

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЙ ЦЕРЕБРО-ВАСКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИИ

Трещинская М.А., Головченко Ю.И., Игрунова К.Н., Ватлицов Д.В.

Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика
Киев, Украина

Резюме. Церебро-васкулярная патология является одной из основных причин смертности и основной причиной инвалидизации населения как на всей территории бывшего Советского Союза так и во всем мире. Особенно актуальным является поиск новых мишеней для патогенетического лечения начальных стадий церебро-васкулярной недостаточности. Влияние на функцию эндотелия является перспективным с точки зрения предотвращения и замедления прогрессирования сосудистого поражения на самых ранних стадиях процесса. Регуляция процесса апоптоза может иметь положительное влияние на процессы адаптации к действию сосудистых факторов риска.

Ключевые слова: начальные стадии церебро-васкулярной недостаточности, сосудодвигательная функция эндотелия, апоптоз.

PATHOGENETIC APPROACH TO THE TREATMENT OF EARLY STAGES OF CEREBROVASCULAR PATHOLOGY

Treshchynska M., Golovchenko J., Igrunova K., Vatlitsov D.

National Medical Academy of Postgraduate education named after P.I.Shupyk
Kyiv, Ukraine

Resume. Cerebrovascular pathology is one of the major causes of death rate and the leading cause of disability of population in the whole world. Search of new targets for nosotropic treatment of the initial stages of cerebrovascular insufficiency is especially actual. Regulation of apoptosis can have a positive influence on the processes of adaptation to the effects of vascular risk factors. Influence on the function of endothelia is perspective from the point of view of prevention and deceleration of progress of vascular defeat on the earliest stages of process.

The aim of our research was clinical accounts score influence of L-arginine (Tivortin) on the vasomotor endothelium function and apoptosis in patients with early stages of cerebrovascular diseases.

Keywords: initial stages of cerebrovascular insufficiency, vasomotor function of the endothelium, apoptosis.

В последние десятилетия отмечается четкая тенденция к увеличению продолжительности жизни, что неизбежно повышает долю лиц зрелого, пожилого и старческого возраста. В связи с этим увеличивается актуальность профилактических мероприятий с целью длительного сохранения качества жизни и трудоспособности. В то же время сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются доминирующей причиной инвалидности и смерти населения в большинстве стран мира, в том числе и на территории бывшего Советского союза: на Украине, в Киргизии, России и т.д.

В последнее время все больше внимания уделяется целостности и функционированию эндотелия сосудов, как основе сердечнососудистого здоровья. Эндотелиальная функция находится под влиянием сосудистых факторов риска и отражает степень их повреждающего влияния [19,40]. До тех пор, пока физиологическая функция эндотелия остается интактной и срабатывают компенсаторные механизмы, влияние факторов

риска не приводит к развитию сосудистого повреждения. Нарушение физиологической функции сосудистого эндотелия является ранним признаком и независимым предиктором неблагоприятного прогноза при большинстве форм ССЗ [9, 32, 38].

Известные факторы риска ССЗ индуцируют развитие эндотелиальной дисфункции (ЭД), которая является предстадией морфологических изменений при атеросклеротическом процессе (АС) [15]. Выявлено, что ЭД присутствует у пациентов с традиционными факторами риска АС, а именно с гиперхолестеринемией, артериальной гипертензией (АГ), сахарным диабетом (СД) и курящих до того, как процесс проявит себя клинически [33]. Следует отметить, что ЭД очевидна у пациентов с АС различной локализации (ССЗ), а так же с септическим шоком, застойной сердечной недостаточностью, легочной гипертензией и преэклампсией [42].

Доступные данные показывают, что ЭД широко распространена, если не повсеместно, у пожилых людей и развивается по мере старения

даже при отсутствии других факторов риска или сосудистых заболеваний [17, 45]. Другими словами, ЭД может рассматриваться как первое проявление старения у здоровых людей. Полагают, что такая первичная чувствительность сосудистой стенки является «виновницей» повышения риска ССЗ по мере старения [23]. С ЭД ассоциируется возраст-обусловленное снижение когнитивных функций (нарушение памяти) и физической активности (снижение активности в течение дня) [22, 41]. Кроме того, ЭД берет участие в патогенезе многих заболеваний, таких как АГ, инсульт, эректильная дисфункция и почечная недостаточность, которые так же ассоциируются с процессом старения [8].

Нарушение функции эндотелия является прогностическим фактором ССЗ, а фармакологическая коррекция персестирующей ЭД может снизить риск или замедлить развитие сосудистых заболеваний [8,14]. Вмешательства, которые благоприятно влияют на эндотелиальную функцию, улучшают клинические исходы [36]. Пациенты с нарушенной эндотелиальной функцией по данным ряда исследований, имеют относительный больший риск ССЗ, в связи с чем, можно предположить, что ЭД является предиктором необходимости более агрессивной или комбинированной медикаментозной терапии для снижения риска ССЗ [18, 33]. Наблюдение за эндотелиальной функцией в динамике в ответ на различные подходы в лечении, может помочь титровать препараты и принимать решение о необходимости дополнительной терапии [23].

Эндотелий сосудов представляет собой слой клеток на базальной мембране, которые обладают аутокринной, паракринной и эндокринной функцией [10, 23]. Эндотелий обеспечивает delicate баланс контррегулирующих путей, которые обеспечивают вазомоторные реакции, контролируют пролиферацию клеток, тромбообразование, воспаление и оксидативный стресс. Так же эндотелиальные клетки вовлечены в процесс модулирования активности лейкоцитов и тромбоцитов, ингибируют адгезию лейкоцитов и диапедез, поддерживают непроницаемость сосудистого барьера для клеток крови и плазменных белков [3, 12].

Оксид азот (NO), ранее известный как эндотелиальный фактор релаксации, вероятно наиболее важная субстанция, продуцируемая сосудистым эндотелием для

регуляции сосудистого тонуса [21, 31]. NO образуется в эндотелии путем преобразованием незаменимой аминокислоты L-аргинина в L-цитрулин при участии конституционального фермента эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). Эндотелиальная NOS локализуется в эндотелиальных клетках и отвечает за синтез базального уровня NO, за быстрые изменения уровня NO в ответ на физические (напряжение сдвига) и химические стимулы (брадикинин) [26]. Только L-аргинин является субстратом eNOS для синтеза NO, но не только для NO-синтазы L-аргинин является субстратом [29, 30]. L-аргинин используется для синтеза белков, мочевины, креатина, вазопрессина и агматина [43]. Таким образом, активация метаболизма L-аргинина альтернативными путями может быть одним из механизмов недостаточного синтеза NO, а следовательно и ЭД. Самым активным ферментом альтернативного пути метаболизма L-аргинина является аргиназа. L-аргинин не метаболизирующийся с помощью аргиназы до орнитина, используется одним из 4 ферментов: NOS (до образования NO), аргинил—tRNA-синтетазой (до образования arginyl-tRNA, предшественника в синтезе белков), аргининдекарбоксилазой (до агматина), аргинин:глицин аминотрансферазой (до креатина).

Есть данные, что окисленные ЛПНП повышают активность аргиназы и соответственно снижается продукция NO в эндотелиальных клетках аорты человека [4].

Так же активность NOS ингибируется аналогами L-аргинина, в которых замещен атом азота, например *NG*-monomethyl-L-arginine или *NG*-nitro-L-arginine [35]. Интересно, что блокирующее влияние этих молекул на NOS может быть преодолено избытком L-аргинина, что указывает на наличие конкуренции за фермент между L-аргином и его аналогами. Снижение активности eNOS доказано и при повышении концентрации в плазме крови ЛПНП; что так же можно преодолеть путем дополнительного введения L-аргинина [34, 35]. Эти данные указывает на то, что L-аргинин участвует в регуляции активности NOS в эндотелиальных клетках.

Путь L-аргинин-NO играет критическую роль в поддержании нормальной эндотелиальной функции, что отражается на оптимальном функционировании миокарда [29], АД [39],

сбалансированности воспалительного ответа [27], апоптозе [7] и защите от оксидативного повреждения [34]. Ряд экспериментальных и клинических исследований показали, что введение субстрата для синтеза NO, L-аргинина, уменьшает проявления ЭД.

L-аргинин может потенцировать синтез NO и уменьшать проявления ЭД за счет восстановления активности eNOS [26]. L-аргинин препятствует окислению BH_4 – основного кофактора NOS. Так же, L-аргинин помогает преодолеть блокаду экспрессии eNOS, вызываемую эндогенными ингибиторами eNOS (асимметричный диметиларгинин-ADMA и L-NMMA), а так же повышенную активность аргиназы при АС [37]. L-аргинин восполняет увеличенный расход АК, обусловленный повышенной экспрессией iNOS в клетках иммунной системы и сосудов при АС [16].

Кроме того, L-аргинин повышает биоактивность NO посредством прямой антиоксидантной активности, in vivo применение L-аргинина снижает уровень NOS-опосредованного супероксида [5, 20]. L-аргинин, поступающий в виде соли гидрохлорной кислоты может влиять на внутриклеточный pH, что улучшает транспорт Ca и активацию eNOS, способствует неферментному превращению нитрита в NO [46]. Есть данные, что L-аргинин уменьшает концентрацию эндотелина-1, потенциального вазоконстриктора и важного модулятора ЭД (даже может более важно, чем NO) по мере старения [24].

L-аргинин показал многообещающие результаты как средство профилактики ЭД при остром стрессе. К примеру, курение и употребление жирной пищи являются достоверными причинами ухудшения эндотелиальной функции. Оральное применение L-аргинина перед курением или употреблением жирной пищи предупреждает вредное воздействие этих факторов на эндотелиальную функцию [25, 26].

Доза-зависимая клиническая эффективность L-аргинина по данным исследований на людях заключается в том, что в небольших концентрациях в плазме от 80 до 800 $\mu\text{моль/л}$ L-аргинин обладает селективным влиянием на эндотелиальную функцию (у пациентов с повышенным содержанием ADMA). В более высокой концентрации (в плазме 800-8000 $\mu\text{моль/л}$) препарат оказывает прямое

вазодилатирующее действие (вероятно благодаря плеотропному эндокринному влиянию на синтез инсулина и гормона роста). В больших концентрациях (в плазме больше 8000 $\mu\text{моль/л}$) как L-аргинин, так и D-аргинин оказывают неспецифическое вазодилатирующее влияние, за счет осмотического эффекта, ацидоза и влияния на эндокринную систему [44].

Эффект L-аргинина на ЭД не является универсальным феноменом. Действие препарата зависит от изучаемого участка артерии, наличия или отсутствия ЭД, морфологических изменений, наличия клинических проявлений ССЗ и достигаемой концентрации L-аргинина. Вероятно, такая стратегия могла бы быть наиболее эффективной на доклиническом этапе у пациентов с сосудистыми факторами риска (АГ, СД, курящих, особенно в сочетании с гиперхолестеринемией) [11].

Мета-регрессивный анализ результатов исследований показал, что гетерогенность влияния L-аргинина на ЭД (судя по показателю потоко-зависимой вазодилатации a.brachialis (ПЗВ)) определяется базисным показателем ПЗВ, то есть наличием дисфункции эндотелия. Анализ по подгруппам выявил, что эффект от приема L-аргинина был положительным, когда ПЗВ была ниже, и отрицательным, когда ПЗВ была выше базисной линии. Эти данные показывают, что вышеупомянутое вмешательство способно восстановить эндотелиальную функцию, но не могут ее увеличивать. Статистическая обработка результатов выявила обратную зависимость между ПЗВ и степенью эффективности L-аргинина [6].

Взаимосвязь между сосудистыми факторами риска, ЭД, АС и его осложнениями в виде ССЗ, является основой для формирования стратегии терапии при поражении сосудов. Традиционное направление включает влияние на основные факторы риска, а именно контроль АД, гликемии, коррекцию дислипидемии, отказа от курения, ограничение употребления алкоголя, снижение избыточной массы тела. В то же время, перспективным является направление, основанное на восстановлении баланса между продукцией и катаболизмом оксида азота - терапия L-аргинином может оказывать дополнительную защиту сосудов от повреждающих факторов риска.

С другой стороны, практически всегда повреждение эндотелия сопровождается процессом

перекисного окисления липидов, что усугубляет дефицит эндогенного NO за счет его ускоренной деградации активными формами кислорода. Кроме того, взаимодействие NO с супероксидом (и другими кислородными радикалами) приводит не только к утрате вазодилатирующего потенциала NO, но и к образованию высокотоксичного пероксинитрита (ONOO⁻) [1]. Известно, что при высоких концентрациях пероксинитрит индуцирует апоптоз, а так же блокирует синтез простаглицлина, усиливая при этом продукцию тромбосана и лейкотриенов. [1]. Другими словами, ЭД и активация процесса апоптоза могут являться ключевыми звеньями сосудистого повреждения.

Апоптоз играет важную роль в реализации механизмов адаптации организма к воздействию внешней среды. Это генетически регулируемый процесс, участвующий в дифференцировке, морфогенезе, а так же в поддержании клеточного гомеостаза [2].

В наиболее общей форме назначение апоптоза (в сочетании с его альтернативой — пролиферацией) состоит в определении размеров и “архитектуры” организма:

- поддержание численности клеток в популяции на заданном уровне;
- определение этого уровня и его изменение под влиянием внешних (по отношению к клетке) сигналов вплоть до полной элиминации данного типа клеток;
- в обеспечении правильного соотношения численности клеток различных типов;
- селекция разновидностей клеток внутри популяции (в том числе элиминация клеток с генетическими дефектами).

На основании знаний о роли апоптоза в поддержании гомеостаза в организме можно предположить, что недостаточная активность апоптоза может отразиться на процессах морфогенеза, элиминации клеток с генетическими поломками, становлении аутолерантности и проявляться в форме разного рода дефектов развития, аутоиммунных процессах и злокачественных опухолях. С другой стороны заболеваний, основой которых является усиление апоптоза клеток организма, не меньше. Наиболее выраженные формы такого рода нарушений, при которых в процесс апоптоза тотально вовлекаются клетки любых типов, обычно несовместимы с развитием плода и приводят к внутриутробной гибели. Наиболее

распространенными вариантами патологии такого рода в сформированном организме являются разного рода аплазии и дегенеративные процессы. Наиболее разнообразные их формы описаны в области патологии системы крови. Другим примером болезней, связанных с усилением апоптоза, являются заболевания нервной системы, вызываемые атрофией определенных ее участков. Как правило, эта атрофия является следствием индукции апоптоза. К таким заболеваниям относятся боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера, спинальная мышечная атрофия и другие заболевания нервной системы [2].

Существует ряд других состояний, при которых в реализации основного поражения решающая роль принадлежит апоптозу. Их примером может служить инфаркт миокарда (апоптоз является преобладающей формой гибели миоцитов в ранний период развития инфаркта) инсульт, токсический (в частности, алкогольный) гепатит и т. д.

Увеличивается доля патологических процессов, в основе которых лежит усиление апоптоза, которое вызвано действием внешних апоптогенных факторов. На первом месте среди них находится ионизирующая радиация. Аналогичный эффект дают многие химиотерапевтические препараты, используемые при лечении опухолей, а также гормоны, прежде всего глюкокортикоиды, широко применяемые при лечении различных заболеваний. Источником апоптогенных факторов служит внешняя среда. Нормальное окружение человека практически не является источником апоптогенных воздействий, однако при формировании экологического неблагополучия во внешней среде накапливаются факторы, моделирующие или вызывающие активацию апоптоза [2].

Таким образом, сбалансированная коррекция процессов апоптоза, наряду с защитой сосудистого эндотелия могут оказаться наиболее патогенетически обоснованным подходом на ранних этапах патологических процессов, чаще всего связанных с возрастом, наиболее ярким примером которых является хроническая сосудисто-мозговая недостаточность.

Поскольку сердечно-сосудистая, и в частности церебро-вазкулярная патология значительно снижают качество жизни людей с возрастом, на наш взгляд профилактика состояний развивающихся на фоне

эндотелиальной дисфункции является одним из наиболее перспективных направлений современной медицины. Кроме того, нам показалось уместным изучить какое влияние на процесс апоптоза оказывает препарат, благоприятно влияющий на эндотелиальную функцию (по данным литературы и наших собственных исследований).

Таким образом, целью нашего исследования явилась клиничко-экспериментальная оценка влияния препарата L-аргинина (Тивортина) на сосудодвигательную функцию эндотелия и процесс апоптоза у пациентов с цереброваскулярной патологией на ранних стадиях развития процесса.

Материал и методы.

В исследование было включено 20 пациентов с начальными проявлениями хронической сосудисто-мозговой недостаточности (начальными проявлениями недостаточности мозгового кровообращения (НПНМК) и дисциркуляторной энцефалопатией 1-й стадии (ДЭП 1) согласно классификации Е.В. Шмидта) в возрасте от 40 до 63 лет (средний возраст $53,8 \pm 6,2$ года). Среди обследованных пациентов было 11 женщин и 9 мужчин. АГ 1-2 ст. была диагностирована у 18 (90%) обследованных пациентов.

Диагноз «начальные проявления недостаточности кровоснабжения головного мозга» устанавливается при наличии у больного факторов риска сосудистого заболевания и не менее двух из следующих жалоб: головная боль, головокружение, шум в голове, нарушение памяти, снижение работоспособности, нарушение сна, которые отмечаются пациентом не менее одного раза в неделю на протяжении трех последних месяцев, при отсутствии признаков органического дефицита, а также отсутствии в анамнезе черепно-мозговой травмы, преходящего нарушения мозгового кровообращения, инфекционных заболеваний головного мозга. В исследование не включали лиц, перенесших нарушения мозгового кровообращения, инфаркт миокарда, а также тяжелые соматические заболевания. Всем пациентам проводилась ядерная магнитно-резонансная томография головного мозга с целью исключения значимого повреждения головного мозга и, таким образом, подтверждения диагноза НПНМК и ДЭП 1 стадии.

Всем пациентам проводились обще-

клиническое и клиничко-неврологическое обследования, на основании которых пациенты были рандомизированы для исследования; клиничко-лабораторные обследования позволяли исключить тяжелую соматическую патологию и помогли выявить сосудистые факторы риска (гипергликемия, дислипидемия и т. д.). Клиничко-инструментальные методы обследования помимо МРТ включали дуплексное сканирование экстра- и интракраниальных сосудов головного мозга, с помощью которого диагностировались гемодинамически значимые стенозы и деформации сосудов головы и шеи, а так же выявлялись пациенты с атеросклеротическим поражением сосудов головы.

Функциональное состояние эндотелия оценивали по величине прироста диаметра, или поток-зависимой вазодилатации (ЭЗВД), плечевой артерии с помощью теста реактивной гиперемии (Celermajer D.S. et al., 2002). Плечевую артерию визуализировали с помощью ультразвукового сканера Simens G-50 (Medical Inc., США, 2002г) линейным датчиком с частотой 7 МГц. С помощью компрессионной манжеты блокировали кровоток в плечевой артерии на 5 минут, а затем вызывали быструю декомпрессию. В режиме двухмерного ультразвукового сканирования датчиком высокого разрешения определяли изменение диаметра плечевой артерии в ответ на увеличивающийся поток крови, что сопровождается повышением напряжения сдвига, активацией эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и выделением оксида азота (NO). Принято считать нормальной реакцией плечевой артерии в пробе с реактивной гиперемией ее дилатацию более чем на 10% от исходного диаметра. Сосудистая реакция рассматривается как патологическая в случаях, когда прирост диаметра составляет менее 10% от исходного уровня либо когда наблюдается вазоконстрикция.

У пациентов до и после курса лечения L-аргинином (4г в сутки) был произведен забор крови с целью изучения уровня нитрита и эндотелина -1, как показателей сосудодвигательной активности эндотелия. Концентрацию эндотелина-1 определялась методом иммуноферментного анализа с помощью реактива «DRG Endotelin-1 ELISA» (США). Уровень нитрита (NO_2^-) определяли флуориметрическим методом с помощью реактива «Sigma-Aldrich» (США).

Всем пациентам до проводимого

лечения производился забор крови натощак с целью исследования показателей апоптоза без изменений и на фоне добавления *in vitro* L-аргинина (препарат Тивортин производства компании Юрия-Фарм) в расчетной дозе аналогичной суточной 4 г и 8 г L-аргинина в сутки. Материалом для исследования служили мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови которые выделяли на градиенте плотности фикол-урографин ($d=1,077$) в асептических условиях. В дальнейшем выделенные МНК помещали в инкубационную среду RPMI-1640 (Sigma, США) с добавлением 10% ЭТС (Sigma, США). Суспензию клеток делили на 6 равных порций в пробирки для инкубации, после чего добавляли в помеченные пробирки препарат в расчетных концентрациях. После чего в определенные пробирки добавляли индуктор (в качестве индуктора апоптоза использовались глюкокортикостероид дексаметазон) в апоптоз индуцирующей концентрации. Инкубацию проводили 18 ч при $t=37^{\circ}\text{C}$. После инкубации клетки отмывали и изучали уровень апоптоза с использованием набора Annexin V-FITC Apoptosis detection Kit I (BD Bioscience Pharmingen, США) и изменение митохондриального мембранного потенциала с использованием Родамин 123 и Пропидий йодид (Sigma, США) в каждой пробе. Исследования проводили на проточном цитометре PAS (Partec, Германия).

В дальнейшем рассчитывался индекс индукции апоптоза (ИИА), который отражает не просто количество клеток, имеющих морфологические признаки апоптоза при микроскопическом исследовании ткани как индекс апоптоза, а функциональный резерв клеток т.е. степень стойкости к повреждающим агентам как экзо- так и эндогенных. Данный показатель позволяет оценить исходное состояние клеток иммунной системы приближая лабораторные данные к клинической оценки состояния организма. Важным моментом явилась оценка ИИА на фоне L-аргинина в дозе аналогичной внутривенному введению 4 г и 8 г Тивортина в сутки.

Все пациенты в ходе лечения, которое включало терапию, направленную на коррекцию факторов риска, прежде всего артериальной гипертензии и дислипидемии при необходимости, получали курс Тивортина в течение 10 дней в дозе 100 мл (4 г L-аргинина) внутривенно капельно.

Для статистического анализа данных применялась программа Statistica 6.0. Статистически значимая разница между показателями принималась при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение.

Все пациенты до лечения предъявляли ряд жалоб: на головную боль ($n=16$ (80%)), чаще всего «тупого» характера, без четкой локализации, не связанной с повышением артериального давления, возникающую при переутомлении, перемене погоды; головокружение ($n=9$ (45%)), как правило, несистемного характера, усиливающееся при перемене положения тела; шум в голове диффузного характера ($n=11$ (55%)), постоянный или преходящий; а так же нарушение памяти ($n=18$ (90%)) связанное, прежде всего, с повышенной отвлекаемостью, трудностью фокусировки внимания, что приводило к снижению памяти на текущие события, нарушению механической памяти, логическая память оставалась интактной; нарушения сна ($n=6$ (30%)) у обследованных пациентов чаще всего были связаны с повышенной лабильностью и встречалось преимущественно у мужчин ($n=4$ (20%)).

После курса лечения большинство пациентов отметили повышение работоспособности (17 человек из 20 до лечения (85%)), снизилась интенсивность и частота жалоб. Встречаемость жалоб после курса L-аргинина изменилась следующим образом: головная боль наблюдалась у 12 пациентов, (60%); головокружение у 4 больных (20%); шум в голове диффузного характера наблюдался у 17 обследованных (85%); нарушение памяти или точнее рассеянность была выявлена у 7 пациентов (35%); нарушения сна – у 3 (15%) обследованных. Статистически значимое улучшение состояние наблюдалось у пациентов, испытывающих шум в голове и нарушение концентрации внимания. Следует отметить, что препарат переносился хорошо, побочные явления при внутривенном введении отмечены не были.

Данные оценки эндотелиальной функции представлены в табл. 2, где показано, что до лечения (оценка потоко-зависимой вазодилатации проводилась до и после курса лечения L-аргином) ЭД наблюдалась у 18 пациентов (90%), в то время как после лечения признаки ЭД выявлялись лишь у 3 больных (15%).

Таблица 1. Динамика жалоб после курса лечения.

Жалоба	До лечения	После лечения
Головная боль	80% (n=16)	60% (n=12)
Головокружение	45% (n=9)	20% (n=4)
Шум в голове	85% (n=17)	55% (n=11)*
Нарушение концентрации внимания	90% (n=18)	35% (n=7)*
Нарушение сна	30% (n=6)	15% (n=3)

* - ($p < 0.05$) статистически значимое отличие по указанному показателю в динамике.

Таблица 2. Показатели потоко-зависимой вазодилатации в динамике.

Показатель	До лечения (n=20)	После лечения (n=20)
ЭЗВД < 10%	18 (90%)	3 (15%)*
Исходный диаметр плечевой артерии, мм	4,02±0,31	4,15±0,26
Диаметр на 1-й сек., мм	4,46±0,38	4,76±0,27
Диаметр на 60-й сек., мм	4,83±0,35	5,21±0,37*
ЭЗВД на 1 сек, %	9,79±7,25	11,94±3,98
ЭЗВД на 60 сек, %	10,15±7,80	20,10±9,64*
Время восстановления, мин.	4,69±0,62	4,10±0,97*

* - ($p < 0.05$) статистически значимое отличие по указанному в шапке колонки показателю между образцами.

Таблица 3. Динамика показателей концентраций нитрита и эндотелина-1 у пациентов с начальными стадиями церебро-васкулярной недостаточности в ходе лечения.

Показатель	До лечения	После лечения	P	здоровые
Н и т р и т ы , мкмоль/л	1,899±0,789	1,365±0,417	0,0109	1,178±0,235
Эндотелин-1, нг/мл	0,986±0,53	0,3147±0,138	0.0001	0,240±0,12

Таблица 4. Показатели апоптоза лимфоцитов периферической крови пациентов с начальными проявлениями недостаточности мозгового кровообращения (in vitro).

	Спонтанный апоптоз, % от общего кол-ва клеток	Индукцированный апоптоз, % от общего кол-ва клеток	ИИА, у.е.
Без препарата	19,44±8,2	23,53±7,7	0,838±0,2
Тивортин 4г/сут	17,29±5,74	23,64±7,2	0,736±0,1*
Тивортин 8г/сут	16,97±6,13	21,50±7,3	0,801±0,03

* - статистически значимое отличие по указанному в шапке колонки показателю между образцами.

В таб. 3. представлены биохимические показатели сосудодвигательной функции эндотелия в динамике. Выявлено, что у пациентов с начальными проявлениями недостаточности мозгового кровообращения и дисциркуляторной энцефалопатией 1-й стадии уровень нитритов и эндотелина -1 значимо выше, чем у относительно здоровых добровольцев (n=7)

Ключевым моментом исследования было выявление положительного влияния Тивортина на функциональный резерв МНК, причем в дозе 4 г в сутки, но не 8 г, что только подтверждает гипотезу о дозозависимости эффекта и, в данном случае, регулирующем влиянии доз, приближающихся с суточной потребности в частично незаменимой аминокислоте (табл. 4).

Выводы

В ходе исследования наблюдалась положительная динамика в состоянии пациентов с начальными стадиями церебро-васкулярной недостаточности, что отражалось в уменьшении встречаемости основных жалоб. Статистически значимо уменьшилась встречаемость жалоб, которые характеризуют функциональное состояние ЦНС (субъективное ощущение шума в голове, нарушение концентрации внимания и рассеянность).

На фоне лечения была отмечена нормализация показателя распространенной эндотелиальной функции – потоко-зависимой вазодилатации – после курса L-аргинином количество больных с признаками ЭД уменьшилось с 18 до 3 пациентов.

Было выявлено, что терапия L-аргинином оказывает благоприятное влияние на уровень эндотелина-1, поскольку после терапии уровень стал приближаться к таковому у здоровых лиц. Кроме того, наблюдалось снижение уровня нитрита, уровень которого опосредованно отражает метаболизм NO и должен находиться в балансе с уровнем эндотелина-1. Другими словами, препарат оказывает регулирующее влияние на ключевые биологически активные вещества, участвующие в регуляции сосудистого тонуса, в том числе и мозговых сосудов.

Изучение функционального резерва клеток иммунной системы выявило статистически значимые отличия ИИА при использовании Тивортина в дозе аналогичной суточной дозе L-аргинина 4 г в сутки. Также было показано отсутствие статистически значимых различий в значениях спонтанного и индуцированного апоптоза, но снижение уровня указанных показателей указывает на дозозависимый эффект и необходимость индивидуально подбирать дозу препарата, т.к. во время исследования в 2 случаях (10%) увеличение функционального резерва происходило только после применения дозы аналогичной суточной дозе L-аргинина 8 г в сутки. Таким образом, результаты исследования ИИА позволяют говорить о потенциально протективных свойствах препарата относительно внешних проапоптогенных воздействий в определенной дозе. При этом абсолютные показатели спонтанного и индуцированного апоптоза диагностической значимости не имели, что указывает на регулируемую, сбалансированную направленность действия

препарата. Следует отметить, что увеличение дозы вдвое в абсолютном большинстве случаев не только не оказывает дополнительного положительного влияния, а и приводит к нарушениям регуляции клеточной смерти, но и указывает на необходимость индивидуального подхода к каждому случаю.

Таким образом, применение Тивортина в комплексе превентивного лечения у пациентов с сосудистыми факторами риска и признаками эндотелиальной дисфункции позволяет говорить о его патогенетической направленности действия на патологический процесс.

Литература:

1. Биленко М.В., Ладыкина М.В., Федосова С.В., Сравнительная оценка цитотоксического эффекта перекиси водорода и фактора некроза опухолей альфа на неишемизированные и ишемизированные эндотелиальные клетки // *Вопр. мед. химии.* — 1999. — №5. — С. 2–7.
2. Программированная клеточная гибель / Под ред. В. С. Новикова. — СПб., 1996
3. Anderson, T. J. (1999) Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* 34: 631–638.
4. Arginine and Arginase: Endothelial NO Synthase Double Crossed? *Vanhoutte Circ Res.* 2008; 102: 866-868.
5. Böger RH, Bode- Böger SM, Mugge A, Kienke S, Brandes R, et al. 1995. Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. *Atherosclerosis* 117:273–84.
6. Böger RH, Bode- Böger SM, Szuba A, Tangphao O, Tsao PS, et al. 1998. ADMA: a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 98:1842–47.
7. Brune B, Messmer UK, Sandau K. The role of nitric oxide in cell injury. *Toxicol Lett* 1995;82-83:233-237.
8. Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, et al. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2005;23(2):233–246.
9. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87:840–4.
10. Celermajer D. Endothelial function: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:325–333. № Vane J, Anggard E, Botting R. Regulatory function of the vascular endothelium. *N Engl J Med.* 1990;323:27–36.
11. Celermajer D.S., K.E. Sorensen, D. Georgakopoulos, C. Bull, O. Thomas, J. Robinson, and J.E. Deanfield. 1993. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation.* 88:2149–2155.
12. Cooke, J. P. (2000) The endothelium: a new target for therapy. *Vasc. Med.* 5: 49–53.

13. Creager, M. A., Cooke, J. P., Mendelsohn, M. E., Gallagher, S. J., Coleman, S. M., Loscalzo, J. & Dzau, V. J. (1990) Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J. Clin. Invest.* 86:228–234.
14. Deanfield J, Donald A, Ferri C, et al. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2005;23(1):7–17.
15. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;115(10):1285–1295.
16. Greager M.A. L-arginin in endothelial and vascular health // *J Nutr.-Supp.* 1997.-10.-P. 2880-2887.
17. Heffernan KS, Vieira VJ, Valentine RJ. Microvascular function and ageing L-arginine, tetrahydrobiopterin and the search for the fountain of vascular youth. *J Physiol* 2008;586(8):2041–2042.
18. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, et al. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2001;104:2673–2678.
19. Huggins G.S, Pasternak RC, Alpert NM, et al. Effect of short term treatment of hyperlipidemia on coronary vasodilator function and myocardial perfusion in regions having substantial impairment of baseline dilator reverse. *Circulation* 1998;98:1291–6.
20. Huk I, Nanobashvili J, Neumayer C, Punz A, Müller M, et al. 1997. L-arginine treatment alters the kinetics of nitric oxide and superoxide release and reduces ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Circulation* 96:667–75.
21. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. & Chaudhuri, G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 9265–9269.
22. Kearney-Schwartz A, Rossignol P, Bracard S, et al. Vascular structure and function is correlated to cognitive performance and white matter hyperintensities in older hypertensive patients with subjective memory complaints. *Stroke* 2009;40(4):1229–1236.
23. Kuvin JT, Karas RH. Clinical utility of endothelial function testing: ready for prime time? *Circulation* 2003;107(25):3243–3247.
24. Lerman A, Burnett JC Jr, Higano ST, McKinley LJ, Holmes DR Jr. Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. *Circulation* 1998;97(21):2123–2128.
25. Lin CC, Tsai WC, Chen JY, Li YH, Lin LJ, Chen JH. Supplements of L-arginine attenuate the effects of high-fat meal on endothelial function and oxidative stress. *Int J Cardiol* 2008;127(3): 337–341.
26. Loscalzo J. L-Arginine and Atherothrombosis // *J. Nutr.* 134: 2798S–2800S, 2004.
27. Lyons CR. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv Immunol* 1995;60:323–371.
28. Moncada, S. & Higgs, A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329: 2002–2012.
29. Morikawa E, Moskowitz MA & Huang Z et al. (1994) L-arginine infusion promotes nitric oxide-dependent vasodilation, increases regional cerebral blood flow, and reduces infarction volume in the rat. *Stroke* 25: 429–435.
30. Palmer, R. M., Ashton, D. S. & Moncada, S. (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664–666.
31. Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524–526.
32. Perez-Vizcaino F, Duarte J, Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res* 2006;40:1054–65.
33. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation.* 2001;104: 191–196.
34. Pritchard KA, Groszek L, Smalley DM, Sessa WC, Wu M, et al. 1995. Native low density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ. Res.* 77:510–18.
35. Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. 1990. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 101:746–52.
36. Suessenbacher A, Frick M, Alber HF, Barbieri V, Pachinger O, Weidinger F. Association of improvement of brachial artery flow-mediated vasodilation with cardiovascular events. *Vasc Med* 2006;11(4):239–244.
37. Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Böger RH, et al. 1999. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetrical dimethylarginine in men with essential hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 33:652–58.
38. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, et al. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000;101:948–54.
39. Umans JG, Levi R. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. *Annu Rev Physiol* 1995;57:771–790.
40. Wang J, Brown MA, Tam SH, et al. Effects of diet on measurements of nitric oxide metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997;24:418–20.
41. Welsch MA, Dobrosielski DA, Arce-Esquivel AA, et al. The association between flow-mediated dilation and physical function in older men. *Med Sci Sports Exerc* 2008;40(7):1237–1243.
42. Widlansky, M. E., Gokce, N., Keaney, J. F., Jr. & Vita, J. A. (2003) The clinical implications of endothelial dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42: 1149–1160.
43. Wu G, Morris SM Jr. 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 336:1–17.
44. Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism in mammals. In: Cynober LA ed. *Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition.* Boca Raton, FL: CRC Press, 2004: 153–67.
45. Yavuz BB, Yavuz B, Sener DD, et al. Advanced age is associated with endothelial dysfunction in healthy elderly subjects. *Gerontology* 2008;54(3):153–156.
46. Zweier, J. L., Samouilov, A. & Kuppusamy, P. (1999) Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1411: 250–262.