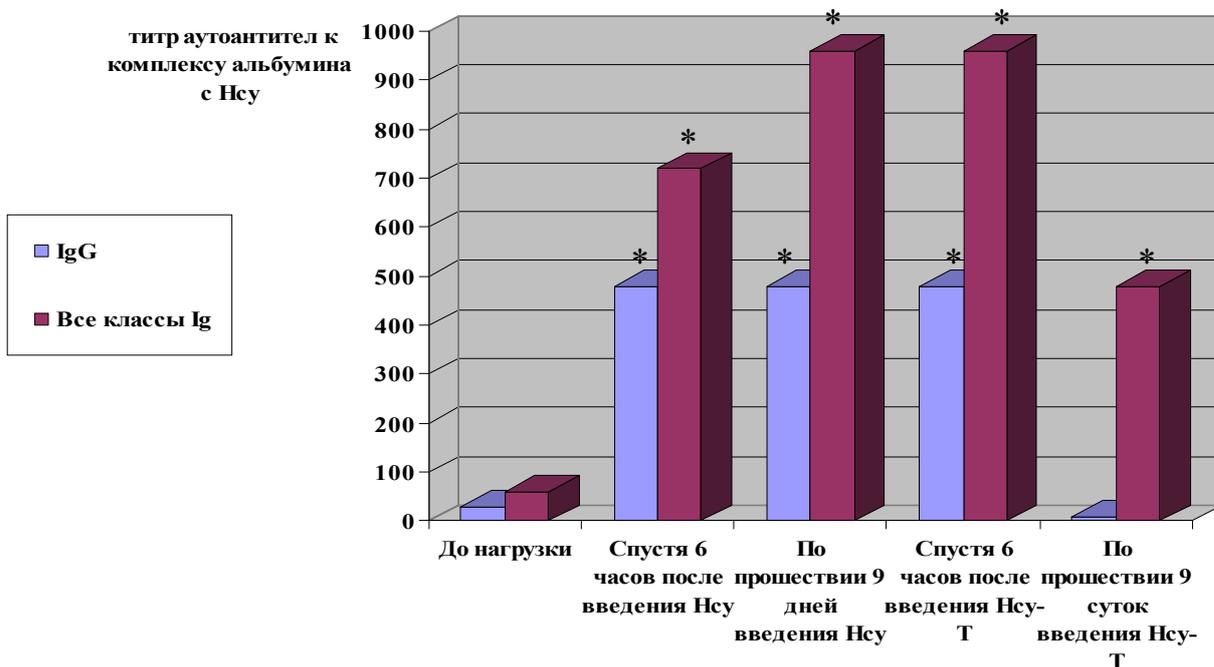


Рисунок 7. Титр аутоантител к комплексу альбумина с Hcy при экспериментальной гипергомоцистеинемии

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

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 Нсу, примерно в 2 раза и не изменилась при введении Нсу-Т (рис. 8).

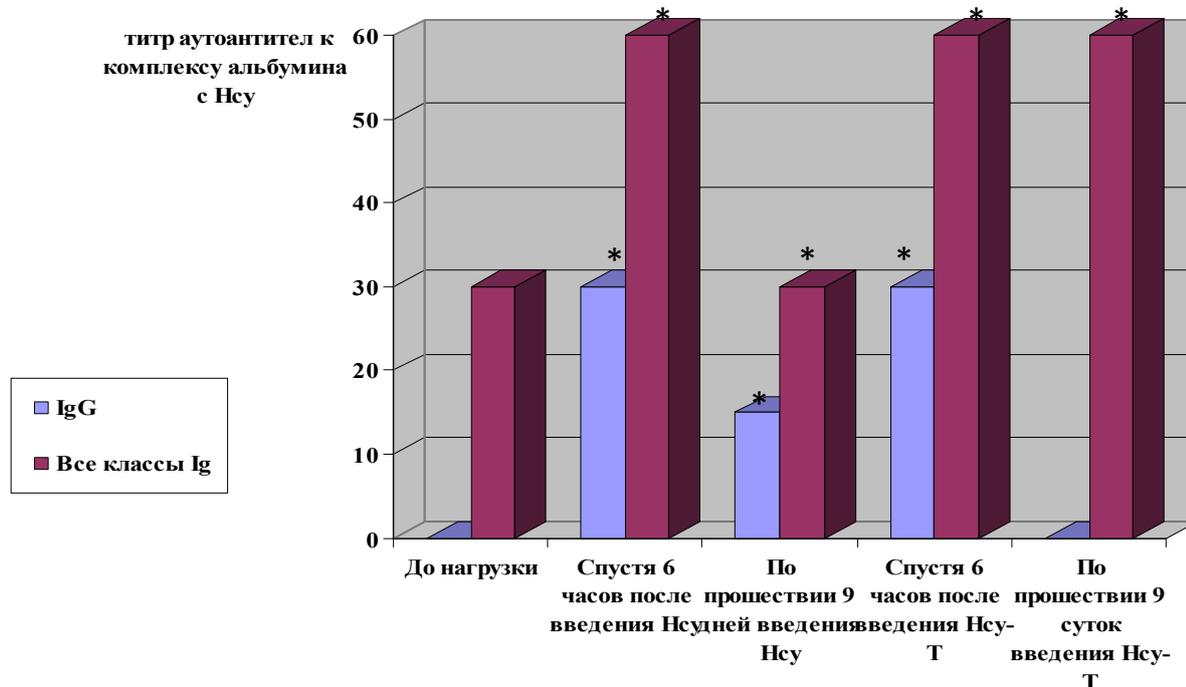


Рисунок 8. Титр аутоантител к комплексу альбумина с Нсу при экспериментальной гипергомоцистеинемии у крыс с ИДС

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

Максимальный титр аутоантител к конъюгатам альбумина с гомоцистеином у больных ИБС наблюдался при стабильной стенокардии (рис. 9).

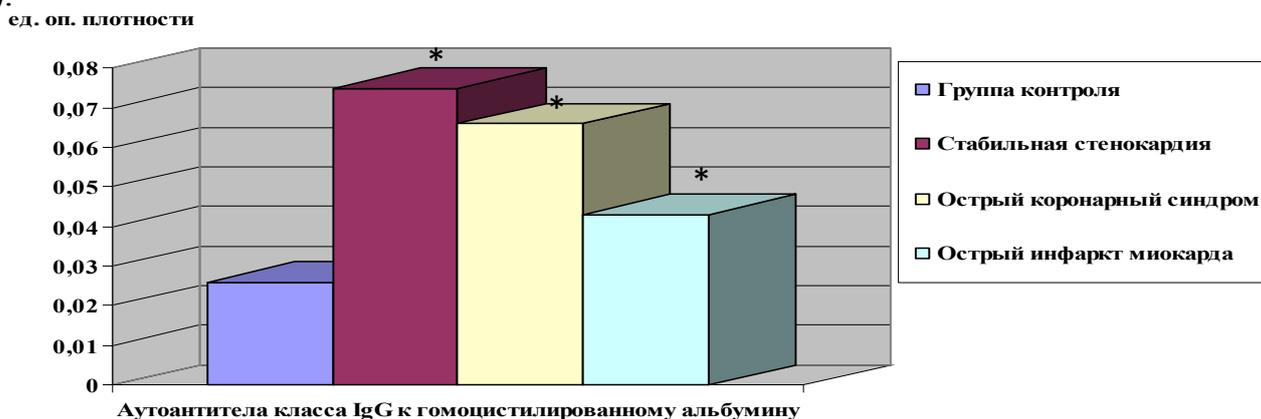


Рисунок 9. Титр аутоантител к комплексу альбумина с Hcy у больных различными формами ИБС

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

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

Влияние различных концентраций аминотиолов на клетки человека *in vitro*

Для изучения изменения фенотипа и функциональной активности лейкоцитов кровь относительно здоровых добровольцев и больных ИБС инкубировали с Hcy в конечной концентрации 50 мкмоль/л и Hcy-T в концентрации 50 нмоль/л при температуре 37⁰С в течение 4 часов, после чего определяли фенотип клеток. Контролем служили образцы крови с внесенными в них 0,9% раствором NaCl и глутаматом в концентрации 50 мкмоль/л.

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-NK.

Зарегистрировано увеличение концентраций ICAM-1 и р-селектина в образцах культуры клеток доноров и больных ИБС как под воздействием Hcy, так и Hcy-T (рис. 10).

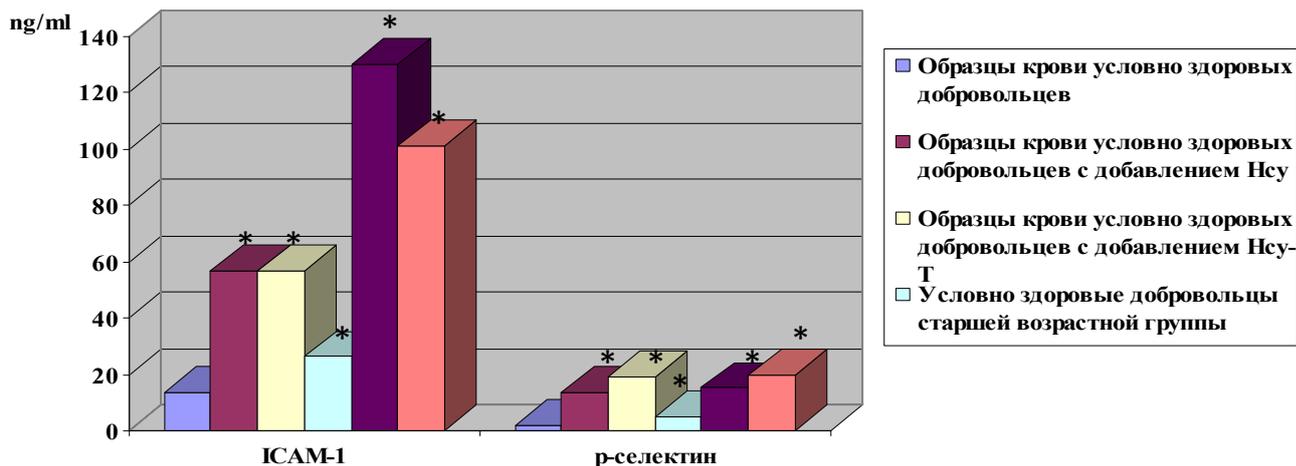


Рисунок 10. Уровень молекул адгезии в образцах культуры клеток периферической крови доноров и больных ИБС

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

Молекулы адгезии обуславливают взаимодействие между клетками. Одним из проявлений этого процесса является образование лейкоцитарно-тромбоцитарных коагратов. У больных ИБС обнаружено большее число адгезированных клеток. Введение аминотиолов вызывало однонаправленные сдвиги, как в культурах клеток здоровых доноров, так и лиц, страдающих атеросклерозом – возрастало число агрегатов, в большей степени в культурах с введением в нее гомоцистеина (рис. 11).

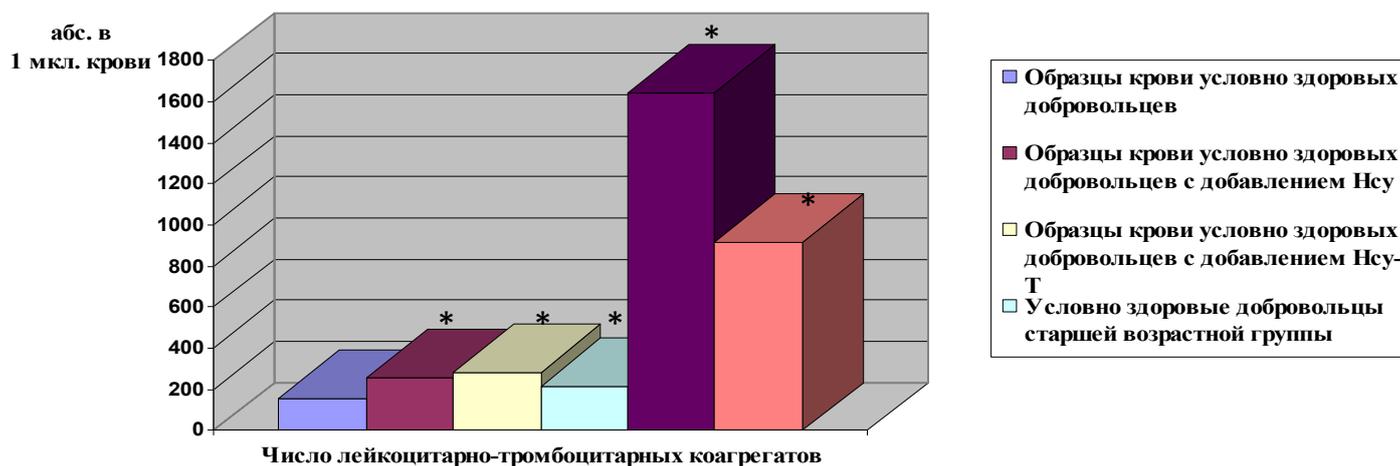


Рисунок 11. Число лейкоцитарно-тромбоцитарных коагратов в образцах культуры клеток периферической крови доноров и больных ИБС

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

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 ($p=0,0001$), введение аминотиолов вызывало рост этого показателя. Еще одним маркером функциональной активности клеток является активация апоптического процесса в клетках.

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). При этом, в общей популяции лейкоцитов периферической крови здоровых экспрессия поверхностного рецептора Fas увеличивается под влиянием аминотиолов, а у больных ИБС – снижается. Количество клеток с фосфатидилсерином на внешней мембране под воздействием Hcy возрастало в 165,3 раза ($p<0,001$), уровень Vcl-2 уменьшался на 36,76% только в белых кровяных тельцах доноров и не влиял на ингибирование процесса апоптоз у больных ИБС.

Hcy вызывал изменения функции культивируемых фибробластов: в диапазоне концентраций 12,5 – 25,0 мкмоль/л усиливалась пролиферация фибробластов, на фоне активации процессов перекисного окисления липидов, повышался синтез IL-1b и IL-4, HSP90a. Добавление Hcy в дозе 50,0 мкмоль/л вызывало гибель клеток, накопление в культуральной среде HSP70, IL-6 и резкое снижение IL-10.

Таким образом, можно с уверенностью констатировать, что экзогенная гипергомоцистеинемия оказывает дозозависимое влияние, вызывая как функциональные, так и структурные изменения в организме. Причем, повышение концентрации Hcy вызывает как прямое повреждение (например, гибели фибробластов при уровне Hcy 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.).

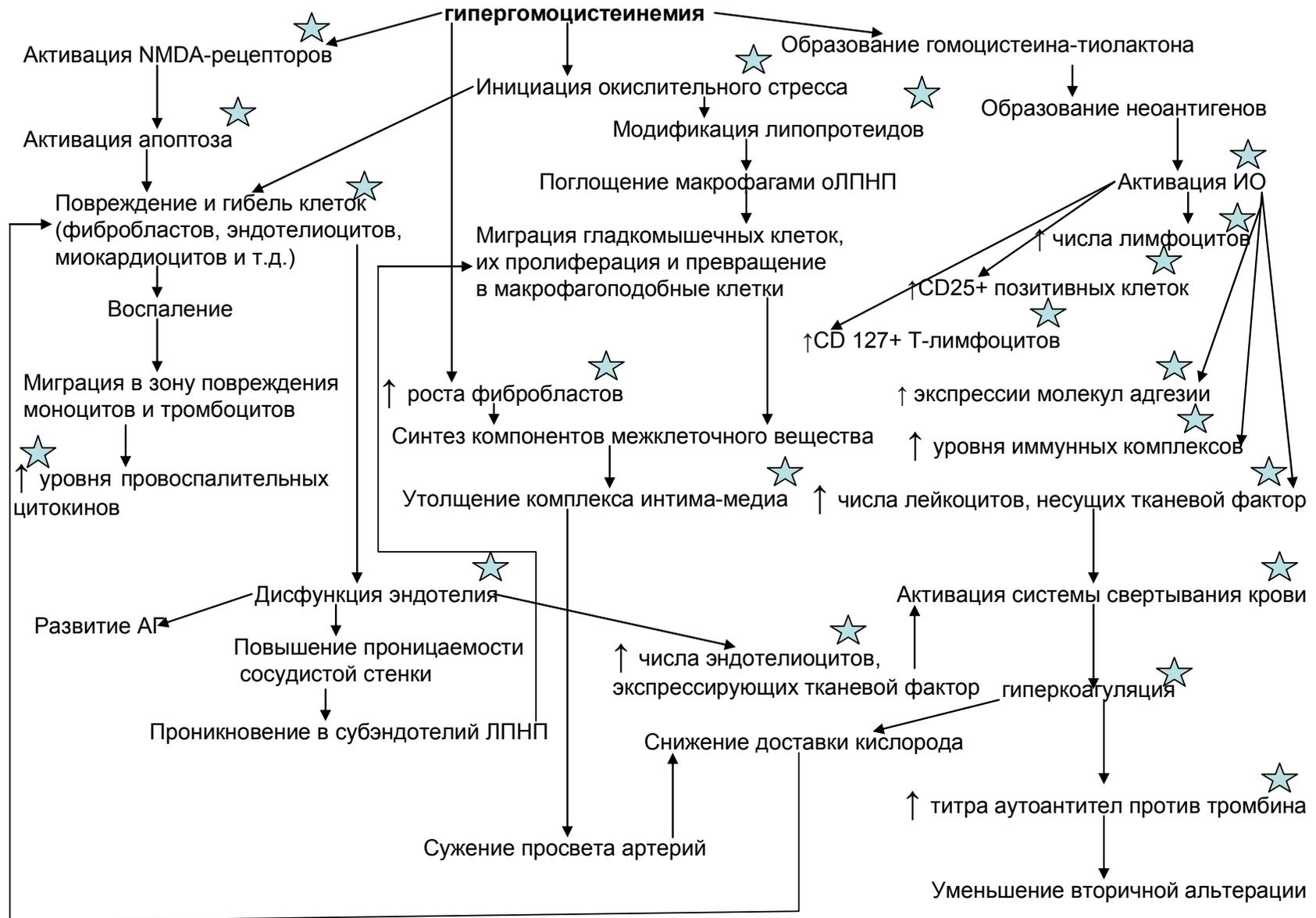
Показано, что повышение концентрации гомоцистеина в кровотоке приводит как к повреждению эндотелия сосудов, вызывая развитие его дисфункции, так и лейкоцитов. Причем, в большей степени, наблюдается реакция со стороны Т-лимфоцитов. Но, у здоровых лиц, и страдающих атеросклеротическим процессом, ответ 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 коагратов, повышенному синтезу хемокинов, факторов роста.

Таким образом, нарушение поддержания аминовиолов на постоянном уровне инициирует и ускоряет развитие атеросклеротического процесса.

Учитывая результаты, полученные нами в ходе исследования, а также данные литературы, механизм развития атеросклероза и артериальной гипертензии на фоне гипергомоцистеинемии представлен в схеме, отраженной на рисунке 12.



ВЫВОДЫ

1. Экзогенная гипергомоцистеинемия вызывает развитие дисфункции эндотелия, с увеличением числа циркулирующих эндотелиоцитов, уровня эндотелина, снижением концентрации нитратов и нитритов, формированием гиперкоагуляции, обусловленной повышенным представительством 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 аминоктиолов 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 уменьшается 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 тканевой фактор, 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, росту числа лейкоцитарно-тромбоцитарных коагратов, увеличению уровня аутоантител, цитокинов, молекул адгезии, изменению фенотипа лимфоцитов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. 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.
2. Исследование уровня аутоантител к модифицированному сывороточному альбумину и тромбину / С.В. Измestьев, Е.В. Фефелова, П.П. Терешков [и др.] // Забайкальский медицинский вестник : электронное научное издание. – 2012. – № 2. – С. 112–115. – URL: <http://zabmedvestnik.ru/>. (дата обращения: 21.07.2018).
3. 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.
4. Аутоантитела к альбумину, модифицированному гомоцистеином, в эксперименте / С.В. Измestьев, Е.В. Фефелова, П.П. Терешков [и др.] // Забайкальский медицинский вестник : электронное научное издание. – 2013. – № 1. – С. 136–140. – URL: <http://zabmedvestnik.ru/> (дата обращения: 20.08.2019).
5. 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.
6. 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.
7. 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 : электронное научное издание. – 2014. – № 4. – С. 154–158. – URL: <http://chitgma.ru/zmv2> (дата обращения: 20.08.2019).
8. 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 : электронное научное издание. – 2014. – № 2. – С. 114–118. – URL: <http://chitgma.ru/zmv2> (дата обращения: 20.08.2019).
9. 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.

10. 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.
11. Морфофенотипические изменения миокарда крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии / Е.В. Фефелова, Н.Н. Цыбиков, П.П. Терешков [и др.] // Забайкальский медицинский вестник : электронное научное издание. – 2015. – № 4. – С. 145–150. – URL: <http://chitgma.ru/zmv2> (дата обращения: 12.08.2018).
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Lymphocytes subpopulations and cytokine levels in experimental hyperhomocysteinemia / E.V. Fefelova, P.P. Tereshkov, A.A. Dutov [et al.]. – DOI <https://doi.org/10.1007/s10517-015-2962-1> // 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> (дата обращения: 20.08.2019).
16. 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.
17. Индукция апоптоза лейкоцитов под влиянием аминотиолов в краткосрочной культуре клеток / Е.В. Фефелова, П.П. Терешков, М.В. Максименя [и др.] // Забайкальский медицинский вестник : электронное научное издание. – 2016. – № 2. – С. 98–106. – URL: <http://chitgma.ru/zmv2> (дата обращения: 20.06.2017).
18. 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.
19. Ответ иммунной системы на модификацию аминотиолами белковых структур организма / Е.В. Фефелова, С.В. Измestьев, Н.Н. Цыбиков [и др.] // Забайкальский медицинский вестник : электронное научное издание. – 2017. – № 2. – С. 101–111. – URL: <http://chitgma.ru/zmv2> (дата обращения: 25.11.2017).
20. Роль гипергомоцистеинемии в механизмах развития гиперкоагуляции у больных ИБС / Е.В. Фефелова, П.П. Терешков, Н.В. Исакова [и др.] //

Забайкальский медицинский вестник : электронное научное издание. – 2019. – № 2. – С. 90–98. – URL: <http://chitgma.ru/zmv2> (дата обращения: 03.09.2017).

21. 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.

Зарубежные научные издания, входящие в международные реферативные базы данных и системы цитирования

22. Anticytokine autoantibodies in chronic rhinosinusitis / N.N. Tsybikov, E.V. Egorova, V.I. Kuznik [et al.]. – DOI 10.2500/aap.2015.36.3880 // Allergy and Asthma Proceedings. – 2015. – Vol. 36 (6). – P. 473–80. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26534753/> (дата обращения: 20.08.2019).

23. Biomarker assessment in chronic rhinitis and chronic rhinosinusitis: endothelin-1, TARC/CCL17, neopterin, and α -defensin / N.N. Tsybikov, E.V. Egorova, V.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).

Прочие:

24. 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.

25. 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.

26. Экспрессия тканевого фактора моноцитами периферической крови под влиянием гомоцистеина и гомоцистеина-тиолактона / Е.В. Фефелова, П.П. Терешков, М.В. Максименя [и др.] // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2016. – № 3 (67). – С. 432–433.

27. Фефелова Е.В. Влияние гипергомоцистеинемии на адгезивные свойства лейкоцитов // Развитие традиционной медицины в России: опыт, научные исследования, перспективы : материалы научно-практической конференции с международным участием, г. Улан-Удэ, 20-21 августа 2010 г. – Улан-Удэ : Изд-во ГУЗ ЗЦМП МЗ РБ, 2010. – С. 392–396.

28. Фефелова Е.В. Адгезивные свойства лейкоцитов при гипергомоцистеинемии / Е.В. Фефелова, Н.Н. Цыбиков // Вопросы патогенеза типовых патологических процессов : труды III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, г. Новосибирск, 2011 г. – Новосибирск : НГМУ, 2011. – С. 266–268.

29. Com-parative analysis of the level of homocysteine, oxidized low density lipoproteins and antibodies to them in healthy patients and the patients with cardiovascular pathology / E.V. Fefelova, M.V. Maximenya, P.P. Tereshkov [et al.] //

Immunophysiology: autoimmunity in health and disease. Contribution to predictive and preventive medicine : proceedings of the 3rd international scientific and practical conference, Moscow, October 1-3 2012 / editors A.B. Poletaev, S.V. Skurydin. – Moscow, 2012. – С. 110–111.

30. A content analysis of the markers of coronary heart disease in normal and pathological states / E.V. Fefelova, M.V. Maximenya, P.P. Tereshkov [et al.] // Supplement to Mongolian Journal of Health Sciences. – 2012. – Vol. 9, Issue 1. – P. 8–9.

31. Changes of hemeostasis in nicotine-dependent subjects / Ulziisaikhan Surenjav, Ariunsanaa Byambaa, Tsogtsaikhan Sandag [et al.] // Mongolian Journal of Health Sciences. – 2013. – Volume 10, Issue 1, Ulaanbaatar. – P. 21-25.

32. Уровень циркулирующих иммунных комплексов у больных гипертонической болезнью / С.В. Измestьев, Е.В. Фeфелова, Н.Н. Цыбиков [и др.] // Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины : материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 60-летию ЧГМА, г. Чита, 17-18 октября 2013 г. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2013. – С. 50–51.

33. Морфологические изменения миокарда на фоне действия гомоцистеина / Е.В. Фeфелова, С.В. Измestьев, А.В. Сeпп [и др.] // Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины : материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 60-летию ЧГМА, г. Чита, 17-18 октября 2013 г. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2013. – С. 189–190.

34. Содержание глутатиона в эритроцитах и его форм при экспериментальной гипергомоцистеинемии / Е.В. Фeфелова, П.П. Терешков, А.А. Дутов [и др.] // Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины : материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 60-летию ЧГМА, г. Чита, 17-18 октября 2013 г. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2013. – С. 171–174.

35. Исследование уровня аутоантител к модифицированному сывороточному альбумину и тромбину у пациентов с сердечно-сосудистой патологией / С.В. Измestьев, Е.В. Фeфелова, П.П. Терешков [и др.] // I съезд терапевтов Забайкальского края, г. Чита, 14-15 марта 2013 г. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2013. – С. 127–128.

36. Некоторые иммунологические показатели у больных гипертонической болезнью / Е.В. Фeфелова, С.В. Измestьев, П.П. Терешков [и др.] // II съезд терапевтов Забайкальского края : материалы съезда, г. Чита, 13-14 марта 2014 г. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2014. – С. 122–123.

37. Оценка экспрессии тканевого фактора на фоне введения гомоцистеина в эксперименте / С.В. Измestьев, Е.В. Фeфелова, А.В. Сeпп [и др.] // Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии (с международным участием) : седьмая Всероссийская конференция : материалы конференции, г. Москва, 29-31 января 2015 г. – Москва : НЦССХ им. А.Н. Бакулева, 2015. – С. 185.

38. Фефелова Е.В. Сдвиги в системе гемостаза у никотинзависимых лиц / Е.В. Фефелова, П.П. Терешков, Н.Н. Цыбиков // Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии (с международным участием) : седьмая Всероссийская конференция : материалы конференции, г. Москва, 29-31 января 2015 г. – Москва : НЦССХ им. А.Н. Бакулева, 2015. – С. 436–437.
39. Уровень гомоцистеина, глутатиона и церулоплазмينا у больных ишемической болезнью сердца / С.В. Измestьев, Е.В. Фефелова, П.П. Терешков [и др.] // III съезд терапевтов Забайкальского края : сборник научных трудов, г. Чита, 12-13 марта 2015 г. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2015. – С. 106–107.
40. Особенности иммунного ответа у никотинзависимых лиц в зависимости от стажа курения / Е.В. Фефелова, П.П. Терешков, Н.Н. Цыбиков [и др.] // III съезд терапевтов Забайкальского края : сборник научных трудов, г. Чита, 12-13 марта 2015 г. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2015. – С. 135–136.
41. Индукция апоптоза лимфоцитов под влиянием гомоцистеина в культуре клеток периферической крови больных ИБС / Е.В. Фефелова, П.П. Терешков, М.В. Максименя [и др.] // Электронный научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI веке». – 2016. – № 11. – С. 36–39. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=27698644> (дата обращения: 20.08.2019).
42. Экспрессия молекул адгезии и образование коагратов тромбоцитами и лейкоцитами периферической крови у больных хронической формой ИБС / Е.В. Фефелова, П.П. Терешков, Н.Н. Цыбиков [и др.] // V съезд терапевтов Забайкальского края : сборник научных трудов, г. Чита, 14-15 марта 2017 г. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2017. – С. 77–79.
43. The role of hyperhomocysteinemia in the development of hypercoagulation in patients with arterial hypertension / Е.В. Фефелова, Н.Н. Цыбиков, П.П. Терешков [и др.] // The Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis 2018 jointly with the 9th Russian Conference on Clinical Hemostasiology and Hemorheology : the Book Of Abstracts, Saint Petersburg, 4-6 октября 2018 г. – Санкт-Петербург, 2018. – С. 74–75.
44. Fefelova E.V. Some ways of hypercoagulation development in ischemic heart disease patients / E.V. Fefelova, P.P. Tereshkov, N.N. Tsybikov // Scientific research of the SCO countries: synergy and integration : materials of the International Conference, March 12 2019, Beijing, PRC. – China ; Beijing, 2019. – P. 87–95.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД	- артериальное давление
аАТ	- аутоантитела
АЧТВ	- активированное частичное тромбопластиновое время
ГБ	- гипертоническая болезнь
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
SEC (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