Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова
2023, т. 123, №8, вып. 2, с. 47–54
https://doi.org/10.17116/jnevro202312308247

S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry
2023, vol. 123, no. 8, issue 2, pp. 47–54
https://doi.org/10.17116/jnevro202312308247

Доступность оксида азота при церебральной микроангиопатии

© Л.А. ДОБРЫНИНА, А.А. ШАБАЛИНА, К.В. ШАМТИЕВА, Е.И. КРЕМНЕВА, М.Р. ЗАБИТОВА, А.Г. БУРМАК, А.А. БЫРОЧКИНА, Ю.И. АХМЕТШИНА, Е.В. ГНЕДОВСКАЯ, М.В. КРОТЕНКОВА

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

Резюме

Цель исследования. Разработать тест индивидуальной доступности оксида азота (NO) на основе изменения реологических свойств эритроцитов после инкубации с донатором NO и оценить роль данных нарушений в поражении мозга и развитии когнитивных расстройств при церебральной микроангиопатии (ЦМА).

Материал и методы. У 73 пациентов с ЦМА (48 (65,8%) женщин, средний возраст 60,1±6,5 года) оценены реологические свойства эритроцитов до и после инкубации с 10 мкмоль/л L-аргинина — донатора NO с помощью лазерного оптического ротационного клеточного анализатора, проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) методом МРТ-Т1-динамического контрастирования.

Результаты. Среди исследуемых показателей реологических свойств эритроцитов лучшие характеристики по ROC-анализу имела скорость дезагрегации эритроцитов после инкубации с L-аргинином (площадь под кривой 0,733 (0,609—0,856), чувствительность 67%, специфичность 79%). Пациенты с превышением порогового значения скорости дезагрегации эритроцитов >113 $с^{-1}$ имели более тяжелые когнитивные расстройства, артериальную гипертензию, поражение белого вещества и повышенную проницаемость ГЭБ в сером и неизмененном белом веществе.

Заключение. Удлиненная скорость дезагрегации эритроцитов у пациентов с ЦМА после инкубации с L-аргинином указывает на риск прогрессирования заболевания, обусловленный снижением биодоступности NO/нарушением функциональной системы L-аргинин-eNOS-NO. Данный тест может использоваться для оценки индивидуальной биодоступности NO и потенциально — для показаний к модифицирующей терапии донаторами NO, например L-аргинином. Необходимы клинические исследования по стандартизации и оценке эффективности терапии донаторами NO у пациентов с ЦМА и когнитивными расстройствами.

Ключевые слова: *церебральная микроангиопатия, болезнь мелких сосудов, когнитивные расстройства, оксид азота, аргинин, дезагрегация эритроцитов.*

Информация об авторах:
Добрынина Л.А. — https://orcid.org/0000-0001-9929-2725
Шабалина А.А. — https://orcid.org/0000-0001-9604-7775
Шамтиева К.В. — https://orcid.org/0000-0002-6995-1352
Кремнева Е.И. — https://orcid.org/0000-0001-9396-6063
Забитова М.Р. — https://orcid.org/0000-0003-2523-333X
Бурмак А.Г. — https://orcid.org/0000-0002-7523-2928
Бырочкина А.А. — https://orcid.org/0000-0002-2285-2533
Ахметшина Ю.И. — https://orcid.org/0009-0002-3333-9935
Гнедовская Е.В. — https://orcid.org/0000-0001-6026-3388
Кротенкова М.В. — https://orcid.org/0000-0003-3820-4554
Автор, ответственный за переписку: Шамтиева К.В. — e-mail: kamila.shamt@gmail.com

Как цитировать:
Добрынина Л.А., Шабалина А.А., Шамтиева К.В., Кремнева Е.И., Забитова М.Р., Бурмак А.Г., Бырочкина А.А., Ахметшина Ю.И., Гнедовская Е.В., Кротенкова М.В. Доступность оксида азота при церебральной микроангиопатии. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2023;123(8 вып. 2):47–54. https://doi.org/10.17116/jnevro202312308247

Nitric oxide availability in cerebral microangiopathy

© L.A. DOBRYNINA, A.A. SHABALINA, K.V. SHAMTIEVA, E.I. KREMNEVA, M.R. ZABITOVA, A.G. BURMAK, A.A. BYROCHKINA, YU.I. AKHMETSHINA, E.V. GNEDOVSKAYA, M.V. KROTENKOVA

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Abstract

Objective. To develop a test of individual nitric oxide (NO) availability based on changes in erythrocyte rheological properties after incubation with a NO donor and to evaluate the role of these disorders in brain damage and development of cognitive impairment (CI) in cerebral small vessel disease (cSVD).

Material and methods. In 73 cSVD patients (48 (65.8%) women, mean age 60.1±6.5), the rheological properties of erythrocytes before and after incubation with 10 μmol/L L-arginine-NO donor were evaluated using a laser-optical rotating cell analyzer, and the blood-brain barrier (BBB) permeability by MRI-T1 dynamic contrast.

Results. Among the studied parameters of erythrocyte rheological properties, the best characteristic by ROC analysis was the rate of erythrocyte disaggregation (γ-dis) after incubation with L-arginine (area under the curve 0.733 (0.609—0.856), sensitivity 67%, specificity 79%). Patients with a γ-dis threshold >113 sec^{-1} had more severe CI, arterial hypertension, white matter lesions, and increased BBB permeability in gray matter and normal-appearing white matter.

Conclusion. The prolonged rate of erythrocyte disaggregation in cSVD patients after incubation with L-arginine indicates the risk for disease progression due to decreased NO bioavailability/disruption of the functional L-arginine-eNOS-NO system. This test can be used to assess individual NO bioavailability and potentially identify indications for modifying therapy with NO donors such as L-arginine. Clinical trials are needed to standardize and evaluate the efficacy of NO donor therapy in patients with cSVD and CI.

Keywords: *cerebral microangiopathy, cognitive impairment, nitric oxide, arginine, erythrocyte disaggregation.*

Information about the authors:
Dobrynina L.A. — https://orcid.org/0000-0001-9929-2725
Shabalina A.A. — https://orcid.org/0000-0001-9604-7775
Shamtieva K.V. — https://orcid.org/0000-0002-6995-1352
Kremneva E.I. — https://orcid.org/0000-0001-9396-6063
Zabitova M.R. — https://orcid.org/0000-0003-2523-333X
Burmak A.G. — https://orcid.org/0000-0002-7523-2928
Byrochkina A.A. — https://orcid.org/0000-0002-2285-2533
Akhmetshina Y.I. — https://orcid.org/0009-0002-3333-9935
Gnedovskaya E.V. — https://orcid.org/0000-0001-6026-3388
Krotenkova M.V. — https://orcid.org/0000-0003-3820-4554
Corresponding author: Shamtieva K.V. — kamila.shamt@gmail.com

To cite this article:
Dobrynina LA, Shabalina AA, Shamtieva KV, Kremneva EI, Zabitova MR, Burmak AG, Byrochkina AA, Akhmetshina YuI, Gnedovskaya EV, Krotenkova MV. Nitric oxide availability in cerebral microangiopathy. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry=Zhurnal nevrologii i psikhiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2023;123(8 vyp 2):47–54. (In Russ.). https://doi.org/10.17116/jnevro202312308247

Церебральная микроангиопатия (ЦМА), ассоциированная с возрастом и сосудистыми факторами риска, является основной причиной сосудистых когнитивных расстройств (КР), а также причиной инсультов, инвалидности и смертности [1—3].

Артериальная гипертензия (АГ) — основной сосудистый фактор риска спорадической ЦМА [4, 5]. Однако стратегия снижения риска развития деменции стандартным и агрессивным контролем АГ показала противоречивые результаты [6, 7]. Отсутствие лечения, модифицирующего течение ЦМА, обосновывает поиск «лекарственных» мишеней на основе выявленных патогенетических механизмов [2, 4]. Поскольку облигатным условием развития ЦМА является эндотелиальная дисфункция, характеризующаяся снижением биодоступности/дефицитом оксида азота (NO) [8—12], оправдана разработка способов оценки основной функциональной системы синтеза NO — L-аргинин-eNOS-NO. Поддержание баланса данной функциональной системы может стать потенциальной мишенью терапии ЦМА.

В нормальных условиях NO-синтаза (NOS) катализирует превращение аргинина, O_2 и перенос электрона никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH) с образованием NO и цитруллина в присутствии тетрагидробиоптерина (BH4) и других кофакторов [9]. Снижение биодоступности/дефицит NO наиболее часто упоминается в связи со снижением активности эндотелиальной NOS (eNOS, NOS3) при эндотелиальной дисфункции. Снижение биодоступности/дефицит NO приводит к формированию вазоспастического, протромботического, воспалительного статуса сосудистой стенки, сопряженного с основными механизмами ЦМА — гипоксией/ишемией и повышенной проницаемостью гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [9, 11, 12].

Нарушения других звеньев функциональной системы синтеза NO (относительный недостаток аргинина или BH4) приводят к уменьшению синтеза NO через увеличение несвязанной NOS и ее разобщение — сдвиг окисления на молекулярный кислород с образованием O_2- [13, 14]. Среди причин относительного недостатка аргинина — конкурентные взаимоотношения с аргиназой за NOS, ингибирование NOS аналогами аргинина, в первую очередь метиларгининами [15, 16]. Повышение уровня последних препятствует транспорту L-аргинина в эндотелиальную клетку, что приводит к развитию аргининового парадокса — зависимости клеточной продукции NO от экзогенного L-аргинина при насыщении NOS внутриклеточным L-аргинином [16, 17].

Зависимость выработки NO от экзогенного L-аргинина стала основанием для проведения исследований по использованию последнего в качестве препарата, улучшающего функции эндотелия при ряде заболеваний и старении [18—21]. Несмотря на многообещающие результаты большинства исследований, аргинин не нашел широкого применения в официальной медицине. Очевидной необходимостью является определение оптимальной целевой группы [15] на основе показателей, обосновывающих терапию L-аргинином для обеспечения биодоступности NO и предотвращения разобщения NOS.

Гипотеза о целесообразности длительного перорального приема высоких доз L-аргинина для замедления прогрессирования ЦМА и его проявлений была выдвинута более 10 лет назад [22], однако до настоящего времени не нашла развития.

В настоящем исследовании реологические свойства и деформируемость эритроцитов до и после инкубации с L-аргинином использовались для оценки доступности NO/нарушений состояния функциональной системы L-аргинин-eNOS-NO и их выявления среди пациентов с ЦМА, находившихся в условиях дефицита NO и потенциально нуждающихся в терапии L-аргинином. Выбор эритроцитов в качестве индивидуальной модели оценки был обоснован наличием в них eNOS, участвующей в синтезе, транспорте и высвобождении продуктов метаболизма NO и АТФ, активной регуляции деформируемости эритроцитов и текучести крови, контроле системной биодоступности NO и сосудистого тонуса [23—25]. Ценность полученных показателей уточнялась по их связи с выраженностью КР, макроструктурных МРТ-признаков ЦМА и проницаемостью ГЭБ по данным МРТ Т1-динамического контрастирования (Т1-ДК МРТ).

Цель исследования — разработать тест индивидуальной биодоступности NO на основе изменения реологических свойств эритроцитов после инкубации с донатором оксида азота и оценить роль данных нарушений в поражении мозга и развитии КР при ЦМА.

Материал и методы

В исследование были включены 73 пациента в возрасте 46—70 лет с когнитивными и другими неврологическими жалобами, изменениями на МРТ головного мозга, соответствующими ЦМА [26] (48 (65,8%) женщин, средний возраст 60,1±6,5 года). Пациенты с гиперинтенсивностью белого вещества (ГИБВ) стадии Fazekas I включались в исследование при наличии АГ 2—3-й степени и/или 1 лакунарного инфаркта или более. Контрольную группу составили 19 добровольцев (14 (73,7%) женщин, средний возраст 56,9±6,4 года) без клинических и МРТ-признаков сосудистой и дегенеративной патологии головного мозга. Оценивались традиционные сосудистые факторы риска: АГ, гиперхолестеринемия, ожирение, сахарный диабет и курение. Тяжесть КР устанавливали на основании оценки когнитивных функций по Монреальской шкале (MoCA).

МРТ-исследование головного мозга проводилось на магнитно-резонансном томографе Siemens MAGNETOM Verio с величиной магнитной индукции 3 Тл с использованием 12-канальной головной катушки («Siemens AG», Erlangen, Германия). ГИБВ оценивалась по шкале Фазекас по T2-FLAIR (оценка 0—3) [27]. Для количественной оценки проводилась полуавтоматическая сегментация ГИБВ с использованием набора инструментов LST (http://www.applied-statistics.de/lst.htm) для SPM12 (http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm) с последующей ручной коррекцией с помощью программы просмотра ITK-SNAP (http://itksnap.org). Полученные данные сохранялись в качестве бинарной маски с учетом того, что в последующем построены маски для визуально неизмененного белого вещества (НИБВ) для расчета показателей проницаемости ГЭБ.

Для оценки ГЭБ была выполнена Т1-ДК МРТ: после двух Т1 объемных интерполированных исследований задержки дыхания (T1-VIBE) (углы поворота 2 и 15°) для предконтрастных Т1-карт вводился гадодиамид (Omniscan; GE Healthcare) 0,2 мл/кг (т.е. 0,1 ммоль/кг массы тела) со скоростью 3 мл/с внутривенно с помощью инъекционного насоса, а затем последовательно повторяли 3D Т1-взвешенную последовательность 100 раз в течение 15 мин 33 с. Параметры сканирования: TR 8,6 мс, TE 4 мс, поле обзора 250 мм, матрица 256×230 откликов, угол переворота 15°, толщина среза 3,6 мм.

Весь массив полученных данных проходил предварительную обработку в программном обеспечении NordicNeuroLab («NordicICE», Норвегия). Она включала: автоматическую коррекцию двигательных артефактов, корегистрацию пре- и постконтрастных данных динамических серий, автоматическое выделение областей оценки содержания контрастного вещества. В качестве данных областей служили синусы твердой мозговой оболочки [28]. Для каждого пациента индивидуально задавались гематокрит, доза и релаксивность контрастного вещества. Для оценки низкой проницаемости ГЭБ при ЦМА использовалась армакокинетическая модель Patlak, включающая карты Ktrans (volume transfer coefficient/коэффициент переноса контрастного вещества через сосудистую стенку), Vp (fractional blood plasma volume/частичный объем плазмы) и AUC (area under curve/площадь под кривой динамического контрастирования), соответствующая задержке контрастного вещества в веществе головного мозга.

После получения карт параметров проницаемости дальнейшая обработка данных проводилась в SPM12 (http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm). Она включала последовательные этапы: корегистрацию каждой из карт параметров проницаемости с Т1-изображениями; сегментацию Т1-изображений на серое и белое вещество головного мозга с последующей коррекцией полученных изображений с учетом масок НИБВ и ГИБВ и выделением бинарных изображений скорректированного серого вещества с помощью скрипта на базе MatLab (https://matlab.ru/). Расчет показателей проницаемости проводился в программе ITK-SNAP (http://itksnap.org) в сером веществе, НИБВ и ГИБВ путем наложения соответствующих масок на индивидуальные карты проницаемости.

Реологические свойства, такие как кинетика агрегации и дезагрегации эритроцитов, а также их деформируемость, исследовали на лазерном оптическом ротационном клеточном анализаторе LORCA (Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer, «Mechatronics the Netherlands», Нидерланды). В данном анализаторе реализован метод регистрации интенсивности обратного светорассеяния от образца крови, помещенного между двумя соосными стеклянными цилиндрами для создания простого сдвигового течения [29]. Вращение цилиндров обеспечивает возникновение потока в тонком слое суспензии эритроцитов образца, что вызывает разъединение агрегатов, образующихся в статических условиях. Измерение кинетики спонтанной агрегации происходит после резкой остановки вращения цилиндров. Происходит восстановление формы эритроцитов после деформации в сдвиговом потоке и их спонтанная агрегация, в которой выделяют два этапа — более быстрый этап формирования двухмерных агрегатов, «монетных столбиков», и более плавный этап формирования трехмерных агрегатов. С помощью видеокамеры снимаются показатели дифракции лазерного луча, который фиксирует деформацию, с последующим компьютерным анализом полученных данных. Математическая модель описывает эти процессы с помощью расчета таких показатели, как Ts и Tf — время первой и второй фаз агрегации, а также амплитуды агрегации (Amp), отражающей эффективный размер агрегатов, индекса агрегации (AI), характеризующего агрегационный процесс в целом, и IDmax, т.е. показателя максимально возможной деформации эритроцитов.

Следующий шаг проведения анализа — ступенчатое увеличение скорости сдвига от 0 $с^{-1}$ до ~900 $с^{-1}$. Эта процедура сопровождается дезагрегацией эритроцитов и позволяет определить скорость сдвига (γ-dis), при которой достигается полная дезагрегация и не образуются новые агрегаты. Этот показатель характеризует прочность эритроцитарных агрегатов [29, 30].

Для исследования влияния донаторов NO на характеристики агрегации, дезагрегации и деформируемости эритроциты инкубировали с L-аргинином в конечной концентрации 10 мкмоль/л (10^{-6} ммоль/л) при температуре 37 °C в течение 30 мин, далее проводили повторную оценку реологических свойств.

Определение TGF-β1, FGFs, VEGF-A, в сыворотке крови проводили с использованием наборов реагентов BCM Diagnostics, HIF-1α — Cusabio, t-PA и PAI-1 — Technoclone. При всех исследованиях использовались калибраторы фирм-производителей реагентов. Контроль исполнения анализов иммуноферментным методом проводился в дублях на планшечном ридере VICTOR 2 Perken Elmer (США) с использованием лиофилизированных контрольных сывороток/плазм с низким и высоким содержанием исследуемых параметров.

Исследование одобрено локальным Этическим комитетом ФГБУ «Научного центра неврологии», протокол №12-3/16 от 14.10.16. Все испытуемые подписали форму информированного согласия на участие в исследовании.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения IBM SPSS 23.0 (IBM SPSS Statistics, версия 23.0, «IBM Corp.», Армонк, штат Нью-Йорк, США) и R 3.4.3 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия). Данные представлены как *n* (%) для категориальных переменных, или как среднее±стандартное отклонение (mean±SD), или медиана [межквартильный размах (IQR)] для количественных данных. Различия между группами определяли с использованием критерия χ^2, *t*-критерия независимых выборок, одномерного дисперсионного анализа или критерия Краскела—Уоллиса. Во всех случаях использовали двусторонние статистические критерии. Нулевая гипотеза отвергалась, если $p<0,05$. Для оценки предсказательной способности отдельных показателей в развитии ожидаемых исходов использовали ROC-анализ (Receiver Operator Characteristic) с определением порогового значения, чувствительности, специфичности и площади под кривой.

Таблица 1. **Реологические свойства эритроцитов исходно и после инкубации с L-аргинином**

Table 1. **Rheological properties of erythrocytes before (baseline) and after incubation with L-arginine**

Реологический показатель	Группа ЦМА (*n*=73)	Группа контроля (*n*=19)
Amp, усл. ед.		
исходно	11,2 [9,5; 13,6]	12,0 [8,8; 13,9]
после инкубации	12,4 [10,6; 13,9]	12,5 [10,0; 14,6]
Ts, с		
исходно	14,1 [12,0; 16,9]**	19,1 [14,0; 25,6]
после инкубации	15,6 [12,4; 22,4]*	19,8 [14,4; 25,9]
Tf , с		
исходно	2,0 [1,5; 2,3]*	2,7 [1,7; 3,9]
после инкубации	2,2 [1,6; 3,0]*	3,2 [2,2; 3,8]
AI, %		
исходно	65,2 [61,2; 69,3]*	58,4 [52,0; 69,1]
после инкубации	61,0 [55,3; 67,4]*	55,3 [50,3; 61,3]
γ-dis, c^{-1}		
исходно	195 [140; 250]**	125 [100; 180]
после инкубации	160 [100; 200]**	100 [100; 110]
DImax		
исходно	0,42 [0,38; 0,48]	0,43 [0,36; 0,48]
после инкубации	0,34 [0,28; 0,38]	0,35 [0,28; 0,38]

Примечание. * — $p<0,05$; ** — $p<0,005$.
Note. * — $p<0.05$; ** — $p<0.005$.

Результаты

Реологические свойства эритроцитов до и после инкубации с L-аргинином показаны в **табл. 1**. Для большинства показателей они имели значимые различия между пациентами с ЦМА и контролем.

Значимость результирующих (после инкубации с аргинином) реологических показателей была оценена по площади под кривой, порогу с оптимальными показателями чувствительности и специфичности, отношению шансов **(табл. 2)**.

Согласно критерию Йодена, γ-dis имел пороговое значение с наибольшей суммой чувствительности и специфичности. Его пороговое значение было использовано для распределения обследуемых на две группы со значениями γ-dis <112 c^{-1} и >113 c^{-1}. Полученные группы различались по наличию сосудистых факторов риска, выраженности когнитивного дефицита и основного МРТ-признака ЦМА — ГИБВ **(табл. 3)**.

В группе с γ-dis выше пороговой величины (>113 c^{-1}) преобладали пациенты с тяжелой АГ, сахарным диабетом 2-го типа, ожирением, ГИБВ стадии 2—3 по Фазекасу большей выраженностью КР.

Группы были сравнены по показателям проницаемости ГЭБ, полученных с помощью Т1-ДК МРТ **(табл. 4)**.

Проницаемость ГЭБ по AUC в группе с γ-dis >113 c^{-1} по сравнению с группой с γ-dis <112 c^{-1} была выше в сером веществе и НИБВ.

Группы были сравнены по циркулирующим показателям повреждения сосудистой стенки, NO и его метаболитов **(табл. 5)**. Сопоставляемые группы различались только по более высокому уровню t-PA в группе с γ-dis >113 (c^{-1}).

Обсуждение

Исследование посвящено изучению роли нарушений функциональной системы L-аргинин-eNOS-NO в развитии ЦМА на основе поиска индивидуальных показателей ее состояния. Обоснованность исследования определяется приоритетным значением в инициировании и прогрессировании ЦМА эндотелиальной дисфункции, сопря-

Таблица 2. **Результирующие (после инкубации с L-аргинином) реологические показатели эритроцитов**

Table 2. **Resulting (after incubation with L-arginine) rheological properties of erythrocytes**

Показатель	Площадь под кривой (ДИ)	Порог	Чувствительность	Специфичность	Отношение шансов (ДИ)
Amp, усл. ед.	0,535 (0,388—0,682)	12,45	53%	51%	1,07 (0,88—1,30)
Ts, с	0,664 (0,537—0,823)	187	63%	66%	0,99 (0,88—1,10)
Tf, с	0,703 (0,584—0,823)	2,7	63%	63%	1,65 (0,47—5,79)
AI, %	0,690 (0,562—0,818)	59,3	60%	74%	1,03 (0,84—1,26)
γ-dis, c^{-1}	0,733 (0,609—0,856)	112,5	67%	79%	0,98 (0,97—1,00)
DImax	0,517 (0,375—0,660)	0,345	53%	52%	0,15 (0,00—97,28)

Таблица 3. **Клиническая характеристика групп с γ-dis <112 с$^{-1}$ и >113 с$^{-1}$**
Table 3. **Clinical characteristics of groups with γ-dis <112 sec^{-1} and >113 sec^{-1}**

Характеристика	γ-dis <112 с$^{-1}$ (*n*=39)	γ-dis >113 с$^{-1}$ (*n*=53)
Пол, женщины, *n* (%)	26 (66,6%)	36 (67,9)
Возраст, годы (mean±*SD*)	59,1±6,0	59,7±7,0
АГ, *n* (%)	25 (64,1)	45 (84,9)**
Степень АГ, *n* (%)		
1-я	11 (44,0)	8 (17,8)
2-я	7 (27,0)	8 (17,8)
3-я	7 (27,0)	29 (64,4)**
Сахарный диабет 2-го типа, *n* (%)	1 (2,3)	14 (26,4)**
Гиперхолестеринемия (общий холестерин >6,2 ммоль/л или прием статинов), *n* (%)	21 (58,5)	27 (50,9)
Ожирение (индекс массы тела >30 кг/м^2), *n* (%)	11 (28,2)	28 (52,8)*
Курение, *n* (%)	13 (33,3)	14 (26,4)
ГИБВ, шкала Fazekas, *n* (%)		
контроль	15 (38,5)	4 (7,6)**
I стадия	9 (23,1)	9 (16,9)
II стадия	7 (17,9)	18 (33,9)
III стадия	8 (20,5)	22 (41,6)
МоСА, баллы	28 [25; 29]	25 [22; 26]**

Примечание. * — p<0,05; ** — p<0,005.
Note. * — p<0.05; ** — p<0.005.

Таблица 4. **Проницаемость ГЭБ по Т1-ДК МРТ в группах с γ-dis <112 с$^{-1}$ и >113 с$^{-1}$**
Table 4. **BBB permeability according to T1-DC MRI in groups with γ-dis <112 sec^{-1} and >113 sec^{-1}**

Параметр	γ-dis <112 с$^{-1}$ (*n*=39)	γ-dis >113 с$^{-1}$ (*n*=53)
Ktrans серое вещество	0,0002 [0,0001; 0,0004]	0,0002 [0,0001; 0,0003]
Vp серое вещество	1,1267 [0,8214; 1,3489]	1,2837 [1,0199; 1,5810]
AUC серое вещество	0,0026 [0,0020; 0,0031]	0,0033 [0,0026; 0,0037]*
Ktrans НИБВ	0,0001 [0,0000; 0,0001]	0,0000 [0,0000; 0,0001]
Vp НИБВ	0,4395 [0,3835; 0,5937]	0,5531 [0,4167; 0,6281]
AUC НИБВ	0,0011 [0,0009; 0,0012]	0,0013 [0,0011; 0,0015]*
Ktrans ГИБВ	0,0001 [0,0000; 0,0002]	0,0001 [0,0000; 0,0002]
Vp ГИБВ	0,4541 [0,3118; 0,6081]	0,4758 [0,3320; 0,7470]
AUC ГИБВ	0,0010 [0,0008; 0,0016]	0,0012 [0,0010; 0,0015]

Примечание. * — p<0,05.
Note. * — p<0.05.

женной со снижением биодоступности NO [8—12]. Наличие показателей, свидетельствующих об индивидуальных нарушениях в системе L-аргинин-eNOS-NO со снижением биодоступности/дефицитом NO, является крайне ценным, учитывая отсутствие лечения, модифицирующего течение ЦМА [2], возможность использования донатора NO — L-аргинина в качестве терапевтического средства [31—33], в том числе у пожилых ослабленных пациентов с АГ и КР [20]. Несмотря на доказанную зависимость синтеза NO от экзогенного L-аргинина [16, 17] и его эффективность на малых выборках пациентов при патологиях с эндотелиальной дисфункцией [20, 31—33], прием L-аргинина не может быть априорным и неконтролируемым. Это обусловлено его сложным метаболизмом и непредсказуемостью последствий при применении в клинической практике [22], например потенциальной возможностью переключаться с пути eNOS на iNOS и приводить к NO-эксайтотоксичности [34]. Кроме того, отсутствие эффекта от приема L-аргинина в некоторых исследованиях также указывает на необходимость разработки показаний к его применению и поиск индивидуальных чувствительных показателей нарушения биодоступности NO.

Выбор эритроцитов в качестве модели оценки индивидуальных нарушений биодоступности/дефицита NO был предопределен наличием в них eNOS, участвующей в синтезе, транспорте и высвобождении продуктов метаболизма NO и АТФ, регуляции деформируемости эритроцитов и текучести крови, контроле системной биодоступно-

Таблица 5. **Сравнение показателей повреждения сосудистой стенки, NO и его метаболитов в группах с γ-dis <112 c^{-1} и >113 c^{-1}**
Table 5. **Comparison of vascular wall damage markers, nitric oxide and its metabolites in groups with γ-dis <112 sec^{-1} and >113 sec^{-1}**

Параметр	γ-dis <112 c^{-1} (*n*=39)	γ-dis >113 c^{-1} (*n*=53)
NO_3^-, мкмоль/л	58 [45; 76]	52 [32; 74]
NO_2^-, мкмоль/л	49 [34; 68]	43 [24; 67]
NO, мкмоль/л	9 [7; 13]	9 [5; 12]
TNF-α, пг/мл	25,0 [18,3; 44,0]	26,0 [18,5; 41,0]
TGF-1, нг/мл	2,70 [2,25; 4,80]	3,15 [2,46; 5,85]
VEGF-A, пг/мл	212 [160; 411]	248 [109; 400]
HIF-1α, нг/мл	0,5 [0,36; 0,65]	0,48 [0,38; 0,68]
FGF, пг/мл	300 [250; 420]	340 [255; 438]
PAI-1, нг/мл	25,5 [16,4; 34,2]	25,2 [17,1; 35,9]
t-PA, нг/мл	3,20 [0,93; 8,80]	6,5 [2,75; 10,40]*

Примечание. * — $p<0,05$.
Note. * — $p<0.05$.

сти NO и сосудистого тонуса [23, 24, 35]. Вероятно, функциональная система L-аргинин-eNOS-NO эритроцитов является даже более уязвимой и нестабильной, чем эндотелия. Это обусловлено тем, что эритроциты являются наиболее ранней и легкодоступной мишенью для активных форм кислорода. Многократное участие эритроцитов в окислительно-восстановительном цикле при оксигенации и деоксигенации гемоглобина поддерживает их окислительное повреждение и воспалительные реакции [36]. Это сопряжено с поддержанием разобщения eNOS и дефицита NO, снижением текучести мембран с повышением ее жесткости, лежащими в основе нарушений микроциркуляции [36].

Выбор из свойств эритроцитов деформируемости, агрегации и дезагрегации для выявления лиц с дефицитом NO был обоснован высокой значимостью данных изменений свойств эритроцитов в развитии ЦМА. В эксперименте на релевантной модели ЦМА — спонтанных гипертензивных крысах, склонных к инсульту, установлено, что скопления эритроцитов в капиллярах и артериолах являются первым проявлением патологии, выраженность которой нарастает по мере старения животных [37, 38]. Именно данное патологическое событие инициирует повреждение сосудистой стенки и последующий каскад событий, составляющий морфологическую основу ЦМА, — высокую проницаемость ГЭБ, формирование микрокровоизлияний и микротромбозов, инфарктов мозга вследствие окклюзии артериол [37, 38].

Нами использованы результирующие (после инкубации с L-аргинином) реологические показатели и деформация эритроцитов для расчета площади под кривой, отношения шансов и оптимальных показателей чувствительности и специфичности. Замедление скорости дезагрегации эритроцитов (γ-dis) оказалось лучшим среди оцениваемых показателей в определении пороговых значений для патологии. Это также созвучно с описанным выше феноменом скопления эритроцитов в капиллярах и артериолах как инициирующем и поддерживающем прогрессирование ЦМА [38]. Разделение пациентов по уровню пороговых значений позволило установить связь увеличенного времени дезагрегации эритроцитов (γ-dis) с тяжестью АГ, сахарным диабетом и ожирением. Это подтверждает признанную роль АГ и сахарного диабета в нарушении микроциркуляции [36] и ЦМА [39]. Пациенты с превышением порога γ-dis эритроцитов после инкубации с L-аргинином имели значимо более низкие когнитивные показатели по шкале MoCA, большую ГИБВ и проницаемость ГЭБ в НИБВ и сером веществе, оцениваемую по AUC, соответствующей задержке контрастного вещества в паренхиме мозга. Это позволяет рассматривать превышение пороговых значений γ-dis эритроцитов после инкубации с L-аргинином эквивалентом функционального дефицита NO и указывает на эритроциты как на значимого участника патогенетических процессов при ЦМА. Установленные взаимоотношения для данного показателя могут быть объяснены с позиций феномена капиллярной дисфункции [40, 41] и сопутствующих ей нарушений функционирования нейроваскулярной единицы. Данные процессы являются причиной ухудшения перфузии, неэффективного метаболизма, нарушения целостности ГЭБ [40, 41] и объясняют выявленные связи замедленной скорости дезагрегации эритроцитов после инкубации с L-аргинином с повышенной проницаемостью ГЭБ, выраженностью ГИБВ и КР.

Дополнительно между группами с разной биодоступностью NO были проведены сопоставления по уровню циркулирующих маркеров, ассоциированных с повреждением сосудистой стенки. Мы полагали, что их профиль может свидетельствовать о дополнительных условиях, поддерживающих патологические механизмы при нарушениях биодоступности/дефиците NO. Из всех исследованных показателей только повышение t-PA в группе с γ-dis >113 (c^{-1}) значимо отличалось от группы с γ-dis <112 (c^{-1}). t-PA, наряду с его хорошо известной ролью в фибринолизе, обладает плейотропной активностью в ЦНС — нейропластичностью, эксайтотоксичностью, влиянием на проницаемость ГЭБ [42]. Ранее нами была установлена связь повышения уровня t-PA с МРТ-изменениями, связанными с высокой проницаемостью ГЭБ [43]. Однако имеются основания полагать, что совместное действие t-PA, NO и его продуктов окисления обеспечивает континуум сосудистого и церебрального повреждения, ассоциированного с нейродегенерацией и развитием смешанных сосудисто-дегенеративных форм заболевания. Так, в эксперименте на t-PA-дефицитарных мышах было установлено, что повреждения ГЭБ

самого по себе недостаточно, чтобы вызвать нейродегенерацию; требуется последующее событие, опосредованное ONOO [44]. Результаты указывают, что повреждение ГЭБ, сопряженное с развитием нейродегенерации, происходит при условии, если NO и ONOO-эксайтотоксичность опосредуются t-PA [44].

Заключение

Нарушения в функциональной системе L-аргинин-eNOS-NO сопряжено с нарушением дезагрегационных свойств эритроцитов, повышением проницаемости ГЭБ, развитием ГИБВ и КР. Превышение пороговых значений скорости дезагрегации эритроцитов после инкубации с L-аргинином может использоваться для оценки функционального состояния системы L-аргинин-eNOS-NO и выявления лиц с нарушением биодоступности NO. L-аргинин может стать частью терапевтической стратегии ЦМА с КР.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда №22-15-00183 (https://rscf.ru/project/22-15-00183).
The study was supported by the Russian Science Foundation (Grant 22-15-00183; https://rscf.ru/project/22-15-00183).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Azarpazhooh MR, Avan A, Cipriano LE, et al. Concomitant vascular and neurodegenerative pathologies double the risk of dementia. *Alzheimers Dement.* 2018;14(2):148-156. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.07.755
2. Iadecola C, Duering M, Hachinski V, et al. Vascular Cognitive Impairment and Dementia: JACC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73(25):3326-3344. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.04.034
3. Парфенов В.А., Кулеш А.А. Цереброваскулярное заболевание с когнитивными нарушениями. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2021;121(9):121-130.
Parfenov VA, Kulesh AA. Cerebrovascular disease with neurocognitive impairment. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiatrii im. S.S. Korsakova*. 2021;121(9):121-130. (In Russ.). https://doi.org/10.17116/jnevro2021121091121
4. Wardlaw JM, Smith C, Dichgans M. Mechanisms of sporadic cerebral small vessel disease: insights from neuroimaging. *Lancet Neurol.* 2013;12(5):483-497. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70060-7
5. Калашникова Л.А., Кулов Б.Б. Факторы риска субкортикальной артериосклеротической энцефалопатии. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2002;102(7):3-8.
Kalashnikova LA, Kulov BB. Risk factors for subcortical arteriosclerotic encephalopathy. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiatrii im. S.S. Korsakova*. 2002;102(7):3-8. (In Russ.). https://doi.org/10.17116/jnevro20181182190-99
6. Hughes D, Judge C, Murphy R, et al. Association of Blood Pressure Lowering with Incident Dementia or Cognitive Impairment: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2020;323(19):1934-1944. https://doi.org/10.1001/jama.2020.4249
7. SPRINT MIND Investigators for the SPRINT Research Group; Williamson JD, Pajewski NM, Auchus AP, et al. Effect of Intensive vs Standard Blood Pressure Control on Probable Dementia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2019;321(6):553-561. https://doi.org/10.1001/jama.2018.21442
8. Bai T, Yu S, Feng J. Advances in the Role of Endothelial Cells in Cerebral Small Vessel Disease. *Front Neurol.* 2022;13:861714. https://doi.org/10.3389/fneur.2022.861714
9. Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin*. 2020;36(2):307-321. https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.009
10. Forsberg KME, Zhang Y, Reiners J, et al. Endothelial damage, vascular bagging and remodeling of the microvascular bed in human microangiopathy with deep white matter lesions. *Acta Neuropathol Commun*. 2018;6(1):128. https://doi.org/10.1186/s40478-018-0632-z
11. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol.* 2018;100:1-19. https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.05.005
12. Quick S, Moss J, Rajani RM, et al. Vessel for Change: Endothelial Dysfunction in Cerebral Small Vessel Disease. *Trends Neurosci.* 2021;44(4):289-305. https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.11.003
13. Caldwell RW, Rodriguez PC, Toque HA, et al. Arginase: A Multifaceted Enzyme Important in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2018;98(2):641-665. https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2016
14. Katusic ZS, d'Uscio LV, Nath KA. Vascular protection by tetrahydrobiopterin: progress and therapeutic prospects. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(1):48-54. https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.10.003
15. Gambardella J, Khondkar W, Morelli MB, et al. Arginine and Endothelial Function. *Biomedicines*. 2020;8(8):277. https://doi.org/10.3390/biomedicines8080277
16. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015;129(2):83-94. https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002
17. Böger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the «L-arginine paradox» and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr.* 2004;134(10 suppl):2842-2847; discussion 2853. https://doi.org/10.1093/jn/134.10.2842S
18. Heffernan KS, Fahs CA, Ranadive SM, Patvardhan EA. L-arginine as a nutritional prophylaxis against vascular endothelial dysfunction with aging. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2010;15(1):17-23. https://doi.org/10.1177/1074248409354599
19. Koga Y, Povalko N, Inoue E, et al. Therapeutic regimen of L-arginine for MELAS: 9-year, prospective, multicenter, clinical research. *J Neurol.* 2018;265(12):2861-2874. https://doi.org/10.1007/s00415-018-9057-7
20. Mone P, Pansini A, Jankauskas SS, et al. L-Arginine Improves Cognitive Impairment in Hypertensive Frail Older Adults. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:868521. https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.868521
21. Wu G, Meininger CJ. Arginine nutrition and cardiovascular function. *J Nutr.* 2000;130(11):2626-2629. https://doi.org/10.1093/jn/130.11.2626
22. Calabrò RS, Gervasi G, Bramanti P. L-Arginine and vascular diseases: lights and pitfalls! *Acta Biomed.* 2014;85(3):222-228.
23. Cortese-Krott MM, Kelm M. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function? *Redox Biol.* 2014;2:251-258. https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.027
24. Gladwin MT. Endothelium Seeing Red: Should We Redefine eNOS as the Endothelial and Erythrocytic NOS? *Circulation*. 2021;144(11):890-892. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.055679
25. Simmonds MJ, Detterich JA, Connes P. Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell. *Biorheology.* 2014;51(2-3):121-134. https://doi.org/10.3233/BIR-140653

26. Wardlaw JM, Smith EE, Biessels GJ, et al. STandards for ReportIng Vascular changes on nEuroimaging (STRIVE v1). Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* 2013;12(8):822-838. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70124-8

27. Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, et al. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *AJR Am J Roentgenol.* 1987;149(2):351-356. https://doi.org/10.2214/ajr.149.2.351

28. Li Y, Li M, Zhang X, et al. Higher blood-brain barrier permeability is associated with higher white matter hyperintensities burden. *J Neurol.* 2017;264(7):1474-1481. https://doi.org/10.1007/s00415-017-8550-8

29. Lee SS, Kim NJ, Sun K, et al. Association between arterial stiffness and the deformability of red blood cells (RBCs). *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006;34(4):475-481.

30. Baskurt OK. In vivo correlates of altered blood rheology. *Biorheology.* 2008;45(6):629-638.

31. Blum A, Hathaway L, Mincemoyer R, et al. Cannon RO 3rd. Effects of oral L-arginine on endothelium-dependent vasodilation and markers of inflammation in healthy postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(2):271-276. https://doi.org/10.1016/s0735-1097(99)00553-7

32. Lekakis JP, Papathanassiou S, Papaioannou TG, et al. Oral L-arginine improves endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. *Int J Cardiol.* 2002;86(2-3):317-323. https://doi.org/10.1016/s0167-5273(02)00413-8

33. Shiraseb F, Asbaghi O, Bagheri R, et al. Effect of l-Arginine Supplementation on Blood Pressure in Adults: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *Adv Nutr.* 2022;13(4):1226-1242. https://doi.org/10.1093/advances/nmab155

34. Luiking YC, Ten Have GA, Wolfe RR, Deutz NE. Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;303(10):1177-1189. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00284.2012

35. Simmonds MJ, Detterich JA, Connes P. Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell. *Biorheology.* 2014;51(2-3):121-134. https://doi.org/10.3233/BIR-140653

36. Maruyama T, Hieda M, Mawatari S, Fujino T. Rheological Abnormalities in Human Erythrocytes Subjected to Oxidative Inflammation. *Front Physiol.* 2022;13:837926. https://doi.org/10.3389/fphys.2022.837926

37. Hainsworth AH, Markus HS. Do in vivo experimental models reflect human cerebral small vessel disease? A systematic review. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(12):1877-1891. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.91

38. Schreiber S, Bueche CZ, Garz C, et al. The pathologic cascade of cerebrovascular lesions in SHRSP: is erythrocyte accumulation an early phase? *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(2):278-290. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.122

39. Wardlaw JM, Smith C, Dichgans M. Small vessel disease: mechanisms and clinical implications. *Lancet Neurol.* 2019;18(7):684-696. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30079-1

40. Østergaard L, Aamand R, Gutiérrez-Jiménez E, et al. The capillary dysfunction hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2013;34(4):1018-1031. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.011

41. Østergaard L, Jespersen SN, Engedahl T, et al. Capillary dysfunction: its detection and causative role in dementias and stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2015;15(6):37. https://doi.org/10.1007/s11910-015-0557-x

42. Fredriksson L, Lawrence DA, Medcalf RL. tPA Modulation of the Blood-Brain Barrier: A Unifying Explanation for the Pleiotropic Effects of tPA in the CNS. *Semin Thromb Hemost.* 2017;43(2):154-168. https://doi.org/10.1055/s-0036-1586229

43. Dobrynina LA, Shabalina AA, Zabitova MR, et al. Tissue Plasminogen Activator and MRI Signs of Cerebral Small Vessel Disease. *Brain Sci.* 2019;9(10):266. https://doi.org/10.3390/brainsci9100266

44. Parathath SR, Parathath S, Tsirka SE. Nitric oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood-brain barrier in tPA-dependent excitotoxic injury in mice. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 2):339-349. https://doi.org/10.1242/jcs.02734

Поступила 13.05.2023
Received 13.05.2023
Принята к печати 30.05.2023
Accepted 30.05.2023