

На правах рукописи

Короткова Наталья Васильевна

**Селектины в функциональном ответе эндотелия
на нитрозативное повреждение**

1.5.4. Биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Рязань – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор **Калинин Роман Евгеньевич**

Официальные оппоненты:

Шумаев Константин Борисович, доктор биологических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», старший научный сотрудник лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии имени А.Н. Баха

Синицкий Антон Иванович, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой биохимии имени Р.И. Лифшица, ведущий научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории

Котова Юлия Александровна, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__»_____ 2025 г. в __ на заседании диссертационного совета 21.2.060.02, созданного на базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России по адресу: 390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, д. 34, корп. 2) и на сайте www.rzgmu.ru

Автореферат разослан «__»_____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Мжаванадзе Н.Д.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В настоящее время стремительно развиваются представления об эндотелии, в частности, о его адгезивной функции и молекулярных механизмах клеточных взаимодействий посредством молекул межклеточной адгезии.

Молекулы межклеточной адгезии эндотелия сосудистой стенки, тромбоцитов и лейкоцитов являются важными участниками васкулогенеза, развития и регенерации сосудистой системы с одной стороны, и участниками наиболее ранних этапов нарушения функции эндотелия с последующим развитием патологии – с другой (Golias C. et al., 2007).

Изучение функционирования молекул межклеточной адгезии является перспективным в понимании как физиологических процессов: гемостаза, воспалительного ответа, иммунного ответа, заживления ран, так и патологических: воспаления и метастазирования (Ludwig R.J. et al., 2007), ишемии и реперфузии (van der Laan A.M. et al., 2012), а также в понимании механизмов регуляции и коррекции последних (Smith C.W. et al., 2008).

Селектины являются трансмембранными гликопротеинами, высоко асимметричными сложными белками мозаичного строения (Ashwell G. et al., 1974). В семейство селектинов входит три представителя: Р-селектин (CD62P), Е-селектин (CD62E) и L-селектин (CD62L), несколько отличающиеся по структуре и паттернам экспрессии: так, Р-селектин экспрессируется эндотелиальными клетками и активированными тромбоцитами, Е-селектин активированными эндотелиоцитами; L-селектин всеми лейкоцитами, находящимися в циркулирующем клеточном пуле. Каждый состоит из одной полипептидной цепи, включающей пять функциональных доменов: С-концевого цитоплазматического; трансмембранного, удерживающего белок в клеточной мембране; домена, подобного эпидермальному фактору роста; домена, содержащего богатые цистеином гомологичные тандемные повторы (от 1 до 9); N-концевого, расположенного вне клетки, ответственного за распознавание углеводов (Tvaroška I. et al., 2020).

Фрагмент внеклеточного домена может подвергаться протеолитическому шеддингу, образуя растворимую форму селектинов (англ.: *soluble*: sP, sE, sL), которая выявляется в сыворотке крови и служит диагностическим маркером.

Одна из наиболее значимых функций селектинов связана с начальной стадией каскада адгезии лейкоцитов, в результате которой происходит их связывание с эндотелием, роллинг и дальнейшая экстравазация в ткани (McEver R.P. et al., 2015). Начальный этап каскада адгезии опосредуется специфическими нековалентными взаимодействиями между селектинами и их гликановыми лигандами (Bizik F. et al., 1996; Poppe L. et al., 1997; Barra P.A. et al., 2017). Было показано, что все три селектина распознают общий мотив: сиалированный и фукозилированный тетрасахарид Sialyl LewisX (sLeX) и его изомерную форму Sialyl Lewis A (sLeA) (Bowman K.G. et al., 2001), являющийся терминальным компонентом некоторых N- и O-гликанов.

Для осуществления сложного взаимодействия селектины связываются с универсальным, высокоаффинным лигандом, P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1, CD 162), в структуру которого входит вышеуказанный эпитоп для распознавания. PSGL-1 экспрессируется всеми нейтрофилами крови, моноцитами и лимфоцитами; для выполнения своих функций он предварительно подвергается специфическому гликозилированию (Goth C.K. et al., 2023). Учитывая их доказанное участие в процессах воспаления, тромбоза и метастазирования, ингибирование взаимодействия между селектинами и их лигандами может иметь потенциальные терапевтические приложения.

По мнению ряда современных исследователей, сердечно-сосудистые заболевания протекают на фоне эндотелиальной дисфункции, которая, как правило, сопровождается нитрозативным стрессом (НС, нитрозилирующий стресс, нитрозильный стресс) (Shaito A. et al., 2022). Оксид азота рассматривается, как сигнальная молекула в регуляции сердечно-сосудистой системы со времени присуждения Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro и F. Murad Нобелевской премии за это открытие. НС представляет собою совокупность биохимических реакций, в ходе которых NO и активные формы азота (АФА)

вызывают повреждение биомолекул – белков, липидов, углеводов и нуклеиновых кислот; в результате дисбаланса NO и активных форм кислорода (АФК) образуется токсичный продукт пероксинитрит, и, как следствие, происходит развитие патологии (Radi R. et al., 2018).

Пероксинитрит ингибирует ферменты дыхательной цепи, снижая уровень потребления кислорода клетками и приводя к митохондриальной дисфункции (Szabó C. et al., 2007). Отмечается снижение биодоступности оксида азота, увеличение концентрации его конечных метаболитов. Пероксинитрит, с одной стороны, вызывает повышенную восприимчивость эндотелия к адгезии нейтрофилов и тромбоцитов, агрегацию тромбоцитов и активацию нейтрофилов, а с другой – повышенное образование активных форм кислорода. Также было показано, что пероксинитрит играет важную роль в процессе активации протеинкиназы C. Повышение её активности связано с такими острыми и хроническими сосудистыми стрессами, как гипоксия, ишемия-реперфузия, механический стресс (рестеноз после ангиопластики) и атеросклероз (Das Evcimen N. et al., 2007).

Пероксинитрит может выполнять регулирующие функции в организме, модифицировать структуры биомолекул, вовлечённых в процессы клеточной сигнализации (Ferrer-Sueta G. et al., 2018). Появление пероксинитрита приводит к повышению образования АФК; и то, и другое может сопровождаться повреждением структуры селектинов, так как последние насчитывают в своей структуре до 65 остатков цистеина, чувствительных к окислению. В свою очередь, повреждение структуры селектинов может приводить к нарушению роллинга и трансмиграции лейкоцитов в ткани, и явиться триггером в развитии сосудистых заболеваний.

По результатам ряда исследований экспрессия селектинов, возможно, связана с системой оксида азота. Так, M. Hossain et al. показали, что введение метилового эфира NG-нитро-L-аргинина (L-NAME) повышает экспрессию P- и E-селектинов, но не влияет на адгезию нейтрофилов к клеткам HUVEC (Hossain M. et al., 2012). Тем не менее, роль нитрозилирующих токсичных метаболитов

оксида азота изучена недостаточно.

Таким образом, изучение роли семейства селектинов в процессе связывания лейкоцитов с клетками эндотелия у пациентов с заболеваниями сосудов в условиях нитрозативного стресса (НС) представляется на сегодняшний день актуальным направлением, имеющим важное биомедицинское значение.

Степень разработанности проблемы

С тех пор, как в 1980 году Robert F. Furchgott и John V. Zawadzki обнаружили способность изолированной артерии самостоятельно изменять свой мышечный тонус в ответ на ацетилхолин, и впервые высказали мнение о самостоятельной роли эндотелия, как регулятора тонуса сосудов (Furchgott R.F. et al., 1980) и по сей день эндотелий вызывает пристальное внимание учёных. Эндотелий и эндотелиальная дисфункция (ЭД) играют важную роль в патогенезе ряда системных заболеваний, в том числе, сердечно-сосудистых – атеросклероза сосудов нижних конечностей и коронарных сосудов (Henderson K.K. et al., 2004; Botts S.R. et al., 2021), дилатационной кардиомиопатии, острого венозного тромбоза (Леонченко С.В., 2020), хронических заболеваний вен (ХЗВ) (Ortega M.A. et al., 2021), лёгочной гипертензии (González-Tajuelo R. et al., 2020), сахарного диабета (Thorand B. et al., 2006).

Активно изучается и адгезивная функция эндотелия при патологии: с одной стороны, предметом изучения являются жизнеспособность эндотелиоцитов в экспериментальных условиях (Darland D.C. et al., 2003) и взаимодействия между эндотелиоцитами: поддержание целостности метаболически активного органа, и контроль за перемещением растворённых веществ между кровотоком и тканями (Lampugnani M.G. et al., 2010; Ягода А.В. и др., 2016). С другой стороны, изучаются взаимодействия между лейкоцитами и эндотелиоцитами; и движение лейкоцитов из кровеносного русла в ткани, в частности, в очаги инфекции и воспаления (Dahdah A. et al., 2022), то есть, процессы, в которых активное участие принимают селектины.

Изучение уровня селектинов у пациентов с патологией сосудов нижних конечностей в условиях НС представляется весьма интересным, учитывая то, что

данная патология протекает на фоне ЭД, а в организме постоянно синтезируются побочные продукты НС – пероксинитрит, а также эндогенные S-нитрозотиолы (Путинцева О.В. и др., 2018; Абаленихина Ю.В. и др., 2020, 2022).

Воздействие самого NO может быть как цитопротекторным, так и цитотоксическим; и каким будет его влияние, зависит от взаимодействия его метаболитов с компонентами окислительного стресса (ОС) и карбонильного стресса (Шумаев К.Б. и др., 2020, 2022). Поведение такой молекулы, как пероксинитрит, может также быть двояким и зависеть от величины его концентрации; то есть, он может выступать и в роли сигнальной молекулы, и обладать цитотоксическим эффектом (Абаленихина Ю.В., 2020; Ferrer-Sueta G. et al., 2018).

S-нитрозоглутатион представляет собою эндогенный нитрозотиол, синтезирующийся в организме и выполняющий роль переносчика и мягкого донатора NO (Сучкова О.Н. и др., 2024). Являясь редокс-модулирующим агентом метаболома NO, обеспечивает защиту сосудов, снижая уровень пероксинитрита, продукта избыточной активности синтаз оксида азота. Показано, что он может влиять на нейрональную синтазу оксида азота (nNOS, NOSI), ингибируя её путём снижения активности фосфорилирующей её протеинкиназы (Khan M. et al., 2015). В современной научной литературе есть работы, описывающие функционирование молекул клеточной адгезии в условиях ОС (Zhang J. et al., 2023), но практически отсутствуют данные об их связи с показателями НС и интермедиатов оксида азота.

На кафедре биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России проводится изучение окислительного и нитрозативного стресса, и, как проявление, повреждение белковых молекул (Арапова А.И., 2017; Кудлаева А.М., 2018; Фомина М.А., 2018). Был разработан патент по комплексной оценке содержания карбонильных производных белков, как продукта ОС, оценено их количество как у пациентов с различной патологией, так и в экспериментально моделированных условиях на животных (Фомина М.А. и др., 2014). На кафедре сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики

активно в течение продолжительного времени изучаются различные аспекты эндотелиальной дисфункции (Сучков И.А., 2014; Климентова Э.А., 2022; Мжаванадзе Н.Д., 2022).

Тем не менее, одно из важных звеньев функционирования эндотелия, а именно, адгезия клеток, характеризующаяся уровнем специфических молекул-селектинов, в условиях НС практически не изучалась.

Цель исследования

Изучить количественное содержание белков клеточной адгезии селектинов, их гликопротеинового лиганда PSGL-1, индуцибельной и эндотелиальной NO синтаз у пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей в зависимости от выраженности нитрозилирующего стресса; и в эксперименте *in vitro* при инкубации эндотелиоцитов и фракционированных лейкоцитов крови с пероксинитритом и S-нитрозоглутатионом.

Задачи исследования

1. Оценить и проанализировать уровень молекул межклеточной адгезии селектинов sP, sE, sL, их универсального гликопротеинового лиганда PSGL-1, индуцибельной и эндотелиальной NO-синтаз, а также концентрации показателей окислительного/нитрозилирующего стресса: стабильных метаболитов оксида азота (нитрита и нитрата), нитротирозина, битирозина, пероксинитрита и окислительно модифицированных белков в сыворотке крови пациентов с патологией сосудов нижних конечностей по сравнению со здоровыми донорами; оценить и проанализировать разницу в изучаемых показателях между пациентами с артериальной и венозной патологией.

2. Оценить и проанализировать уровень селектинов sP, sE, sL, их гликопротеинового лиганда PSGL-1, синтаз оксида азота (II) и показатели окислительного/нитрозилирующего стресса в сыворотке пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей в зависимости от стадии хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротической этиологии по классификации А.В. Покровского-Фонтейна.

3. Оценить и проанализировать уровень селектинов sP, sE, sL, их

гликопротеинового лиганда PSGL-1, синтаз оксида азота (II) и показатели окислительного/нитрозирующего стресса в сыворотке пациентов с артериальными тромбоэмболическими осложнениями в зависимости от наличия артериального тромба или артериальной тромбоэмболии.

4. Оценить и проанализировать уровень селектинов sP, sE, sL, их гликопротеинового лиганда PSGL-1, синтаз оксида азота (II) и показатели окислительного/нитрозирующего стресса в сыворотке пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей в зависимости от клинического класса ХЗВ по классификации CEAP.

5. Оценить и проанализировать уровень селектинов sP, sE, sL, их гликопротеинового лиганда PSGL-1, синтаз оксида азота (II) и показатели нитрозирующего стресса в сыворотке пациентов с острым венозным тромбозом в зависимости от места локализации тромба.

6. Проанализировать взаимосвязи между показателями адгезивной функции эндотелия и показателями системы оксида азота у пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей.

7. Провести оценку относительного количества селектинов P и E, iNOS и eNOS, метаболической активности и уровня биохимических показателей нитрозирующего стресса в лизатах клеток HUVEC, а также sP и sE селектинов в кондиционной среде при инкубации клеток с пероксинитритом *in vitro*.

8. Провести оценку относительного количества селектинов P и E, iNOS и eNOS, метаболической активности и уровня биохимических показателей нитрозирующего стресса в лизатах клеток HUVEC, а также sP и sE селектинов в кондиционной среде при инкубации с S-нитрозоглутатионом (GSNO) *in vitro*.

9. Провести оценку уровня селектина L и универсального гликопротеинового лиганда селектинов PSGL-1 при инкубации фракционированных лейкоцитов периферической крови с пероксинитритом и S-нитрозоглутатионом *in vitro*.

Научная новизна

Впервые в работе была проанализирована связь растворимой формы

молекул клеточной адгезии селектинов sP, sE, sL и их гликопротеинового лиганда PSGL-1 в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей – атеросклерозом, артериальным тромбозом, варикозным расширением вен и острым венозным тромбозом, с системой оксида азота (II) в зависимости от выраженности нитрозилирующего стресса.

Отмечено, что патология сосудов нижних конечностей сопровождается снижением концентрации молекул межклеточной адгезии селектинов sP, sL, sE, и повышением уровня универсального гликопротеинового лиганда PSGL-1, а также повышением в разной степени концентрации показателей окислительного/нитрозилирующего стресса: стабильных метаболитов оксида азота (II), нитротирозина, пероксинитрита и окислительно модифицированных белков в сыворотке крови.

В работе впервые отмечено, что степень выраженности нитрозилирующего стресса выше у пациентов с артериальной патологией, нежели с венозной. Отмечена разница в снижении уровня селектина sP, повышении уровня эндотелиальной NO синтазы, гликопротеинового лиганда PSGL-1 и нитротирозина, которые в сыворотке крови пациентов с артериальной патологией оказались более выражены.

В работе дана оценка связям между уровнем растворимого фрагмента белков клеточной адгезии sP, sE, sL, универсального для всех селектинов лиганда PSGL-1 в сыворотке крови и показателями нитрозилирующего стресса: метаболитами оксида азота (II), нитротирозином, битирозином, пероксинитритом. Проанализирована выраженность нитрозилирующего стресса в зависимости от клинических проявлений по принятым международным классификациям.

Подтверждена зависимость изменений абсолютного количества растворимых форм селектинов и лиганда PSGL-1 от показателей НС выявленными множественными статистически значимыми корреляционными связями между изучаемыми показателями. В многофакторном регрессионном анализе выявлено, что нитротирозин, iNOS, eNOS и метаболиты NO являются

ведущими факторами, влияющими на селектины и PSGL-1 у пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей.

В эксперименте по совместной инкубации первичной клеточной линии HUVEC с растворами пероксинитрита в различных концентрациях было продемонстрировано развитие нитрозилирующего стресса, что подтверждалось снижением активности митохондриальных дегидрогеназ, а также нарастанием продуктов нитрозилирующего стресса в лизатах клеток. Культивирование клеток в течение 30 минут с пероксинитритом в концентрации 10-500 мкМ приводило к снижению относительного количества селектина Р, в концентрации 500 мкМ к снижению относительного количества селектина Е; в концентрации 10 и 50 мкМ в течение 1 часа – к повышению относительного количества селектина Р и Е соответственно в лизатах клеток на фоне повышения маркеров нитрозилирующего стресса.

В эксперименте по совместной инкубации первичной клеточной линии HUVEC с растворами S-нитрозоглутатиона в различных концентрациях было продемонстрировано развитие нитрозилирующего стресса, что подтверждалось снижением активности митохондриальных дегидрогеназ, нарастанием продуктов нитрозилирующего стресса в лизатах клеток. Культивирование первичной линии HUVEC с GSNO в концентрации 10-50 мкМ в течение 3-х часов приводило к повышению относительного количества селектина Р, а в концентрациях 250-500 мкМ – к снижению относительного количества селектина Р; в концентрации 10, 100, 250 мкМ в течение 3-х часов и в концентрациях 10-500 мкМ в течение 24-х часов – к снижению относительного количества селектина Е в лизатах клеток, на фоне повышения маркеров нитрозилирующего стресса.

Впервые показано изменение абсолютного количества селектина L и общего для селектинов лиганда PSGL-1 в гомогенатах фракционированных лейкоцитов: моноядерных и полиморфноядерных, после их совместного культивирования с растворами пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона.

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследование носит преимущественно фундаментальный характер. Представленные в работе данные продемонстрировали разницу в концентрации растворимых форм sP, sE и sL-селектинов, универсального лиганда трех селектинов PSGL-1; и показателей нитрозилирующего стресса в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей по сравнению со здоровыми лицами, также была установлена разница в адгезивной функции эндотелия в зависимости от выраженности нитрозилирующего стресса у пациентов с атеросклерозом, артериальным тромбозом, варикозным расширением вен и острым венозным тромбозом. Исследование позволило расширить представления о роли селектинов в патологии сосудов нижних конечностей.

Данные, полученные в экспериментальных условиях *in vitro* позволили оценить влияние токсичного продукта оксида азота (II) пероксинитрита, а также влияние эндогенного донатора оксида азота (II) – S-нитрозоглутатиона на относительное содержание молекул клеточной адгезии селектинов P и E, а также индуцибельной и эндотелиальной NO-синтазы в лизатах первичной клеточной линии HUVEC и растворимых форм указанных селектинов в кондиционной среде при совместной инкубации клеток с указанными веществами в разных концентрациях и длительности экспозиции. Полученные *in vitro* результаты исследования позволяют сделать вывод о влиянии интермедиатов системы оксида азота: пероксинитрита и S – нитрозоглутатиона на абсолютное количество молекулы клеточной адгезии селектина L и общего лиганда селектинов PSGL-1 в гомогенатах фракционированных лейкоцитов: полиморфноядерной и моноядерной фракциях.

Полученные данные дополняют современные представления о влиянии нитрозилирующего стресса на адгезивную функцию эндотелия, выражающуюся в изменении относительного количества белков клеточной адгезии селектинов.

Методология и методы исследования

Исследование включает две части: 1) работу с клиническим материалом –

сывороткой крови от пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей;

2) экспериментальные исследования выполнены на первичной культуре эндотелиальных клеток вены пуповины человека (primary human umbilical vein endothelial cells, HUVEC), и фракционированных лейкоцитах периферической крови здоровых доноров: полиморфноядерной (ПМЯЛ) и моноядерной (МЯЛ).

Абсолютное количество селектинов, гликопротеинового лиганда Р-селектина-1, синтазы оксида азота II, синтазы оксида азота III в сыворотке крови пациентов проводили сэндвич-методом иммуноферментного анализа. Абсолютное количество нитротирозина (НТ, NT) оценивали методом конкурентного иммуноферментного анализа. Концентрацию стабильных метаболитов оксида азота (II) оценивали фотометрическим методом с использованием реактива Грисса в модификации В.А. Метельской. Определение интенсивности окислительной модификации белков (ОМБ) по степени флюоресценции битирозина проводили флюориметрическим методом. Оценка ОМБ проводилась спектрофотометрическим методом по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой, комплексная оценка ОМБ проводилась по патенту, разработанному на кафедре биологической химии РязГМУ. Оценка концентрации пероксинитрита проводилась спектрофотометрическим методом.

Получение HUVEC проводили с использованием методики, основанной на общепринятых лабораторных протоколах, согласно S.P. Crampton, адаптированных в лаборатории клеточных технологий ЦНИЛ РязГМУ, с применением оборудования: ламинарный бокс II класса защиты Mars 1200 ScanLaf (Дания), CO₂ инкубатор WS-180CS World Science (Корея). Оценку принадлежности культуры к клеточной линии HUVEC проводили методом иммуноцитохимии.

Визуализацию клеток осуществляли с применением методов инвертированной микроскопии с использованием инвертированного лабораторного микроскопа СКХ41 Olympus (США). Подсчет жизнеспособных клеток осуществляли методом автоматизированного подсчета на автоматизированном счетчике количества и жизнеспособности клеток Countless

(ThermoFisher, США).

Разделение лейкоцитов периферической крови на фракции производили методом изопикнического центрифугирования.

Моделирование условий НС проводили с использованием пероксинитрита, синтезируемого на кафедре биологической химии. Также в экспериментальных условиях в качестве донора NO использовали S-нитрозоглутатион. Проведение оценки цитотоксичности и влияния на метаболическую активность эндотелиоцитов пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона осуществляли с использованием МТТ-теста.

Определение относительного количества белков: Р-селектина, Е-селектина, синтазы оксида азота II (NOSII), синтазы оксида азота III (NOSIII) проводили методом вестерн-блот.

Положения, выносимые на защиту

1. Концентрация молекул межклеточной адгезии селектинов sP, sE, sL снижена, концентрация универсального гликопротеинового лиганда PSGL-1 повышена или имеет тенденцию к повышению, а также концентрация показателей окислительного/нитрозилирующего стресса: стойких метаболитов оксида азота, пероксинитрита и окислительно модифицированных белков повышена в сыворотке крови при патологии сосудов нижних конечностей по сравнению со здоровыми донорами; отмечается более выраженное повышение концентрации эндотелиальной NO синтазы, гликопротеинового лиганда PSGL-1 и нитротирозина, и более выраженное снижение концентрации sP-селектина в сыворотке крови пациентов с артериальной патологией по сравнению с венозной.

2. Снижение концентрации селектинов sE, sL, повышение концентрации PSGL-1, iNOS, метаболитов оксида азота в большей степени выражены у пациентов с III-IV стадиями, а снижение sP-селектина и повышение пероксинитрита – у пациентов с I-IIб стадиями хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротической этиологии по классификации А.В. Покровского-Фонтейна. Уровень iNOS в сыворотке крови пациентов с

атеросклерозом превышает таковой у пациентов с острым венозным тромбозом.

3. Снижение концентрации sP-селектина, повышение пероксинитрита более выражены у пациентов в подгруппе с артериальным тромбозом; повышение концентрации PSGL-1, iNOS, метаболитов оксида азота – у пациентов в подгруппе с артериальной тромбоэмболией. Отмечено повышение уровня нитротирозина в сыворотке крови пациентов с артериальным тромбозом по сравнению с пациентами с острым венозным тромбозом, уровня стабильных метаболитов оксида азота по сравнению с группами пациентов с атеросклерозом и варикозным расширением вен, повышение уровня PSGL-1 по сравнению с группой пациентов с артериальным тромбозом.

4. Снижение концентрации sL селектина, повышение уровня iNOS и пероксинитрита в сыворотке крови более выражены у пациентов с клиническим классом ХЗВ С1-С2 по классификации СЕАР. Снижение концентрации sP-селектина, повышение стабильных метаболитов оксида азота более выражены в группе пациентов с клиническим классом ХЗВ С3-С6. Отмечается повышение уровня PSGL-1 в сыворотке крови пациентов с ВБНК по сравнению с пациентами с острым венозным тромбозом.

5. Концентрация sP- и sL-селектинов, и концентрация нитротирозина наиболее снижены у пациентов в подгруппе с острым венозным тромбозом дистальной локализации, концентрация метаболитов оксида азота наиболее повышена у пациентов с острым венозным тромбозом проксимальной локализации.

6. В качестве ведущих факторов, влияющих на уровень селектинов и PSGL-1 в сыворотке крови пациентов, выступают нитротирозин, индуцибельная и эндотелиальная синтаза оксида азота, метаболиты оксида азота.

7. В экспериментальных условиях на первичной клеточной линии HUVEC показано, что пероксинитрит в низких концентрациях является сигнальной молекулой для селектинов, в высокой оказывает токсическое действие.

8. В экспериментальных условиях на первичной клеточной линии HUVEC показано, что S-нитрозоглутатион в концентрации 10-50 мкМ в течение 3-х

часов, в концентрации 10 мкМ в течение 24-х и 72-х часов приводит к повышению относительного количества селектина Р, в концентрации 250-500 мкМ в течение 3-х часов – к снижению относительного количества селектина Р; в концентрации 10, 100, 250 мкМ в течение 3-х часов и в концентрации 10-500 мкМ в течение 24-х часов – к снижению относительного количества селектина Е в лизатах клеток.

9. Абсолютное количество селектина L снижается под действием пероксинитрита и повышается под действием GSNO; абсолютное количество PSGL-1 повышается под действием GSNO, снижается под действием пероксинитрита в гомогенатах обеих фракций лейкоцитов периферической крови *in vitro*.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности полученных результатов исследования обусловлена достаточным количеством пациентов, включенных в исследование, достаточным количеством и корректностью проведения экспериментальных наблюдений, адекватным применением современных методов биохимического анализа, используемых методов статистического анализа и обоснованием полученных результатов и выводов; а также применением в *in vitro* исследованиях на клеточных культурах оборудования мирового уровня с использованием реактивов высокого качества, в том числе, от ведущих производителей.

Основные результаты диссертационного исследования представлены, обсуждены и опубликованы на научно-практической конференции (69-й годичной) с международным участием, посвященной 30-летию Государственной независимости Республики Таджикистан и «Годам развития села, туризма и народных ремёсел (2019-2021)» (Душанбе, 17 ноября 2021 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 26-27 января 2022 г.); UIP XIX World Congress of Phlebology (Istanbul, Turkey, 12-16 September 2022); VIII Всероссийской научной конференции молодых

специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста», Рязань, 21 октября 2022 года; Международной научно-практической конференции «Педиатрия и фармация XXI века: проблемы и их решения» (Самарканд, 18-19 ноября 2022 г.); 23-rd Annual Meeting of the European Venous Forum in collaboration with Germany society of Phlebology and Lymphology (Berlin, Germany, 22-24 June 2023); Международной конференции NT+M&Ec`2020 «Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии=Novel Technologies in Medicine, Biology, Pharmacology and Ecology» (Крым, Ялта-Гурзуф, 28 мая-7 июня 2023 г.); XVI international scientific and practical conference «Ecology. Radiation. Health» named after B.A. Atchabarov dedicated to the 70-th anniversary of Semey medical university, NCJSC (Semey city, 28-29th August, 2023); 4-й Международной конференции «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине», посвященной 135-летию со дня рождения профессора В.В. Лебединского (Санкт-Петербург, 7-8 декабря 2023 г.); IX Всероссийской научной конференции с международным участием молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 19-20 октября 2023 г.); Российской научно-практической конференции «Зубаировские чтения: новое в коагулологии» «Медицинская биохимия: достижения и перспективы», посвященной 160-летию кафедры биохимии Казанского ГМУ (Казань, 10-11 ноября 2023 г.); XXXI Международной конференции «Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии=Novel Technologies in Medicine, Biology, Pharmacology and EcologyNT+ME `2024» (Крым, Ялта-Гурзуф, 2-9 июня 2024 г.); Всероссийской конференции с международным участием «Биохимия человека 2024» (Москва, 17-19 октября 2024 г.); X Всероссийской научной конференции с международным участием молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста», посвященной 175-летию со дня рождения академика И.П. Павлова и 120-летию со дня получения им Нобелевской премии (Рязань, 24-25 октября 2024 г.);

Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию РязГМУ на Рязанской земле «Биология XXI века в свете глобальных вызовов» (Рязань, 24 апреля 2025 г.), межкафедральной апробации в ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (Рязань, 25 июня 2025 г.)

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты представленного исследования успешно внедрены в учебный процесс при обучении студентов и клинических ординаторов на кафедрах биологической химии и сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики, а также в работу центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора

Непосредственное участие автора заключалось в формировании идеи, разработке дизайна исследования, анализе литературных источников по изучаемой теме, формулировании целей и задач, выполнении экспериментальной части исследования, статистическом анализе полученных данных, интерпретации полученных результатов, формулировании положений и выводов, написании научных статей по исследуемой тематике. Все изложенные в диссертации результаты получены автором в процессе самостоятельно проведенных исследований. В целом личный вклад автора в исследование составляет около 90%. Соавторы исследований указаны в публикациях.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 30 печатных работ, полно отражающих основные положения диссертации, в том числе, 12 – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, из них 8 – в журналах категории K1-K2, 1 – в издании, индексируемом в международной цитатно-аналитической базе данных Scopus. По результатам работы внедрено 4 рационализаторских предложения.

Структура и объем диссертации

Диссертация построена по классическому типу и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, двух

глав с результатами исследования и их обсуждением, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Диссертационная работа изложена на 266 страницах машинописного текста, иллюстрирована 93 рисунками и 33 таблицами. Список литературы включает 350 источников, из них 82 отечественных, 268 зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Научное исследование одобрено Локальным этическим комитетом (протокол № 9 от 15.04.2020) и выполнено на базе кафедры биологической химии, кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики и лаборатории клеточных технологий центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Объектом исследования в клиническом блоке явились пациенты с патологией периферических сосудов. Контроль составили здоровые доноры – Группа 1 (n=30). Все пациенты были разделены на четыре группы: пациенты с атеросклерозом артерий нижних конечностей составили 2 Группу (Группа 2, n=31), третью группу составили пациенты с артериальным тромбозом (или артериальными тромбозэмболическими осложнениями: артериальный тромбоз или артериальная тромбоземболия), (Группа 3, n=28). Четвертую и пятую группу составили пациенты с патологией вен нижних конечностей – варикозным расширением вен (варикозная болезнь нижних конечностей, ВБНК) (Группа 4, n=30) и острым венозным тромбозом (Группа 5, n=30) соответственно. Все пациенты проходили стационарное лечение в клиниках г. Рязани в 2020-2023 гг.

Критериями включения в исследование для всех групп пациентов явилось: подписанное информированное согласие, верифицированный диагноз. Критериями невключения в исследование для всех групп явилась декомпенсированная соматическая патология, наличие травм и продолжительной иммобилизации, а также наличие злокачественных новообразований, беременности, лактации и невозможность подписать

информированное согласие. Критериями исключения явился летальный исход.

Экспериментальное исследование выполнено на первичной культуре эндотелиальных клеток вены пуповины человека (primary human umbilical vein endothelial cells, HUVEC), и фракционированных лейкоцитах периферической крови здоровых доноров.

Первичная культура эндотелиальных клеток вены пуповины человека, 3 пассажа, выделялась и культивировалась в лаборатории клеточных технологий ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Биоматериал получали после физиологических родов или операции кесарева сечения; все роженицы подписывали информированное согласие. Доставка биоматериала осуществлялась в транспортной среде, включающей культуральную питательную среду α -МЕМ (кат. №С230п, ООО НПП «Панэко», Россия) и 1% раствор пенициллина-стрептомицина (кат. № А073п, ООО НПП «Панэко», Россия).

Часть эксперимента выполнена на лейкоцитах периферической крови, полученной от здоровых добровольцев, подписавших информированное согласие. Лейкоциты разделяли на две фракции: гранулоциты, или полиморфноядерные лейкоциты (ПМЯЛ) и агранулоциты, или моноядерные лейкоциты (МЯЛ).

Статистический анализ

Для проведения статистического анализа использовалась программа IBM SPSS 26 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc. Chicago, IL, United States). Качественные показатели представлялись абсолютными числами (n) и процентами (%), для их анализа применялись критерий Хи-квадрат Пирсона и точный критерий Фишера. Распределение количественных показателей оценивалось с применением критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. При нормальном распределении средние значения представлялись средней арифметической со средним квадратическим отклонением, для сравнения несвязанных совокупностей применялся t-критерий Стьюдента с оценкой равенства дисперсий по критерию Ливиня, связанных – t-критерий Стьюдента. При распределении, отличном от нормального, средние значения

представлялись медианой и межквартильным интервалом (Me, Q₁-Q₃), для сравнения несвязанных совокупностей применялся критерий Манна-Уитни, связанных – Уилкоксона. При множественном сравнении использовался дисперсионный анализ, в том числе критерии Краскелла-Уоллеса и Фридмана с дальнейшими апостериорными попарными сравнениями с поправкой Бонферрони. Для анализа взаимосвязи признаков использовали коэффициент корреляции Пирсона (r) для выборки с нормальным распределением, коэффициент Спирмена для выборки с ненормальным распределением. С целью установления основного и второстепенных факторов НС, влияющих на селектины, проводился многофакторный линейный регрессионный анализ, и однофакторный регрессионный анализ для факторов, которые дали статистически значимые корреляции с зависимыми переменными (y). При оценке данных, полученных в эксперименте, использовали программу Graph Pad Prism 9. Статистическую значимость различий оценивали дисперсионным анализом (ANOVA), множественные сравнения с контролем выполняли с помощью теста Даннетта. Данные в таблицах и на графиках представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения (M±SD). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение показателей адгезивной функции эндотелия и степени выраженности НС у пациентов с сосудистой патологией нижних конечностей: общие тенденции

В начале исследования мы сконцентрировали внимание на различиях между изучаемыми показателями адгезивной функции эндотелия (селектинами и универсальным лигандом) и показателями выраженности нитрозильного стресса у здоровых людей (Группа 1, Контроль) и пациентов с патологией артерий и вен нижних конечностей, объединённых в одну группу (Группа 2, Патология) (Таблица 1).

Таблица 1 – Уровень изучаемых показателей в сыворотке крови при патологии сосудов нижних конечностей (совместно артериальной и венозной), по сравнению с контрольной группой, Ме [Q1;Q3]

Показатель	Группа	Медиана	Мин	Макс	Q1	Q3	Меж кварт. размах
Селектин sP, нг/мл	Контроль	131,18	6,85	373,25	110,70	164,32	53,62
	Патология	40,19* (p=0,001)	0,37	438,0	20,06	82,30	62,24
Селектин sE, нг/мл	Контроль	9,17	4,11	22,27	7,07	14,44	7,37
	Патология	7,96* (p=0,043)	1,5	32,59	5,46	11,13	5,67
Селектин sL, нг/мл	Контроль	3,57	0,85	6,58	2,35	4,51	2,16
	Патология	2,74* (p=0,006)	0,19	7,77	0,94	3,60	2,66
PSGL-1, нг/мл	Контроль	4,13	0,73	14,52	1,33	5,62	4,29
	Патология	5,43* (p=0,027)	0,29	32,07	1,80	10,31	8,51
iNOS, нг/мл	Контроль	0,19	0,01	5,54	0,11	0,28	0,17
	Патология	0,24 (p=0,16)	0,01	16,28	0,11	0,69	0,58
eNOS, нг/мл	Контроль	0,12	0,01	0,34	0,08	0,13	0,05
	Патология	0,13 (p=0,21)	0,01	0,7	0,09	0,17	0,08
Метаболиты оксида азота, мкмоль/л	Контроль	43,15	9,97	127,1	33,5	51,12	17,62
	Патология	103,94* (p=0,001)	15,75	395,49	66,59	156,15	89,56
Нитротирозин, нг/мл	Контроль	350,9	259,5	589,1	320,0	560,80	240,80
	Патология	424,20 (p=0,18)	183,8	611,1	318,05	582,10	264,05
Битирозин, ед. флюоресценции/ мл сыворотки	Контроль	19,46	0,69	41,9	14,10	26,00	11,9
	Патология	15,2 (p=0,51)	0,5	178,7	4,80	35,65	30,85
Пероксинитрит, ммоль/л	Контроль	6,48	0,80	32,23	4,38	11,79	7,41
	Патология	24,05* (p=0,014)	1,85	46,26	8,33	27,75	19,42
ОМБ, ед.опт. пл./мл сыворотки	Контроль	10,18	2,00	24,32	6,51	13,24	6,73
	Патология	16,35* (p<0,001)	7,75	284,79	10,32	38,30	27,98
Примечание –*– статистически значимые отличия от контроля (p≤0,05)							

Уровень всех трёх селектинов был выше у пациентов с патологией по сравнению с контролем. Уровень гликопротеинового лиганда селектинов PSGL-1 демонстрировал повышение в сыворотке крови у пациентов с патологией сосудов нижних конечностей, по сравнению с контролем в 1,3 раза (p<0,027).

Уровень индуцибельной и эндотелиальной NO-синтаз имел тенденцию к повышению в сыворотке крови у пациентов с патологией по сравнению со здоровыми людьми, но данные отличия не явились статистически значимыми ($p=0,151$) и ($p=0,209$) соответственно.

Из выбранных нами показателей нитрозативного стресса статистически значимо в двух исследуемых группах отличались метаболиты оксида азота, их концентрация в сыворотке крови пациентов превышала таковую у здоровых доноров ($p=0,001$). При этом уровень нитротирозина также имел тенденцию к повышению у больных по сравнению со здоровыми ($p=0,181$), а уровень битирозина, напротив, был ниже у пациентов, чем в контрольной группе ($p=0,512$). Далее был проведен сравнительный анализ изучаемых показателей у пациентов с артериальной и венозной патологией.

Таким образом, на втором этапе исследования пациенты с патологией были разделены на две большие группы и проведен сравнительный анализ с контролем (Группа 1, Контрольная группа). Первая из групп с патологией включала заболевания артерий: атеросклероз и сформировавшиеся на его фоне артериальные тромбоэмболические осложнения, (Группа 2, Артериальная патология). Вторая включала патологию вен – варикозное расширение вен нижних конечностей и острый венозный тромбоз (Группа 3, Венозная патология) (Таблица 2).

Изучаемые молекулы межклеточной адгезии участвуют в связывании лейкоцитов с эндотелиоцитами именно на первом этапе каскада адгезии.

Было отмечено, что концентрация изучаемых селектинов была ниже при артериальной и венозной патологии нижних конечностей по сравнению со здоровыми донорами, но заболевания артерий демонстрировали более выраженные различия.

Селектины sP и sE снижались по сравнению с контролем в большей степени. Селектин sL был ниже у пациентов с венозной патологией. Вполне возможно, это объясняется фактом диапедеза лейкоцитов из сосудистого русла именно из капилляров, вен и мелких вен.

Таблица 2 – Уровень изучаемых показателей в сыворотке крови при артериальной и венозной патологии (отдельно), по сравнению с контрольной группой и между собой, Ме [Q1;Q3]

Показатель	Группа	Медиана	Мин	Макс	Q1	Q3	Меж-кварт. размах
Селектин sP, нг/мл	Группа 1	131,18	6,85	373,25	110,70	164,32	53,62
	Группа 2	33,20* (p=0,001)	0,37	438,0	13,05	65,30	51,8
	Группа 3	51,30*,** (p=0,001) (p=0,05)	0,4	254,5	28,12	104,93	76,73
Селектин sE, нг/мл	Группа 1	9,17	4,11	22,27	7,07	14,44	7,37
	Группа 2	7,09* (p=0,05)	1,5	32,59	4,54	10,89	6,35
	Группа 3	8,13 (p=0,079)	2,45	30,1	5,61	11,67	6,06
Селектин sL, нг/мл	Группа 1	3,57	0,85	6,58	2,35	4,51	2,16
	Группа 2	2,77 (p=0,077)	0,51	5,31	1,4	3,54	2,14
	Группа 3	2,53 (p=0,18)	0,19	7,77	0,90	3,79	2,89
PSGL-1, нг/мл	Группа 1	4,13	0,73	14,52	1,33	5,62	4,29
	Группа 2	8,53* (p=0,003)	0,29	32,07	2,03	14,28	12,25
	Группа 3	4,44** (p=0,004)	0,76	16,46	1,47	6,95	5,48
iNOS, нг/мл	Группа 1	0,19	0,01	5,54	0,11	0,28	0,17
	Группа 2	0,31 (p=0,14)	0,02	16,28	0,11	1,13	1,03
	Группа 3	0,19 (p=0,14)	0,01	10,31	0,11	0,58	0,47
eNOS, нг/мл	Группа 1	0,12	0,01	0,34	0,08	0,13	0,05
	Группа 2	0,16 (p=0,11)	0,02	0,7	0,10	0,18	0,08
	Группа 3	0,12** (p=0,05)	0,01	0,19	0,08	0,16	0,08
Метаболиты оксида азота, мкмоль/л	Группа 1	43,15	9,97	127,1	33,50	51,12	17,62
	Группа 2	115,9* (p=0,001)	15,75	395,49	64,9	165,50	100,6
	Группа 3	99,13* (p=0,001)	19,20	244,9	68,32	138,60	70,28
Нитротирозин, нг/мл	Группа 1	350,9	259,50	589,10	320,00	560,80	240,8
	Группа 2	563,5 (p=0,064)	192,80	611,10	356,50	589,40	232,9
	Группа 3	374,20** (p=0,026)	183,8	609,00	293,40	579,60	286,2

Продолжение Таблицы 2

Битирозин, ед. флюоресценции/мл сыворотки	Группа 1	19,46	0,96	41,9	14,1	26,00	11,90
	Группа 2	15,2 (p=0,61)	2,5	178,70	6,38	35,65	29,7
	Группа 3	15,3 (p=0,61)	0,5	164,2	4,26	35,85	31,59
Пероксинитрит , ммоль/л	Группа 1	6,48	0,80	32,23	4,38	11,79	7,41
	Группа 2	24,00* (p=0,035)	1,85	46,26	8,33	27,75	19,42
	Группа 3	29,3* (p=0,001)	2,78	44,10	17,27	33,61	16,34
ОМБ, ед.опт пл.	Группа 1	10,18	2,00	24,32	6,51	13,24	6,73
	Группа 2	32,03* (p=0,002)	7,75	284,79	12,23	40,29	28,06
	Группа 3	22,36* (p=0,004)	5,00	109,92	8,98	30,87	21,89
Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы (p≤0,05); **– статистически значимые отличия Группы 2 от Группы 3 (p≤0,05) Группа 1 – контрольная группа Группа 2 – пациенты с артериальной патологией Группа 3 – пациенты с венозной патологией							

Уровень универсального лиганда селектинов PSGL-1 в большей степени повышался при артериальной патологии.

Также сыворотка крови пациентов с артериальной патологией содержала более высокие уровни NO-синтазы, нежели сыворотка здоровых людей. Это отличие касалось обеих NO-синтаз, уровень индуцибельной NO-синтазы был выше при патологии артерий в 1,6 раза, эндотелиальной NO-синтазы в 1,3 раза.

В нашем исследовании уровень ферментов синтеза оксида азота между патологиями также отличался: артериальная патология демонстрировала более высокий уровень индуцибельной NO-синтазы, практически в 2 раза, но не было отмечено статистической значимости. Венозная патология имела такую же тенденцию для данного фермента, но степень изменения составила 1,6 раза. В отличие от него уровень эндотелиальной синтазы оксида азота не сопровождался изменением.

Однако, была обнаружена статистически значимая разница между уровнем эндотелиальной NO-синтазы между пациентами с артериальной и венозной патологией: при артериальной он был выше.

Изучение показателей адгезивной функции эндотелия и степени выраженности нитрозативного стресса в зависимости от типа сосудистой патологии.

Оценка уровня селектинов sP, sE, sL

На следующем этапе своего исследования мы сосредоточили внимание на изучении молекул адгезии и показателей системы оксида азота (II) между нозологиями (Рисунок 1).

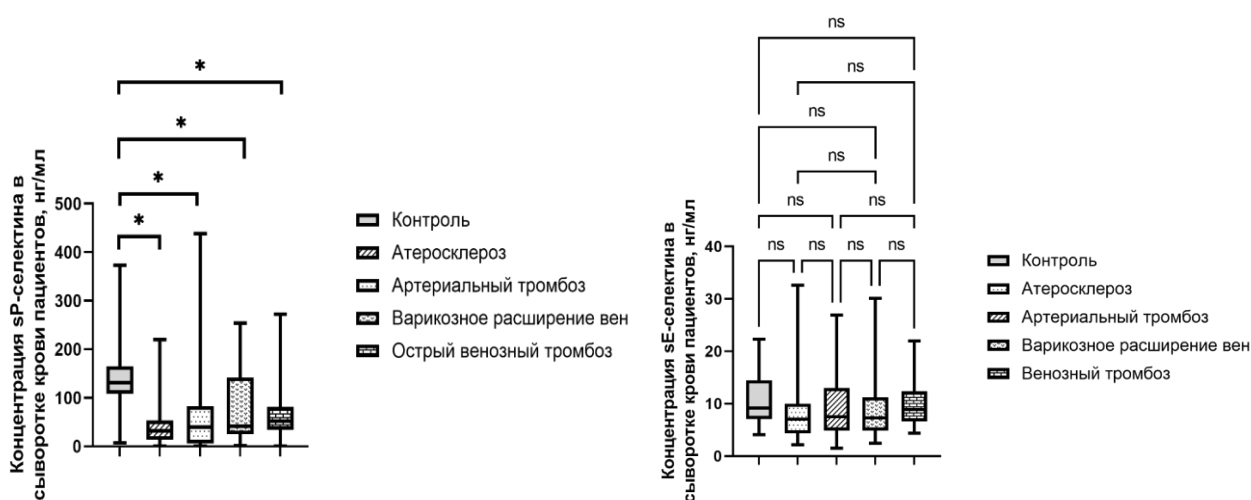


Рисунок 1 – Оценка уровня sP-селектина и sE-селектина в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, нг/мл

Примечание – * – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$

Статистически значимо sP снижался у пациентов в группах с атеросклерозом ($p=0,001$), артериальным тромбозом ($p=0,001$), варикозным расширением вен ($p=0,005$), и острым венозным тромбозом ($p=0,002$).

При оценке sE-селектина также были получены сведения о его снижении в сыворотке крови пациентов всех изучаемых нами групп сравнению со здоровыми лицами. Но данные отличия не продемонстрировали статистической значимости.

Уровень третьего участника изучаемого семейства адгезионных молекул sL-селектина также обнаруживал однонаправленную тенденцию, при этом, две патологии – атеросклероз артерий нижних конечностей ($p=0,033$) и варикозное расширение вен нижних конечностей ($p=0,011$) демонстрировали статистически значимые отличия (Рисунок 2) по сравнению со здоровыми донорами.

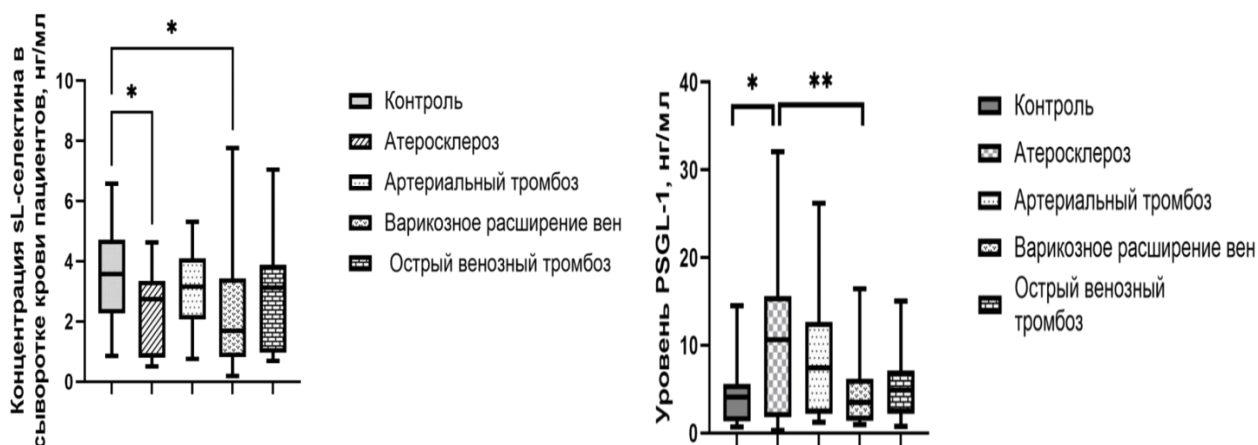


Рисунок 2 – Оценка уровня sL-селектина и PSGL-1 в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, Ме [Q1;Q3], нг/мл
Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$

При оценке уровня универсального гликопротеинового лиганда селектинов PSGL-1 мы отметили его более высокие значения у пациентов с изучаемой патологией по сравнению с контролем. Статистически значимыми они оказались у пациентов с атеросклерозом ($p=0,014$). Кроме того, данный показатель был статистически значимо выше у пациентов с атеросклерозом, по сравнению с пациентами с варикозным расширением вен нижних конечностей ($p=0,047$).

Оценка уровня индуцибельной и эндотелиальной синтазы оксида азота (II)

Индукцибельная NO-синтаза выявила повышение своего уровня в сыворотке крови пациентов с атеросклерозом практически в 5,9 раза ($p=0,17$) и с варикозным расширением вен в 2,32 раза ($p=0,11$). При этом, у пациентов с острым венозным тромбозом её уровень был несколько ниже, чем в контрольной группе (Рисунок 3).

Эндотелиальная NO-синтаза при сосудистой патологии нижних конечностей не демонстрировала статистически значимых отличий как по сравнению с контролем, так и между выбранными для настоящего исследования нозологиями ($p=0,103$).

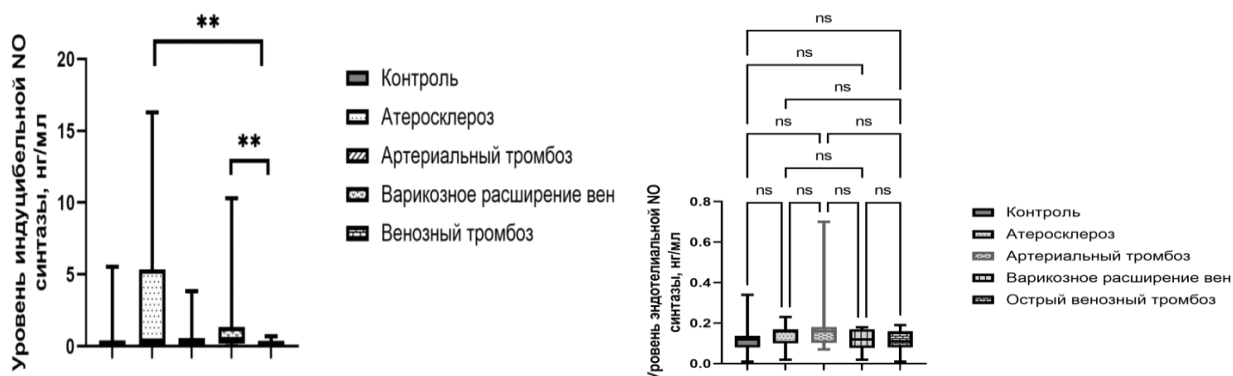


Рисунок 3 – Оценка уровня индуцибельной и эндотелиальной NO-синтазы в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, Me [Q1;Q3], нг/мл

Примечание –** – статистически значимые отличия между группами, $p \leq 0,05$

Анализ степени выраженности нитрозативного/оксидативного стресса у пациентов с сосудистыми заболеваниями

Первым из показателей НС мы определили стойкие метаболиты оксида азота. По данным нашего исследования, он явился наиболее чувствительным маркером данного состояния. Он повышался статистически значимо в сыворотке крови всех групп пациентов (Рисунок 4): в группе с атеросклерозом ($p=0,002$), с артериальным тромбозом ($p=0,001$), с варикозным расширением вен ($p=0,001$), и с острым венозным тромбозом ($p=0,001$).

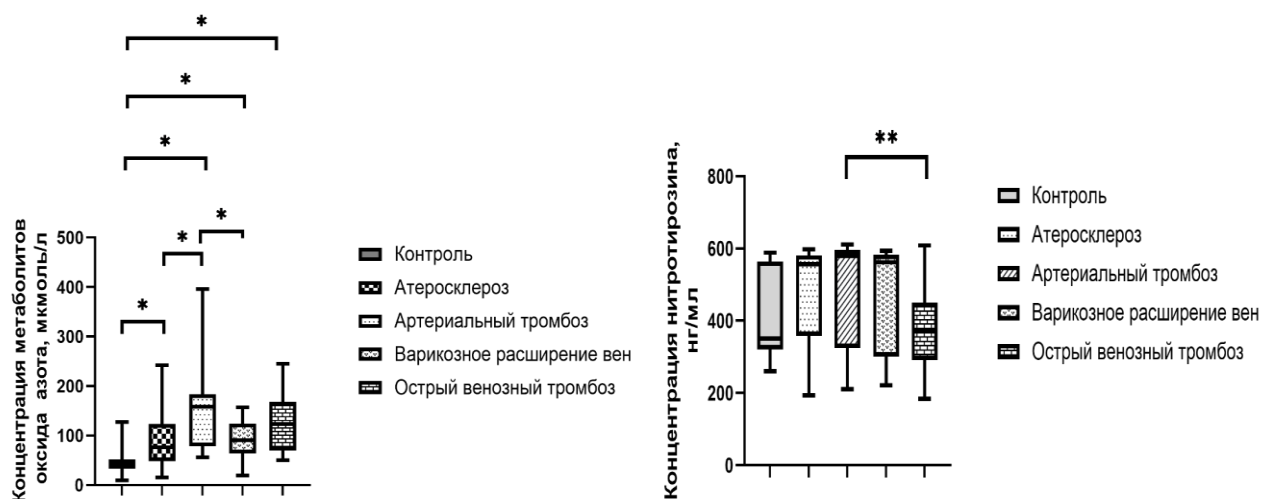


Рисунок 4 – Оценка уровня стабильных метаболитов оксида азота (слева) и нитротирозина (справа) в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, Me [Q1;Q3], мкмоль/л

Примечание –* – статистически значимые отличия, $p \leq 0,05$; ** - статистически значимые отличия между группами, $p \leq 0,05$

Мы отметили, что нитротирозин при изучаемых патологиях имел тенденцию к повышению у пациентов с атеросклерозом, артериальными тромбоэмболическими осложнениями, варикозным расширением вен по сравнению с контролем. Была отмечена статистически значимая разница в этом показателе между пациентами с артериальными тромбоэмболическими осложнениями и пациентами с острым венозным тромбозом ($p=0,015$).

Другой показатель ОС/НС – битирозин демонстрировал снижение концентрации в сыворотке крови пациентов по сравнению со здоровыми донорами, максимально у пациентов с атеросклерозом, но мы не отметили статистической разницы между нозологиями и контролем, так же, как и между патологией (Рисунок 5). Следующий показатель НС – пероксинитрит также продемонстрировал повышение, статистически значимое в группах пациентов с артериальными тромбоэмболическими осложнениями ($p=0,006$), варикозным расширением вен ($p=0,001$) и острым венозным тромбозом ($p=0,001$) (Рисунок 5).

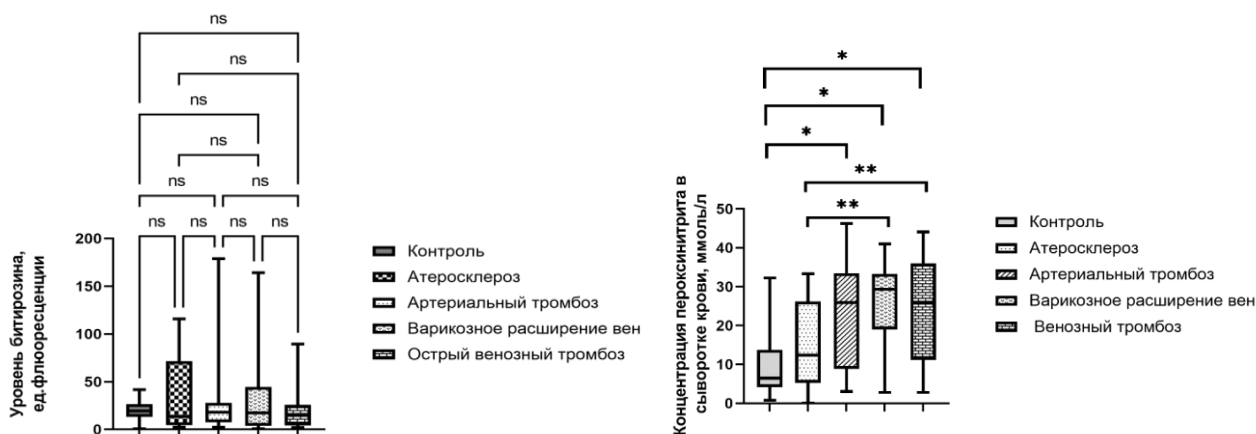


Рисунок 5 – Оценка уровня битирозина и пероксинитрита в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, Ме [Q1;Q3], ед. флюоресценции

Примечание – ^{ns} – статистически не значимые отличия, $p>0,05$

Кроме того, статистически значимыми оказались и различия между пациентами с атеросклерозом и варикозным расширением вен ($p=0,01$), атеросклерозом и острым венозным тромбозом ($p=0,04$).

Суммарная оценка спонтанной окислительной модификации белков по общей площади под кривой в сыворотке крови пациентов

Далее было проанализировано изменение показателя спонтанной

окислительной модификации белков, как маркера окислительного повреждения биомолекул (Таблицы 3-6).

Таблица 3 – Комплексная оценка спонтанной окислительной модификации белков в сыворотке крови пациентов с атеросклерозом, Ме [Q1;Q3], ед.опт.плотности/г белка

Группы	САДНФГн	САДНФГо	СКДНФГн	СКДНФГо	S общ.
Контроль	8,46 [5,11; 13,2]	1,65 [0,65; 3,27]	2,91 [1,19; 3,53]	0,37 [0,12; 0,54]	15,7 [9,03; 18,90]
Атеросклероз	16,24 [5,40;27,48] (p=0,27)	2,95 [1,68;3,51] (p>0,1)	2,33 [1,43;3,51] (p>0,1)	0,28* [0,24;0,77] (p=0,04)	23,37* [10,71;38,30] (p=0,049)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контроля, p≤0,05

Таблица 4 – Комплексная оценка спонтанной окислительной модификации белков в сыворотке крови пациентов с артериальным тромбозом, Ме [Q1;Q3], ед.опт.плотности/г белка

Группы	САДНФГн	САДНФГо	СКДНФГн	СКДНФГо	S общ.
Контроль	8,46 [5,11; 13,2]	1,65 [0,65; 3,27]	2,91 [1,19; 3,53]	0,37 [0,12; 0,54]	15,7 [9,03; 18,90]
Артериальный тромбоз	28,3 [19,21;44,67] (p=0,046)	3,83 [2,45;6,07] (p=0,08)	4,29* [3,27;4,69] (p=0,049)	0,59 [0,29;1,19] (p=0,32)	36,2* [28,22;55,55] (p=0,01)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контроля, p≤0,05

Таблица 5 – Комплексная оценка спонтанной окислительной модификации белков в сыворотке крови пациентов с варикозным расширением вен, Ме [Q1;Q3], ед.опт.плотности/г белка

Группы	САДНФГн	САДНФГо	СКДНФГн	СКДНФГо	S общ.
Контроль	8,46 [5,11; 13,2]	1,65 [0,65; 3,27]	2,91 [1,19; 3,53]	0,37 [0,12; 0,54]	15,7 [9,03; 18,90]
Варикозное расширение вен	19,18* [12,08;21,68] (p=0,049)	2,22 [0,79;3,43] (p=0,7)	1,8 [0,71;4,95] (p=0,9)	0,31 [0,23;0,63] (p=0,7)	22,33* [15,88;29,95] (p=0,049)

Примечание—*–статистически значимые отличия от контроля, p≤0,05

Таблица 6 – Комплексная оценка спонтанной окислительной модификации белков в сыворотке крови пациентов с острым венозным тромбозом, Ме [Q1;Q3], ед.опт.плотности/г белка

Группы	САДНФГн	САДНФГо	СКДНФГн	СКДНФГо	S общ.
Контроль	8,46 [5,11; 13,2]	1,65 [0,65; 3,27]	2,91 [1,19; 3,53]	0,37 [0,12; 0,54]	15,7 [9,03; 18,90]
Острый венозный тромбоз	16,19 [9,79;23,46] (p=0,13)	1,18 [0,69;1,97] (p=0,7)	1,67 [1,09;1,99] (p=0,32)	0,25 [0,19;0,37] (p=0,8)	20,18 [14,76;26,42] (p=0,23)

Примечание—*–статистически значимые отличия от контроля, p≤0,05

Таким образом, при анализе суммарного содержания ОМБ в плазме крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, было отмечено повышение суммы ОМБ, наиболее выражено при патологии артерий: преимущественно – при артериальном тромбозе, и при атеросклерозе. При всей изучаемой нами патологии, максимально повышающейся по сравнению с контрольной группой, явилась фракция первичного повреждения белков АДНФГ, а вторичные маркеры ОС – КДНФГ демонстрировали тенденцию к снижению при всех изучаемых патологиях, за исключением острого артериального тромбоза.

Подводя итог, можно отметить, что одним из факторов снижения селектинов в сыворотке крови у пациентов с патологией сосудов нижних конечностей может явиться процесс окислительной модификации белков, вследствие которого белки теряют свою нативную структуру, свойства и прекращают выполнять свои функции.

При проведении корреляционного анализа была подтверждена зависимость изменений абсолютного количества растворимых форм селектинов и их лиганда PSGL-1 в сыворотке крови пациентов от показателей НС множественными статистически значимыми корреляционными связями между изучаемыми признаками. Так, были выявлены корреляции средней силы между:

-sL-селектином и НТ $r=0,653$ ($p=0,000$), PSGL-1 и НТ $r=0,618$ ($p=0,000$), sE-селектином и iNOS $r=0,522$ ($p=0,000$), sE и битиразином $r= -0,49$ ($p=0,006$) у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей;

-sE-селектином и НТ $r= -0,425$ ($p=0,024$), sL-селектином и НТ $r=0,446$ ($p=0,029$) у пациентов с артериальным тромбозом; sE-селектином и eNOS $r= -0,405$ ($p=0,026$), sP-селектином и НТ $r=0,611$ ($p=0,000$) у пациентов с варикозным расширением вен;

-sE-селектином и eNOS $r=0,41$ ($p=0,024$) у пациентов с острым венозным тромбозом.

По результатам многофакторного регрессионного анализа в клиническом исследовании был выявлен ряд факторов, оказывающих влияние на селектины и их лиганд: это нитротирозин, iNOS, eNOS и стойкие метаболиты оксида азота. Нитротирозин выступил в качестве ведущего фактора при всех патологиях, кроме острого венозного тромбоза и для всех изучаемых нами зависимых

переменных. Так, для селектина Е ведущими явились нитротирозин и синтазы оксида азота, для селектина L нитротирозин и метаболиты оксида азота, для селектина Р и PSGL-1 нитротирозин. Таким образом было показано влияние нитротирозина на селектины и PSGL-1, что послужило ограничением в исследовании данного показателя в дальнейшем в экспериментальном блоке.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

С целью проверки гипотезы о влиянии интермедиатов метаболома оксида азота на селектины были проведены экспериментальные исследования, которые включали в себя экспозицию клеток HUVEC и фракционированных лейкоцитов с растворами пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона.

Оценка принадлежности полученных эндотелиальных клеток к линии HUVEC

Были получены клетки, имеющие полигональную форму с круглым ядром в центре, в культуре имеют вид «булыжной мостовой». Ядра клеток HUVEC имеют одиночное или двойное ядрышко с мелкими гранулами хроматина. Принадлежность полученных в лаборатории клеток (Рисунок 6) к эндотелиальным подтверждали методом иммуноцитохимического анализа с применением антител к маркерным белкам эндотелиоцитов: молекуле клеточной адгезии CD31 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)*) и фактору фон Виллебранда (*vWF, von Willebrand factor*) (Рисунок 7).

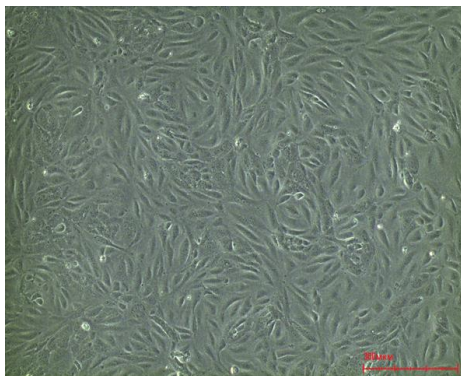


Рисунок 6 – Первичная линия эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) *in vitro*, полученная в лаборатории клеточных технологий ЦНИЛ РязГМУ. УВ.×200

В качестве отрицательного контроля использовали линию человеческих фибробластов, не экспрессирующих указанные белки.

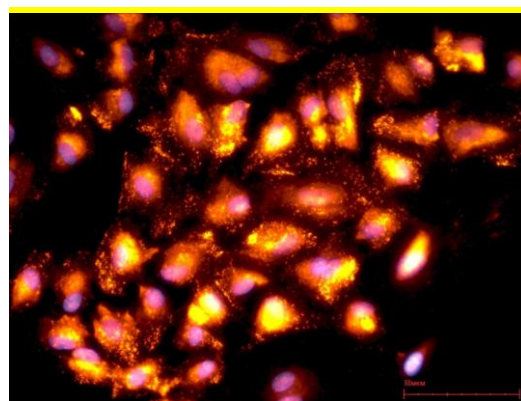
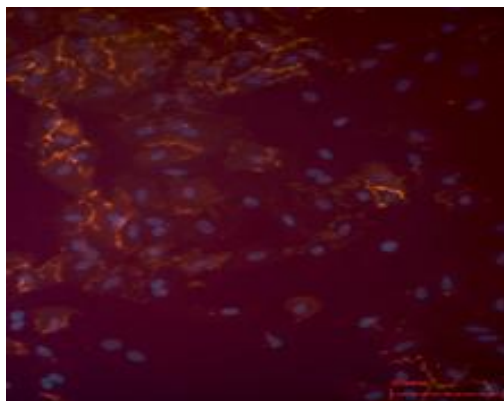


Рисунок 7 – Иммуноцитохимическая визуализация CD31 (*PECAM*) на мембране культуры первичных эндотелиоцитов HUVEC (слева). Ядра окрашены DAPI.

Ув.×400 Иммуноцитохимическая визуализация фактора фон Виллебранда (*vWF*) (справа) в цитоплазме культуры первичных эндотелиоцитов HUVEC.

Ядра окрашены DAPI. Ув.×400

В зоне клеточных контактов отмечалось наличие иммуноцитохимической реакции с указанными антителами к белку CD31, что подтвердило наличие маркера эндотелиальных клеток и принадлежность клеток к эндотелиальным. Иммуноцитохимическая реакция на *vWF* проявлялась диффузным окрашиванием цитоплазмы и отложением гранул в виде грубых пятен и «зёрен», что также подтвердило принадлежность клеток к эндотелиальным.

Моделирование нитрозативного стресса на культуре клеток HUVEC путем внесения растворов пероксинитрита и изучение его показателей

На первом этапе исследования мы получили сведения, что совместное культивирование клеток эндотелия человека HUVEC с пероксинитритом в концентрациях от 10 до 500 мкМ во временных интервалах от 30 минут до двух часов приводит к развитию нитрозилирующего стресса. Это подтверждалось повышением конечных стабильных метаболитов оксида азота - нитритов и нитратов, битирозина, а также снижением метаболической активности клеток.

На следующем этапе мы произвели количественную оценку селектинов Р и Е, а также ферментов синтеза оксида азота (II) – индуцибельной и эндотелиальной NO-синтазы в лизатах эндотелиоцитов после инкубации с

пероксинитритом в тех же экспериментальных условиях.

Оценка относительного количества Р-селектина в лизатах эндотелиоцитов

Экспозиция HUVEC с пероксинитритом в изучаемых концентрациях продемонстрировала различные результаты в разные временные сроки (Рисунок 8).

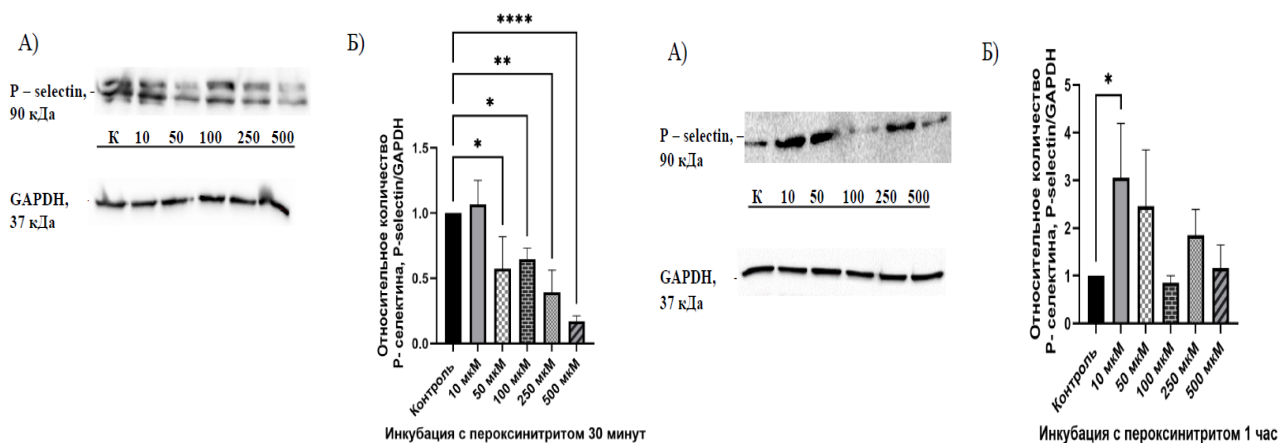


Рисунок 8 – Изменение относительного количества Р-селектина в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации в течение 30 минут и 1 часа, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание—*—статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$;

—** $\leq 0,01$; ****— $p \leq 0,0001$

Здесь и далее: А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведенного методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

Кратковременная 30-минутная инкубация привела к статистически значимому снижению относительного количества Р-селектина в концентрациях пероксинитрита от 50-500 мкМ: на 43% ($p \leq 0,05$), 54% ($p \leq 0,05$), 66% ($p \leq 0,01$), и 81% ($p \leq 0,0001$) соответственно.

Оценка относительного количества Е-селектина в лизатах эндотелиоцитов

При проведении анализа вестерн-блот с целью определения относительного количества Е-селектина мы получили следующие результаты (Рисунок 9).

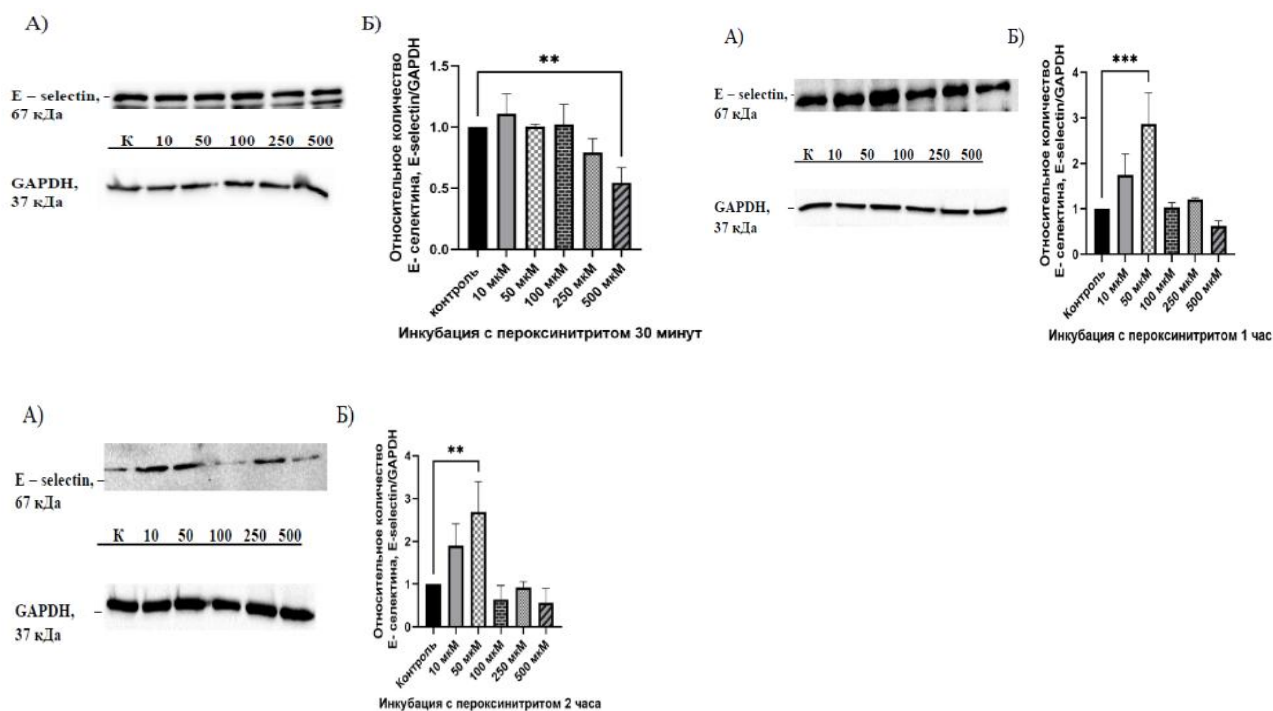


Рисунок 9 – Изменение относительного количества Е-селектина в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации в течение 30 минут, 1 часа и 2-х часов ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание – * – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$;

** – $p \leq 0,01$

При 10 мкМ относительное содержание несколько повышалось. 50 и 100 мкМ не дали явных изменений, высокие концентрации привели к снижению, статистически значимому при концентрации пероксинитрита 500 мкМ – на 46% ($p \leq 0,01$). Более длительная инкубация приводила к разнонаправленному изменению относительного количества Е-селектина: низкие концентрации повысили его, причем отмечалось повышение в концентрации пероксинитрита 50 мкМ на 187% ($p \leq 0,001$) и на 150 % ($\leq 0,0001$) соответственно, оно явилось статистически значимым как при часовой, так и двухчасовой экспозиции.

Оценка относительного количества индуцибельной синтазы оксида азота (II) в лизатах эндотелиоцитов

Индукцибельная синтаза оксида азота (iNOS) в клеточных лизатах при 30 минутной инкубации с пероксинитритом при низких концентрациях статистически значимо повышалась по сравнению с контролем: на 25% ($p \leq 0,01$) и на 18 % ($p \leq 0,05$) при 10 и 50 мкМ пероксинитрита соответственно, концентрация же 500 мкМ вызвала статистически значимое снижение фермента

на 22 % ($p \leq 0,05$) (Рисунок 10).

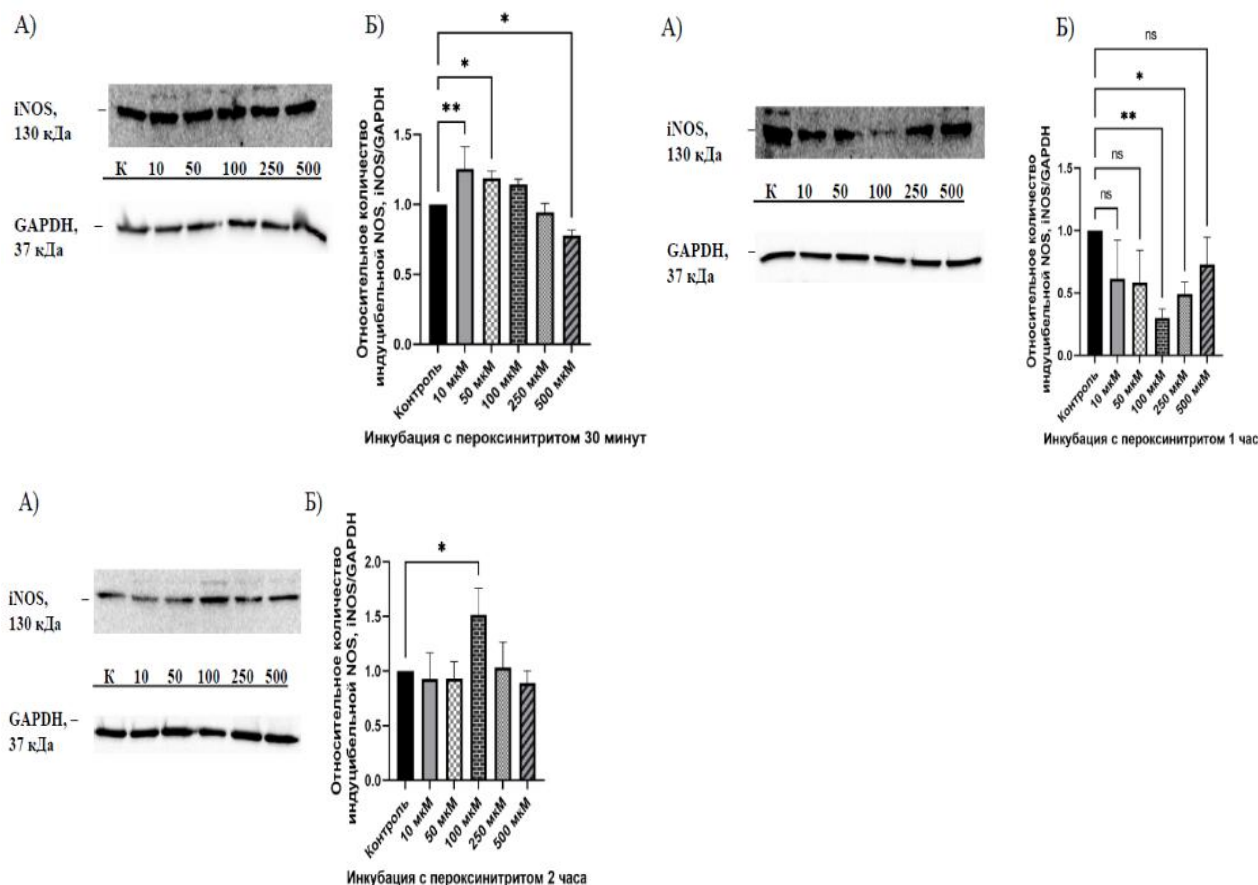


Рисунок 10 – Изменение относительного количества iNOS в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации в течение 30 минут, 1 часа и 2 часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание—*— статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$;
 **— $p \leq 0,01$

Таким образом, 30-минутная совместная инкубация HUVEC с растворами пероксинитрита привела к разнонаправленному влиянию на уровень iNOS. Низкие концентрации 10 и 50 μM повышали ее уровень, высокие 500 μM снижали по сравнению с контролем. Часовая совместная инкубация снизила содержание белка в концентрации 100 и 250 μM на 69% ($p \leq 0,01$) и 49 % ($p \leq 0,05$) соответственно, двухчасовая повысила уровень iNOS при концентрации 100 μM на 51% ($p \leq 0,05$).

Оценка относительного количества эндотелиальной синтазы оксида азота (II) в лизатах эндотелиоцитов

Изменения относительного количества эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) также имело разнонаправленную тенденцию: при 30 минутной

инкубации оно повышалось по сравнению с контролем, статистически значимо в концентрациях 10 и 250 мкМ на 594 % ($p \leq 0,0001$) и 345% ($p \leq 0,01$) соответственно (Рисунок 11).

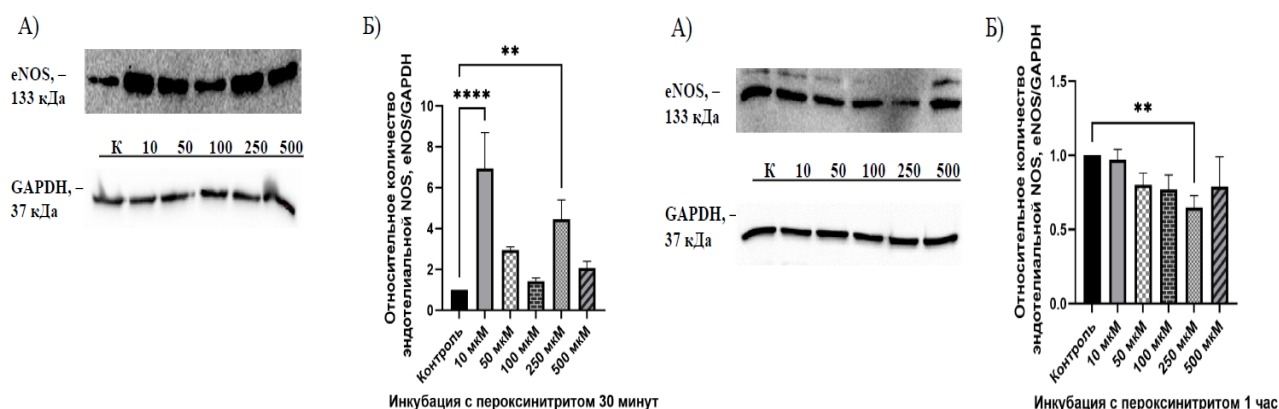


Рисунок 11 – Изменение относительного количества eNOS в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации в течение 30 минут и 1 часа, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание – * – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,0001$

Часовая инкубация статистически значимо снижала уровень eNOS в концентрации 250 мкМ на 36% ($p \leq 0,01$). Следовательно, можно сделать вывод о влиянии пероксинитрита на изменение относительного количества индуцибельной и эндотелиальной NO-синтаз.

Моделирование условий изменения уровня оксида азота (II) на культуре HUVEC путем внесения растворов его донатора S-нитрозоглутатиона

На следующем этапе проводилась инкубация HUVEC с растворами НГ. Экспозиция в течение 24-х и 72-х часов дала статистические значимые снижения митохондриальной активности клеток: 24 часа – концентрация 250 мкМ на 21% ($p=0,009$) и 500 мкМ на 36,8% ($p=0,0001$); 72 часа – к концентрации 250 мкМ на 30 % ($p < 0,0001$) и 500 мкМ на 56% ($p < 0,0001$). При оценке концентрации стабильных метаболитов оксида азота ($NO_2^- + NO_3^- = NOx$) отмечалось повышение показателя в лизатах эндотелиоцитов экспериментальной группы по сравнению с контрольной группой. При определении битирозина было зафиксировано повышение уровня продукта действия оксида азота (II) на белки – битирозина практически во всех временных точках и концентрациях статистически значимо ($p=0,0001$). Была отмечена тенденция снижения пероксинитрита в лизатах

HUVEC по сравнению с контролем при инкубации с низкими концентрациями GSNO и повышение при инкубации с высокими концентрациями. Тем не менее, при 24-х часовом совместном инкубировании HUVEC с S-нитрозоглутатионом в концентрации 500 мкМ мы отметили снижение уровня пероксинитрита на 74,7 % ($p=0,0001$).

Оценка относительного содержания селектина Р в лизатах клеток HUVEC

Три часа совместной экспозиции HUVEC с S-нитрозоглутатионом привело к следующим результатам (Рисунок 12). Статистически значимо увеличилось относительное содержание белка: в концентрации GSNO 50 мкМ на 45 % ($p=0,0197$); и к статистически значимому снижению: в концентрации 250 и 500 мкМ ($p=0,0092$)

В последующем мы провели совместную 24-часовую экспозицию HUVEC с изучаемым донатором оксида азота, и получили следующий результат: повышение относительного количества Р-селектина относительно контроля: в концентрации 10 мкМ на 126% ($p=0,0392$).

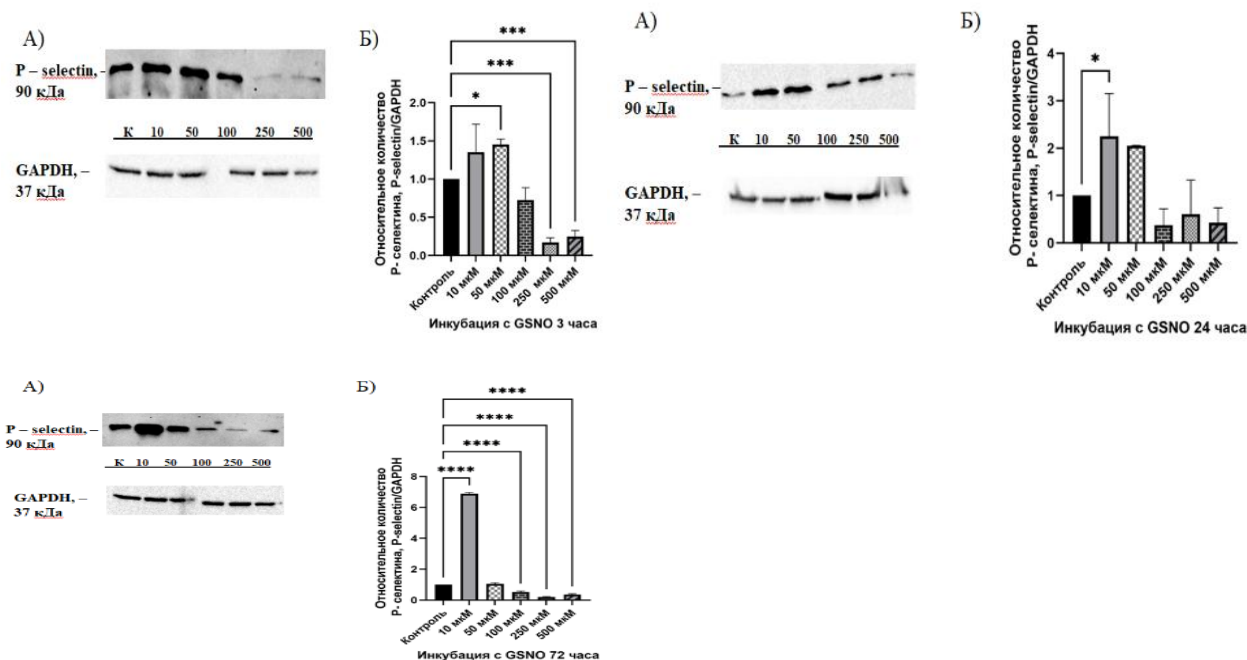


Рисунок 12 – Изменение относительного количества селектина Р в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом в течение 3-х, 24-х и 72-х часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$;
*** – $p \leq 0,001$

При инкубации GSNO с культурой HUVEC в течение 72 -х часов наблюдалось статистически значимое повышение относительного количества белка при концентрации S-нитрозоглутатиона 10 мкМ, а также статистически значимое снижение относительного количества изучаемого белка на 48% в концентрации донора NO равной 100 мкМ ($p<0,0001$), на 80% в концентрации 250 мкМ ($p=0,0001$), и на 65 % в концентрации S-нитрозоглутатиона 500 мкМ ($p<0,0001$).

Оценка относительного содержания селектина Е в лизатах клеток HUVEC

Результаты изменения относительного количества селектина Е в лизатах HUVEC представлены на Рисунке 13.

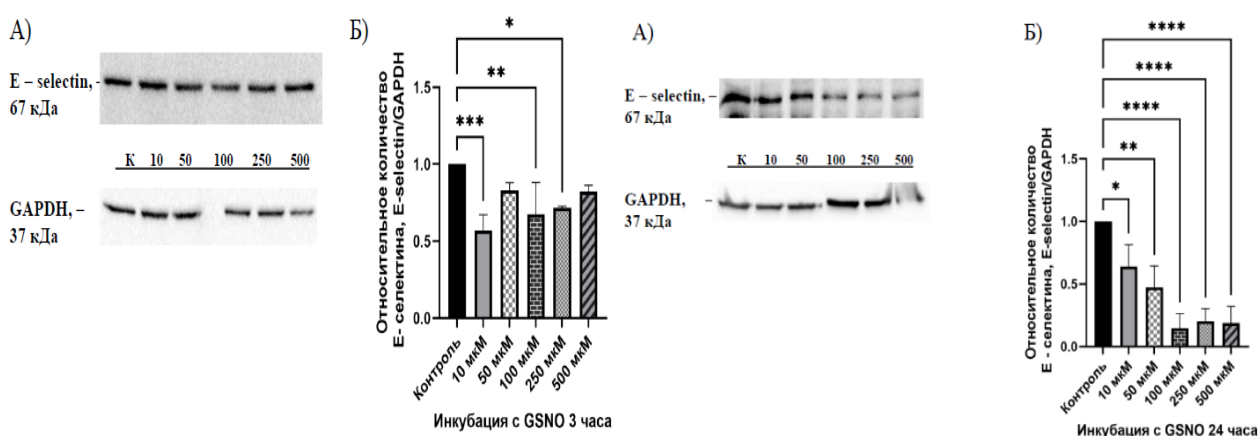


Рисунок 13 – Изменение относительного количества селектина Е в лизатах клеток HUVEC под действием S-нитрозоглутатиона при их совместной инкубации в течение 3-х и 24-х часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$;
*** – $p \leq 0,001$

В ходе исследования установлено, что при кратковременной инкубации с S-нитрозоглутатионом, в течение 3 часов относительное количество селектина Е в лизатах HUVEC во всех изучаемых концентрациях было ниже контроля, в концентрациях 10, 100, 250 мкМ статистически значимое снижение: 10 мкМ на 41% ($p=0,0008$), 100 мкМ – на 41% ($p=0,0064$), 250 мкМ – на 26 % ($p=0,017$). После совместного культивирования в течение суток относительное количество изучаемого белка снижалось по сравнению с контролем статистически значимо во всех концентрациях GSNO: при 10 мкМ на 36% ($p=0,02$), при концентрации 50 мкМ на 52 % ($p=0,014$), при концентрациях 100, 250 и 500 мкМ на 85%, 80 % и 81 соответственно ($p=0,001$).

Оценка относительного количества индуцибельной синтазы оксида азота (II) в лизатах эндотелиоцитов

Трехчасовая экспозиция демонстрировала повышение относительного количества фермента под действием GSNO в концентрациях 250 и 500 мкМ 26% ($p \leq 0,05$) и 120 % ($p \leq 0,0001$) соответственно.

При 24-часовой инкубации относительное количество iNOS статистически значимо повысилось в концентрации 10 мкМ на 80 % ($p \leq 0,05$) (Рисунок 14).

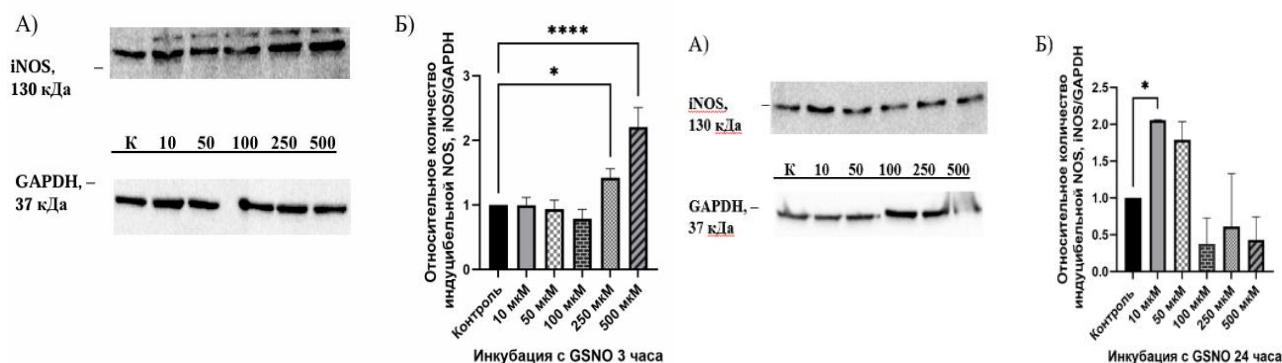


Рисунок 14 – Изменение относительного количества iNOS в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом в течение 3-х и 24-х часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание—*— статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$;
 ** — $p \leq 0,01$; **** — $p \leq 0,0001$

72-часовая экспозиция с 10 мкМ раствором GSNO привела к статистически значимому повышению относительного количества iNOS, концентрации от 100 до 500 мкМ статистически не значимо снизили изучаемый показатель по сравнению с контролем на 87%, 90% и 81 % соответственно ($p \leq 0,0001$) (Рисунок 15).

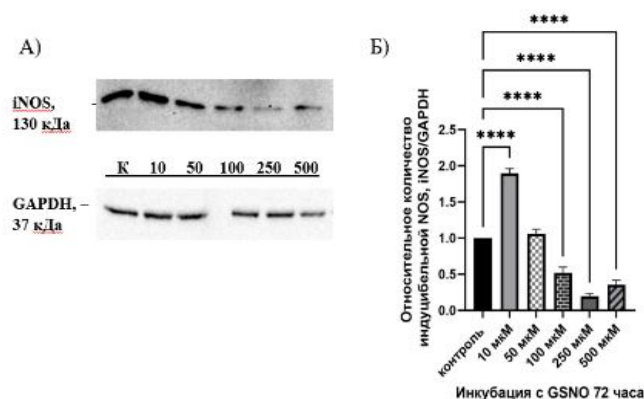


Рисунок 15 – Изменение относительного количества iNOS в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом в течение 72-х часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание—*— статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$;
 ** — $p \leq 0,01$; **** — $p \leq 0,0001$

Оценка относительного количества эндотелиальной синтазы оксида азота (II) в лизатах эндотелиоцитов

Далее было изучено действие S-нитрозоглутатиона на относительное количество eNOS в лизатах HUVEC после их совместной инкубации (Рисунок 16).

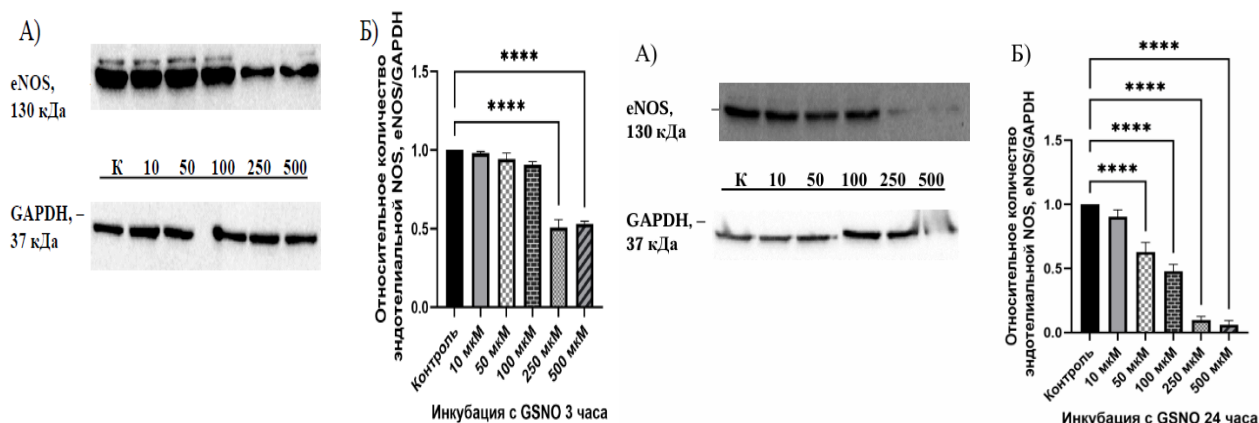


Рисунок 16 – Изменение относительного количества eNOS в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом в течение 3-х часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание —*— статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$;
 ** — $p \leq 0,01$; *** — $p \leq 0,001$; **** — $p \leq 0,0001$

Трехчасовая экспозиция с GSNO выявила снижение относительного количества белка, статистически значимое при концентрации GSNO 250 и 500 мкМ на 50 и 49 % соответственно ($p \leq 0,0001$).

24-часовая совместная инкубация продемонстрировала ту же тенденцию, и привела к статистически значимому снижению относительного количества эндотелиальной синтазы оксида азота в лизатах клеток HUVEC в концентрации 50 мкМ на 39% ($p \leq 0,0001$), 100 мкМ – на 55 % ($p \leq 0,0001$), 250 мкМ на 92 % ($p \leq 0,0001$) и 500 мкМ на 96 % соответственно ($p \leq 0,0001$).

Оценка абсолютного количества белков селектина L и PSGL-1 при инкубации клеток HUVEC с пероксинитритом и S-нитрозоглутатионом в различных фракциях лейкоцитов

В нашем исследовании мы отметили разнонаправленное влияние пероксинитрита и GSNO на динамику изменения селектина L и лиганда в различных лейкоцитарных фракциях. Так, под действием пероксинитрита абсолютное количество селектина L преимущественно снижалось как в ПМЯЛ,

так и в МЯЛ, а под действием S-нитрозоглутатиона – преимущественно повышалось.

Обратная тенденция отмечалась для PSGL-1: под воздействием пероксинитрита абсолютное количество белка в гомогенатах ПМЯЛ и МЯЛ повышалось, под воздействием GSNO – преимущественно снижалось.

Таким образом, в нашем исследовании было продемонстрировано влияние токсической активной формы оксида азота (II) – пероксинитрита и эндогенного мягкого донатора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на абсолютное количество молекулы межклеточной адгезии селектина L и общего лиганда селектинов PSGL-1 в гомогенатах фракционированных лейкоцитов в ходе совместной инкубации последних с указанными агентами, что свидетельствует о влиянии интермедиатов системы оксида азота (II) на уровень селектина L и лиганда PSGL-1 и процесс последующей трансэндотелиальной миграции лейкоцитов в окружающие ткани при патологии.

Обобщая результаты исследования, можно отметить, что система оксида азота влияет на белки межклеточной адгезии селектины P, E, L и их универсальный лиганд PSGL-1. Интермедиаты метаболома оксида азота повышают и снижают содержание изучаемых белков в лизатах эндотелиоцитов в экспериментальных условиях, в клиническом блоке были обнаружены связи между ними.

ВЫВОДЫ

1. Патология сосудов нижних конечностей сопровождается снижением концентрации молекул межклеточной адгезии селектинов sP, sE, sL, повышением их универсального гликопротеинового лиганда PSGL-1 и тенденцией к его повышению, и повышением концентрации показателей окислительного/нитрозилирующего стресса: стабильных метаболитов оксида азота, пероксинитрита и окислительно модифицированных белков в сыворотке крови; обнаружена разница между группами пациентов с артериальной и венозной патологией: степень изменения уровней селектина sP, эндотелиальной NO синтазы, гликопротеинового лиганда PSGL-1 в сыворотке крови пациентов с артериальной патологией выше, чем у пациентов с венозной. Показатели НС у пациентов с артериальной патологией выше, чем у пациентов с венозной патологией.

2. Атеросклероз артерий нижних конечностей ассоциирован со снижением концентрации sP-селектина, sL-селектина, повышением уровня PSGL-1, и повышением показателей нитрозилирующего стресса: стабильных метаболитов оксида азота, пероксинитрита, окислительно модифицированных белков в сыворотке крови пациентов по сравнению со здоровыми донорами. Отмечается повышение уровня iNOS в сыворотке крови по отношению к группе пациентов с острым венозным тромбозом.

3. Артериальный тромбоз, сформировавшийся на фоне атеросклероза, сопровождается снижением уровня sP-селектина, повышением показателей нитрозилирующего стресса: стабильных метаболитов оксида азота, пероксинитрита, окислительно модифицированных белков в сыворотке крови пациентов по сравнению со здоровыми донорами. Отмечено повышение уровня нитротирозина по сравнению с пациентами с острым венозным тромбозом, уровня стабильных метаболитов оксида азота по сравнению с группами пациентов с атеросклерозом и варикозом.

4. Варикозная болезнь вен нижних конечностей ассоциирована со снижением уровня sP- и sL-селектинов, повышением показателей нитрозилирующего стресса: стабильных метаболитов оксида азота, пероксинитрита, окислительно модифицированных белков в сыворотке крови пациентов по сравнению со здоровыми донорами. Отмечается повышение уровня iNOS по сравнению с группой с острым венозным тромбозом.

5. Острый венозный тромбоз сопровождается снижением уровня sP-селектина и повышением показателей нитрозилирующего стресса: стабильных метаболитов оксида азота, пероксинитрита в сыворотке крови пациентов по сравнению со здоровыми донорами.

6. Выявлены корреляционные связи средней силы между: -sL-селектином и HT $r=0,653$ ($p=0,000$), PSGL-1 и HT $r=0,618$ ($p=0,000$), sE-селектином и iNOS $r=0,522$ ($p=0,000$), sE и битирозином $r=-0,49$ ($p=0,006$) у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей; sE-селектином и HT $r=-0,425$ ($p=0,024$), sL-селектином и HT $r=0,446$ ($p=0,029$) у пациентов с артериальным тромбозом; sE-селектином и eNOS $r=-0,405$ ($p=0,026$), sP-селектином и HT

$r=0,611$ ($p=0,000$) у пациентов с варикозным расширением вен; sE-селектином и eNOS $r=0,41$ ($p=0,024$) у пациентов с острым венозным тромбозом. По результатам многофакторного регрессионного анализа в клиническом исследовании нитротирозин был выявлен в качестве преимущественно ведущего фактора, влияющего на селектины и PSGL-1 у пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей.

7. Культивирование первичной линии эндотелиоцитов HUVEC с пероксинитритом в течение 30 минут в концентрации 10-500 мкМ приводит к снижению относительного количества селектина Р, в концентрации 500 мкМ к снижению относительного количества селектина Е; в концентрации 10 и 50 мкМ в течение 1 часа – к повышению относительного количества селектина Р и Е соответственно в лизатах клеток на фоне изменения уровня интермедиатов системы NO, что свидетельствует о влиянии оксида азота на селектины Р и Е.

8. Культивирование первичной линии HUVEC с GSNO в концентрации 10-50 мкМ в течение 3-х часов, в концентрации 10 мкМ в течение 24-х и 72-х часов приводит к повышению относительного количества селектина Р, в концентрации 250-500 мкМ в течение 3-х часов – к снижению относительного количества селектина Р; в концентрации 10-500 мкМ в течение 24-х часов – к снижению относительного количества селектина Е в лизатах клеток, на фоне изменения уровня интермедиатов системы NO, что свидетельствует о влиянии оксида азота на селектины Р и Е.

9. Отмечается снижение абсолютного количества селектина L под действием пероксинитрита и PSGL-1 под действием GSNO; повышение абсолютного количества селектина L под действием GSNO и PSGL-1 под действием пероксинитрита в обеих фракциях лейкоцитов периферической крови, что свидетельствует о разнонаправленном влиянии интермедиатов метаболома оксида азота на указанные белки.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Результаты представленной работы являются основой для дальнейшего определения транскрипционных факторов, участвующих в регуляции активности генов молекул межклеточной адгезии селектинов Р, Е, L и их универсального гликопротеинового лиганда PSGL-1 с целью терапевтического

воздействия на межклеточные взаимодействия.

2. Концентрации пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона, приводящие к статистически значимым изменениям относительного количества селектинов и NO-синтаз, могут быть использованы в экспериментальных моделях по изучению факторов, оказывающих потенциальное воздействие на изучаемые белки.

3. Выявленные зависимости между уровнем молекул межклеточной адгезии селектинов sP, sE, sL и показателями нитрозилирующего стресса рекомендуется учитывать как при планировании исследований, связанных с изучением вклада указанных белков в функционирование эндотелия при адаптивных процессах, и в развитие дисфункции эндотелия при патологии, так и при тестировании препаратов, нацеленных на селектины и PSGL-1 в качестве терапевтических мишеней.

4. Целесообразно проведение исследования нарастания показателей нитрозилирующего стресса и снижения растворимых форм селектинов в сыворотке крови пациентов с патологией сосудов нижних конечностей с целью оценки эффективности проводимой антиоксидантной терапии препаратами, действие которых основано на антиоксидантных эффектах оксида азота.

5. Выявленное снижение уровня PSGL-1 под действием донатора NO S-нитрозоглутатиона в гомогенатах лейкоцитов может быть использовано для разработки терапевтических стратегий с целью уменьшения выраженности воспалительной реакции у пациентов с патологией сосудов нижних конечностей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России

1. Изучение молекулярных механизмов эндотелиальной дисфункции *in vitro* / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, **Н.В. Короткова**, Н.Д. Мжаванадзе. – Текст: непосредственный // **Гены и клетки**. – 2019. – Т. 14, №1. – С. 22-32.

2. Изучение содержания Р, Е – селектинов и гликопротеинового лиганда PSGL-1 у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей / **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.]. – Текст: непосредственный // **Молекулярная медицина**. – 2022. – №2. – С.39–45.

3. Оценка уровня селектинов и их лиганда PSGL-1 у пациентов с острым венозным тромбозом / **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.]. – Текст: непосредственный // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2022. – Т.25, №5. – С.3-9.

4. Взаимосвязь уровня NO синтаз и Р-, Е-селектинов у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей / **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А.Сучков [и др.]. – Текст: непосредственный // **Бутлеровские сообщения**. – 2023. – Т.75, №9. – С.40-47.

5. Оценка уровня селектинов и гликопротеинового лиганда PSGL-1 у пациентов с артериальным тромбозом / **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.]. – Текст: непосредственный // **Технологии живых систем**. – 2023. – Т. 20, № 4. – С. 72-79.
6. Идентификаторы нитрозативного стресса у пациентов с периферическим атеросклерозом/ **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.]. – Текст: непосредственный // **Прикладные информационные аспекты медицины**. – 2024. – Т. 7, № 2. – С. 56 – 63.
7. Оценка связи между концентрацией PSGL-1, NO-синтаз и метаболитов оксида азота в сыворотке крови пациентов с острым артериальным тромбозом / **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.]. – Текст: непосредственный // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2024. – Т. 27, №7. – С.42–48.
8. Различные концентрации пероксинитрита вызывают уникальный клеточный ответ эндотелиоцитов in vitro / **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.]. – Текст: непосредственный // **Молекулярная медицина**. – 2024. – Т.22, №4. – С.51–57.
9. Артериовенозный фенотип эндотелиоцитов влияет на экспрессию эндотелий специфичных белков / **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.]. – Текст: непосредственный // **Прикладные информационные аспекты медицины**. – 2025. – Т. 28, №1. – С. 83-89.
10. Влияние донатора оксида азота S-нитрозоглутатиона на относительное количество Р-селектина in vitro/ **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.]. – Текст: непосредственный // **Молекулярная медицина**. – 2025. – №3. – С. 101-107.
11. Количественная оценка селектина Е при экспериментальном влиянии нитрозоглутатиона/ **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.]. – Текст: непосредственный // **Бутлеровские сообщения**. – 2025. – Т. 82, №4. – С.88-95.
12. Экспрессия селектинов и выраженность нитрозирующего стресса у пациентов с острым тромбозом вен нижних конечностей/ **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.]. – Текст: непосредственный // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2025. – №3. – С. 29-37.

Статьи в других изданиях

1. Взаимосвязь уровня Е-селектина и NO синтаз у пациентов с острым венозным тромбозом / **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе. – Текст: непосредственный // Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT+M&Ec`2020. – Гурзуф, 2023. – С. 82-85.
2. **Короткова, Н.В.** Селектины Е и Р у пациентов с атеросклерозом периферических артерий нижних конечностей / Н.В. Короткова, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков. – Текст: непосредственный // Материалы научно-практической конференции (69-й годичной) с международным участием, посвященной 30-летию Государственной независимости Республики Таджикистан и «Годам развития села, туризма и народных ремёсел (2019-2021)». – Душанбе (Dushanbe), 2022. – С. 270-271.
3. Определение концентрации селектина L при варикозной болезни вен нижних конечностей / **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, М.М. Упоров. – Текст: непосредственный // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева». – Рязань, 2022. – С. 28-31.
4. Пероксинитрит как сигнальная молекула и цитотоксический агент при воздействии на сосудистый эндотелий in vitro / А.С. Захаров, **Н.В. Короткова**, Н.Д. Мжаванадзе, А.В. Шулькин. – Текст: непосредственный // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева». – Рязань, 2022. – С. 132-135.
5. Селектин Е, как показатель нарушения адгезивной функции эндотелия при варикозной болезни вен нижних конечностей. – Текст: непосредственный / **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе. – Текст: непосредственный // Сборник докладов

VIII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» / под ред. Р.Е. Калинина, И.А. Сучкова; ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – Рязань, 2022. – С.123-124.

6. Селектины и их участие в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, **Н.В. Короткова** [и др.]. – Текст: непосредственный // **Казанский медицинский журнал**. –2022. – Т.103, № 4. – С. 617-627.

7. Adhesion molecules and their ligands in patients with varicose veins / R. E. Kalinin, I. A. Suchkov, **N. V. Korotkova**, N. D. Mzhavanadze. – Text: visual // **Phlebology**. –2022. – Vol. 37, No. 2. – P. 6-7.

8. Влияние различных концентраций пероксинитрита на уровень селектинов в культуре HUVEC / **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.]. – Текст: непосредственный // Сборник докладов IX Всероссийской научной конференции с международным участием молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста». – Рязань, 2023. – С.113-115.

9. **Короткова, Н.В.** Оксид азота: возможное влияние на экспрессию Е-селектина / Н.В. Короткова, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков. – Текст: непосредственный // Российская научно-практическая конференция «Зубаировские чтения: новое в коагулологии» «Медицинская биохимия: достижения и перспективы», посвященная 160-летию кафедры биохимии Казанского ГМУ: сборник научных статей. – Казань, 2023. – С. 59-64.

10. Оценка связи между концентрацией L-селектина и уровнем NO-синтаз у пациентов с периферическим атеросклерозом / **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе. – Текст: непосредственный // Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине: сборник научных трудов 4-й Международной конференции, посвященной 135-летию со дня рождения профессора В.В. Лебединского. – Санкт-Петербург, 2023. – С. 196-201.

11. Селектин Р и его взаимосвязь с уровнем NO-синтаз, как показатель нарушения адгезивной функции эндотелия у пациентов с артериальным тромбозом / **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков Н.Д. Мжаванадзе. – Текст: непосредственный // Сборник докладов IX Всероссийской научной конференции с международным участием молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста». – Рязань, 2023. – С.112-113.

12. Activity of NO-synthases and level of selectins in patients with varicose veins of the lower extremities / Roman Kalinin, Igor Suchkov, **Natalia Korotkova** [et al.]. – Text: electronic // 23-rd Annual Meeting of the European Venous Forum in collaboration with the Germany society of Phlebology and Lymphology, 22-24 June 2023, Berlin, Germany. – URL: https://clients.shocklogic.com/demos/portable_abstract_book/EVF/evf_abstract%20book.html.

13. PSGL-1 selectin glycoprotein ligand in patients with varicose veins of the lower limb. XVI international scientific and practical conference «Ecology, radiation, health», named after B.A. Atchabarov dedicated to the 70th anniversary of Semey medical university / **N.V. Korotkova**, R.E. Kalinin, I.A. Suchkov, R.R. Olzhayeva. – Text: visual // Collection theses. – Semey city, 2023. – P. 16-17.

14. Биомаркеры нитрозативного стресса при венозном тромбозе / **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе. – Текст: непосредственный // Биохимия человека: материалы Всероссийской конференции с международным участием. – Москва, 2024. – С.23.

15. **Короткова, Н.В.** Возрастные особенности содержания селектина Р и PSGL-1 в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей / Н.В. Короткова, Н.Д. Мжаванадзе // Сборник докладов X Всероссийской научной конференции с международным участием молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста», посвященной 175-летию со дня рождения академика И.П. Павлова и 120-летию со дня получения им Нобелевской премии. – Рязань, 2024. – С. 176.

16. Особенности митохондриальной активности первичных культур интактных и патологических эндотелиоцитов при моделировании нитрозативного стресса *invitro* / Е.А. Стрельникова, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [др.] // Материалы VI Национального конгресса по регенеративной медицине. – Санкт-Петербург, 2024. – С.951-953. – (Соавт.: Н.Д. Мжаванадзе, **Н.В. Короткова**, Ю.В. Абаленихина, А.А. Никифоров, Л.В. Никифорова, В.О. Поваров, И.Ю. Суров, А.Р. Калинина).

17. Показатели нитрозативного стресса у пациентов с варикозной болезнью / **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе. – Текст: непосредственный // Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + ME`24. – Гурзуф, 2024. – С. 285–289.

18. PSGL-1: универсальный лигандселектинов или сигнальная молекула? / **Н.В. Короткова**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.]. – Текст: непосредственный // **Молекулярная биология**. – 2025. – Т. 59, №1. – С.32-42.

Рационализаторские предложения

1. Способ количественной оценки белка межклеточной адгезии Р-селектина (CD62P) методом вестерн-блот в лизатах эндотелиоцитов (HUVEC): рационализаторское предложение №1468 от 12.12.2024 / **Н.В. Короткова**, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин [и др.]. – Текст: непосредственный.

2. Способ количественной оценки белка межклеточной адгезии Е-селектина (CD62E) методом вестерн-блот в лизатах эндотелиоцитов (HUVEC): рационализаторское предложение №1469 от 12.12.2024 / **Н.В. Короткова**, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин [и др.]. – Текст: непосредственный.

3. Способ количественной оценки эндотелиальной NO-синтазы (eNOS, NOS3) методом вестерн-блот в лизатах эндотелиоцитов (HUVEC): рационализаторское предложение №1470 от 12.12.2024 / Ю.В. Абаленихина, **Н.В. Короткова**, А.В. Щулькин [и др.]. – Текст: непосредственный.

4. Способ количественной оценки индуцибельной NO-синтазы (iNOS) методом вестерн-блот в лизатах эндотелиоцитов (HUVEC): рационализаторское предложение №1471 от 12.12.2024 / Ю.В. Абаленихина, **Н.В. Короткова**, А.В. Щулькин [и др.]. – Текст: непосредственный.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФА – активные формы азота

АФК – активные формы кислорода

БТ – битирозин

ВБНК – варикозная болезнь нижних конечностей

МЯЛ – моноядерные лейкоциты

НГ – нитрозоглутатион

НС – нитрозативный, нитрозилирующий, нитрозильный стресс

НТ – нитротирозин

ОМБ – окислительная модификация белков

ОС – окислительный стресс

ПМЯЛ – полимофноядерные лейкоциты

ХЗВ – хронические заболевания вен

ЭД – эндотелиальная дисфункция

CEAP – (англ.: Clinical, Etiological, Anatomical, Pathophysiological), международная классификация заболеваний вен нижних конечностей

GSNO – S-нитрозоглутатион

HUVEC – (англ.: human umbilical vein endothelial cells), эндотелиальные клетки пуповины человека

NO-synthase – (англ.: synthase of nitric oxide), синтаза оксида азота

PSGL-1 – (англ.: P-selectin glycoprotein ligand 1) – Р-селектина гликопротеиновый лиганд