

На правах рукописи

Суров Иван Юрьевич

**Роль эндотелиально-мезенхимального перехода в развитии осложнений
у пациентов с облитерирующим атеросклерозом
артерий нижних конечностей**

3.1.15. Сердечно-сосудистая хирургия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата 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 руководитель:

доктор медицинских наук, доцент **Пшенников Александр Сергеевич**

Официальные оппоненты:

Аракелян Валерий Сергеевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, руководитель отдела хирургии артериальной патологии

Чупин Андрей Валерьевич, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии имени А.В. Вишневского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий отделением сосудистой хирургии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2025 года в ___ на заседании объединенного диссертационного совета 99.2.078.02, созданного на базе ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, 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, 34, корп. 2) и на сайте www.rzgmu.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
объединенного диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Н.Д. Мжаванадзе

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

На данный момент заболевания сердечно-сосудистой системы являются одной из самых важных медико-социальных проблем в Российской Федерации и мире, определяющих высокую смертность населения и экономическую нагрузку государства. В 2021 году в России зарегистрировано 35 574 831 взрослых больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. За десятилетний период времени (2012-2021) от данной группы заболеваний умерло 8209196 человек, что составляет 42,1% случаев летального исхода среди всех заболеваний (Османов Э.М. и соавт., 2023).

В последнее десятилетие растёт количество пациентов с симптомными атеросклеротическими поражениями артерий нижних конечностей. В России хроническими заболеваниями артерий нижних конечностей страдает около 3% населения. Среди людей средней возрастной группы заболевание отмечается у 1,1%, среди пожилых людей встречается – у 5,2% населения. В популяции людей старше 75 лет до половины населения отмечают симптомы хронической ишемии нижних конечностей, основную массу данных людей составляют пациенты с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (ОААНК). По гендерному признаку данное заболевание распределяется ассиметрично, так мужчины болеют гораздо чаще, чем женщины, в среднем соотношении 10:1 (Кошкин В.М. и соавт., 2015; Панов А.В. и соавт., 2021). В общей структуре сердечно-сосудистых заболеваний ОААНК занимает второе место, уступая первенство ишемической болезни сердца и составляет около 20% среди всех патологий, затрагивающих сердечно-сосудистую систему (Карпоа В.В. и соавт., 2024).

Одной из основных причин снижения эффективности эндоваскулярного лечения пациентов с ОААНК остаётся рестеноз. Рестеноз – повторное сужение артерии в месте баллонной ангиопластики и/или установки стента, в результате которого артериальный просвет в зоне вмешательства стенозируется более чем на 50%. Повторное сужение просвета артерии в результате процессов

формирования неоинтимы, фиброза, эндотелиально-мезенхимального перехода снижает приводит к повышению ригидности сосудистой стенки, что в свою очередь осложняет проведение повторного открытого или эндоваскулярного вмешательства на артериях данного сегмента (Коваленко И.Б., 2011). До конца механизмы развития рестеноза не известны.

Частота осложнений, связанных с эндоваскулярными вмешательствами на артериях нижних конечностей, достигает 19,4%. Риск развития рестеноза зависит от сегмента, на котором осуществлялось вмешательство. Рестеноз при вмешательствах на артериях подвздошно-бедренного сегмента развивается у 34% пациентов, с рестенозом в зоне вмешательства до $58,3 \pm 4,29\%$, у больных с поражением бедренно-подколенного сегмента у 46%, с рестенозом до $65,2 \pm 5,14\%$. К сожалению, фармакологическая терапия пероральными и парентеральными препаратами не способна в значимой мере повлиять на процессы вызывающие рестеноз, исследователи связывают это с невозможностью достижения терапевтической концентрации препарата в зоне имплантации стента или баллонной ангиопластики (Хохлов К.А., и соавт., 2023)

Учитывая вышеизложенное, актуальным видится решение вопроса прогнозирования рестеноза и способов влияния на каскад механизмов данного явления.

Цель исследования

Улучшить результаты эндоваскулярного лечения пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей путём изучения роли эндотелиально-мезенхимального перехода в развитии рестенозов и оптимизации диагностических алгоритмов.

Задачи исследования

1. Создать экспериментальную модель баллонной ангиопластики *in vitro* с получением первичных культур HUVEC с изменённой миграционной и метаболической активностью.

2. Изучить относительное количество маркеров EndMT: эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT –

TGF β 1 в первичных культурах HUVEC в экспериментальной модели баллонной ангиопластики *in vitro*, в том числе при воздействии сулодексида в концентрациях (0,1 ЛЕ/мл, 0,25ЛЕ/мл, 0,5ЛЕ/мл, 1ЛЕ/мл, 5ЛЕ/мл).

3. Изучить частоту развития рестенозов и прочих неблагоприятных исходов после эндоваскулярного лечения пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей.

4. Оценить уровень маркеров EndMT: эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1 в крови пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей на фоне эндоваскулярного и консервативного лечения сулодексидом.

5. Выявить ассоциативные связи между уровнем маркеров EndMT и развитием рестеноза в постинтервенционном периоде у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей на фоне эндоваскулярного лечения, разработать диагностический алгоритм прогнозирования рестеноза.

Научная новизна

В рамках экспериментальной части исследования создана *in vitro* модель баллонной ангиопластики, позволяющая получить первичные культуры эндотелиальных клеток вены пуповины человека (HUVEC) с измененной миграционной и метаболической активностью.

В первичных культурах HUVEC, полученных в предложенной модели баллонной ангиопластики, проведена оценка миграционной и метаболической активности при инкубации культур клеток с сулодексидом в различных его концентрациях (0,1 ЛЕ/мл, 0,25 ЛЕ/мл, 0,5 ЛЕ/мл, 1 ЛЕ/мл, 5 ЛЕ/мл).

В лизатах первичных культур эндотелиоцитов HUVEC, полученных в модели баллонной ангиопластики, произведена оценка относительного количества белков-маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода (эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1).

В лизатах первичных культур эндотелиоцитов HUVEC, полученных в

модели баллонной ангиопластики, произведена оценка относительного количества белков-маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода (эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1) при инкубации культур клеток с сулодексидом в различных его концентрациях (0,1 ЛЕ/мл, 0,25 ЛЕ/мл, 0,5 ЛЕ/мл, 1 ЛЕ/мл, 5 ЛЕ/мл).

Впервые определена связь между относительным количеством маркеров EndMT (эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1) с развитием рестеноза, прогрессированием стадии хронической ишемии нижних конечностей и развитием летальных исходов после эндоваскулярных вмешательств на артериях нижних конечностей в динамике.

Разработаны прогностические модели развития неблагоприятных исходов у больных с периферическим атеросклерозом в зависимости от уровня маркеров EndMT (эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1), уровня ЛПИ и возраста пациента.

Теоретическая и практическая значимость работы

В рамках экспериментальной части исследования проведено *in vitro* изучение экспрессии маркеров EndMT, а также оценка миграционной активности первичных культур HUVEC в модели баллонной ангиопластики, в том числе при воздействии сулодексида.

В рамках клинической части показана высокая прогностическая роль оценки относительного количества маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода, (эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1) в развитии рестеноза и прогрессировании ОААНК.

Изучение возможности построения прогностических моделей, позволяющих по исходным характеристикам пациента, уровням маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода (CD31, vWF, VIM, TGF β 1) прогнозировать развитие неблагоприятных исходов у пациентов после

эндоваскулярного оперативного вмешательства на артериях нижних конечностей.

Результаты экспериментальной части исследования окажут положительное влияние на расширение практических знаний о связи эндотелиально-мезенхимального перехода и развития рестеноза, прогрессирования стадии хронической ишемии нижних конечностей и развития летальных исходов после эндоваскулярных оперативных вмешательств.

Результаты клинической части исследования могут оказать существенное влияние на тактику лечения пациентов с данной патологией и улучшение прогнозов. Результаты диссертационного исследования используются в практическом здравоохранении, а именно в сосудистой хирургии, ангиологии, кардиологии.

Положения, выносимые на защиту

1. Используемая в экспериментальной части исследования модель баллонной ангиопластики *in vitro* позволяет получить первичные культуры клеток HUVEC с изменённой миграционной и метаболической активностью пригодные для изучения эндотелиально-мезенхимального перехода.

2. Моделирование баллонной ангиопластики *in vitro* приводит к неоднородному изменению относительного количества маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода, (эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1).

3. Эндоваскулярное и консервативное лечение пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей характеризуется изменением уровня маркеров EndMT (эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1) в крови.

4. Развитие неблагоприятных исходов после эндоваскулярного лечения пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (рестенозов, прогрессирования стадии ХИНК, летальных исходов) ассоциируется с измененными уровнями маркеров эндотелиально-

мезенхимального перехода (эндотелиальных – CD31, vWF, мезенхимальных – VIM, интегрального маркера EndMT – TGF β 1) в крови пациентов, значением ЛПИ и возрастом пациентов.

5. Основываясь на показателях относительной концентрации маркеров EndMT у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей перед проведением эндоваскулярного оперативного вмешательства на артериях нижних конечностей возможно прогнозировать развитие рестеноза в постинтервенционном периоде.

Внедрение результатов исследования в практику и учебный процесс

Результаты исследования внедрены в лечебную работу отделения сосудистой хирургии Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областная клиническая больница», отделения сосудистой хирургии Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи», научно-практическую работу Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, а также в учебный процесс кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов работы обусловлена широким спектром выполненных *in vitro* исследований на культурах клеток и проведенных клинических наблюдений на оборудовании мирового уровня с использованием реактивов высокого качества от ведущих производителей.

Результаты диссертации были доложены и обсуждены на XXIX Международной конференции «Горизонты современной ангиологии, сосудистой и рентгенэндоваскулярной хирургии» (Москва, 2024); Международной научно-практической конференции «Экспериментальные и клинические аспекты микроциркуляции и функции эндотелия» (Смоленск, 2024); конференции «Актуальные вопросы сердечно-сосудистой хирургии» (Курск, 2024); 2-ом Рязанском кардиологическом конгрессе (Рязань, 2024); XXXX Международной

конференции «Горизонты современной ангиологии, сосудистой и рентгенэндоваскулярной хирургии» (Санкт-Петербург, 2025).

Личный вклад автора

Вклад автора состоит в непосредственном участии и является определяющим на всех этапах исследования: от постановки целей и задач до обсуждения результатов в научных публикациях. Автор исследования в рамках экспериментальной части самостоятельно выполнил моделирование баллонной ангиопластики *in vitro*, принимал непосредственное участие в проведении экспериментов по определению метаболической и миграционной активности первичных культур HUVEC, в том числе при инкубации с сулодексидом. В рамках клинической части исследования автор самостоятельно провел оперативные вмешательства большей части пациентов, включённых в исследование, выполнил сбор всех материалов, осуществлял оценку результатов исследования, сформировал базу данных и проводил дальнейший анализ ее результатов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 3.1.15. Сердечно-сосудистая хирургия, а именно, п. 7 «Хирургическое, включая эндоваскулярное, лечение заболеваний сердца, артериальной, венозной и лимфатической систем» и п. 8. «Профилактика, диагностика и лечение осложнений хирургических, включая эндоваскулярные, методов лечения заболеваний сердца, артериальной, венозной и лимфатической систем».

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации результатов диссертационных исследований, 2 из которых индексируются в международной цитатно-аналитической базе данных Scopus. Получен 1 патент РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертация имеет классическую структуру и включает в себя следующие

разделы: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, выводы, практические рекомендации, список литературы, включающий 150 источников (27 отечественных и 122 зарубежных авторов). Работа изложена на 138 страницах печатного текста, иллюстрирована 34 рисунками, 19 таблицами и 3 клиническими примерами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Диссертационное исследование разделено на две части: экспериментальную и клиническую. Первая представляет собой *in vitro* изучение миграционной, метаболической активности эндотелиоцитов в модели баллонной ангиопластики, а также изучение относительного количества маркеров EndMT (эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1) в первичных культурах HUVEC в различных условиях. Вторая, изучение уровня маркеров EndMT (эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1) у пациентов с ОААНК.

Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол № 1 от 12.09.2022).

Экспериментальная часть работы выполнена на базе ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Клиническая часть диссертационного исследования выполнена на базах кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики: в отделениях сосудистой хирургии Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи», Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областная клиническая больница», а также в отделении дневного стационара сосудистой хирургии Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областной клинический кардиологический диспансер».

Материалы и методы экспериментальной части исследования

Экспериментальная часть исследования проведена на первичных культурах HUVEC, которые были выделены и культивировались в лаборатории клеточных технологий ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

В рамках диссертационного исследования *in vitro* на первичной культуре HUVEC производилась оценка метаболической и миграционной активности первичной культуры эндотелиоцитов (HUVEC) в модели баллонной ангиопластики и добавления в кондиционную среду препарата сулодексид *in vitro* в различных его концентрациях (0,1 ЛЕ/мл, 0,25 ЛЕ/мл, 0,5 ЛЕ/мл, 1 ЛЕ/мл, 5 ЛЕ/мл), а также произведена оценка относительного количества белков-маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода (эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1) при инкубации культур клеток с сулодексидом в различных его концентрациях (0,1 ЛЕ/мл, 0,25 ЛЕ/мл, 0,5 ЛЕ/мл, 1 ЛЕ/мл, 5 ЛЕ/мл) с использованием методики вестерн-блот.

Материалы и методы клинической части исследования

Клиническая часть исследования проведена на базе кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной, хирургии лучевой диагностики ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России в течение 2022-2024 г.

В клиническую часть включены пациенты с заболеваниями периферических артерий атеросклеротической этиологии (облитерирующий атеросклероз) с хронической ишемией нижних конечностей II-IV стадий по классификации А.В. Покровского-Фонтейна, кому проводилось консервативное лечение с использованием сулодексидом, либо выполнялись эндоваскулярные реконструктивные вмешательства на артериях нижних конечностей в объеме баллонной ангиопластики и/или стентирования с применением нитиноловых эндопротезов без лекарственного покрытия. IV стадия заболевания была представлена ограниченными сухими некрозами стоп, не превышавшими по площади 5 кв. см. Стентирование проводилось в случае локальной диссекции или остаточного стеноза более 50%.

Методики использованные в ходе клинической части исследования представлены в Таблице 1.

Таблица 1– Дизайн исследования

Сроки обследования / Вид обследования	0 мес	1 мес ± 5 дней	3 мес ± 5 дней	12 мес ± 14 дней
Информированное согласие	✓			
Демографические данные	✓			
Сбор анамнеза	✓			
Регистрация неблагоприятных исходов	✓	✓	✓	✓
Измерение лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ)	✓	✓	✓	
Ультразвуковое исследование артерий нижних конечностей	✓	✓	✓	
Эндоваскулярное оперативное лечение*	✓			
Забор периферической венозной крови для оценки уровня маркеров EndMT (эндотелиальных - CD31, vWF, мезенхимальных – VIM, αSMA, интегрального маркера EndMT – TGFβ1) в сыворотке/плазме пациентов на фоне эндоваскулярного или консервативного лечения.	✓	✓	✓	
Примечание - * - эндоваскулярное оперативное лечение выполнялось пациентам группы I при включении в исследование, далее – при наличии клинических показаний.				

Группа I: 40 пациентов с эндоваскулярной реконструкцией артерий нижних конечностей (баллонная ангиопластика либо баллонная ангиопластика в сочетании со стентированием); Группа II (группа сравнения): 40 пациентов, которым проводилось консервативное лечение согласно действующим клиническим рекомендациям с применением препарата сулодексид 600 ЛЕ внутривенно капельно 1 раз в день в течение 14 дней с последующим приёмом препарата внутрь в дозировке 250 ЛЕ 2 раза в день в течение 1 месяца, согласно инструкции по применению. Пациентам с IIб-IV стадиями ХИИНК, вошедшим в группу сравнения, была осуществлена терапия сулодексидом ввиду отказа пациентов от предложенного хирургического (эндоваскулярного) лечения либо наличия распространенного поражения дистального русла согласно данным инструментальных методов обследования. Пациенты I и II групп получали оптимальную медикаментозную терапию согласно клиническим рекомендациям, включая антиагрегантную и гиполипидемическую терапию.

Учитывая поисковый характер исследования и отсутствие данных

относительно нормального уровня изучаемых маркеров в популяции, дополнительно в исследование была включена группа из 10 условно здоровых добровольцев без клинических и инструментально подтвержденных признаков атеросклероза.

Больным II группы аналогичная оценка маркеров EndMT и инструментальные исследования проводились при включении в исследование и в срок 3 месяца. В группе здоровых добровольцев производился забор венозной крови единожды при включении в исследование с дальнейшим ИФА для определения уровня изучаемых маркеров.

Первичной конечной точкой исследования развитие рестеноза зоны эндоваскулярного вмешательства. Вторичными конечными точками исследования стали: тромбоз зоны реконструкции, прогрессирование стадии заболевания (хронической ишемии), ампутация конечности, летальный исход.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы провели оценку маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода, (эндотелиальных - CD31, vWF, мезенхимальных – VIM, α SMA, интегрального маркера EndMT – TGF β 1) в условиях *in vitro* в модели ангиопластики на первичных культурах HUVEC, а также выполнили клиническое исследование по оценке вышеуказанных маркеров непосредственно у больных ОААНК.

Экспериментальная часть исследования

В ходе эксперимента было показано, что метаболическая активность первичных культур клеток HUVEC в модели баллонной ангиопластики была в целом ниже по сравнению с интактными первичными культурами HUVEC ($p=0,025$). То есть моделирование баллонной ангиопластики негативно влияет на метаболическую активности культуры HUVEC по сравнению с группой контроля. При добавлении в кондиционную среду различных концентраций сулодексида (0,1 ЛЕ/мл, 0,25 ЛЕ/мл, 0,5 ЛЕ/мл, 1,0 ЛЕ/мл, 5,0 ЛЕ/мл) метаболическая активность интактных (нормальных) первичных культур клеток

HUVES статистически значимо не изменялась ($p=0,628$), таким образом, можно судить о том, что сулодексид не обладает цитотоксическим воздействием на первичные культуры HUVES в выбранных концентрациях. При добавлении препарата сулодексид в первичные культуры HUVES после моделирования баллонной ангиопластики были выявлены статистически значимые различия в метаболической активности HUVES при инкубации в культуральной среде с добавлением сулодексида в концентрации $0,1 \text{ ME/мл}$ по сравнению с контролем (инкубация только в культуральной среде) $0,507 \pm 0,029$ ед.опт.пл. и $0,485 \pm 0,034$ ед.опт.пл., соответственно ($p=0,034$), а также при инкубации патологических культур HUVES в культуральной среде с добавлением сулодексида в концентрации $0,1 \text{ ME/мл}$ и в концентрации 5 ME/мл $0,485 \pm 0,034$ ед.опт.пл. и $0,460 \pm 0,039$ ед.опт.пл., соответственно ($p=0,004$). Следовательно, добавление в культуральную среду сулодексида в концентрации $0,1 \text{ ME/мл}$ статистически значимо повышает метаболическую активность первичных культур клеток HUVES в модели баллонной ангиопластики ($p=0,034$). При повышении концентрации до 5 ME/мл эффект нивелируется. Анализ миграционной активности культур клеток представлен на Рисунках 1 и 2.

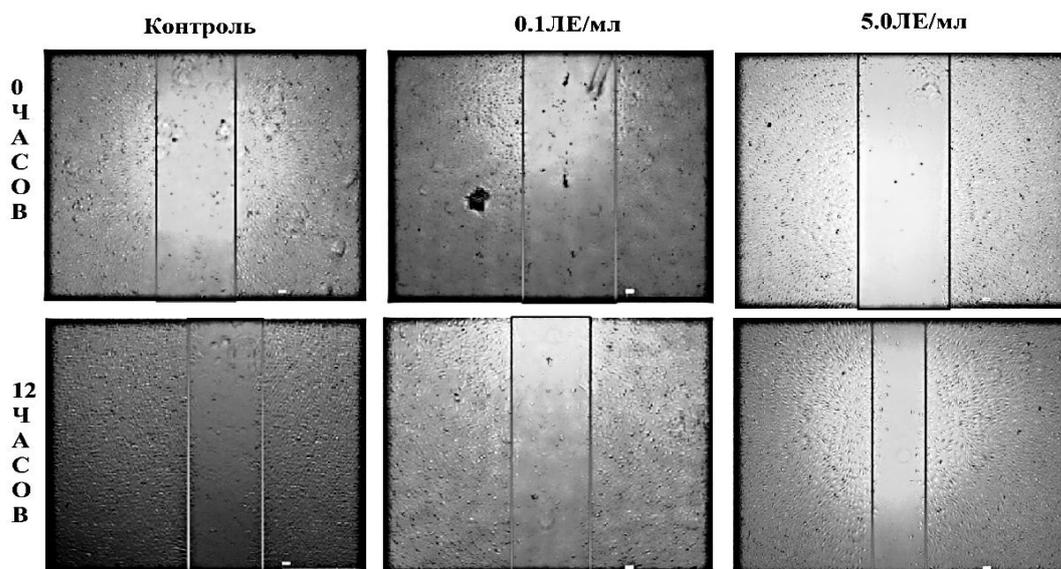


Рисунок 1 – Скретч-тест, нативные HUVES с добавлением $0,1 \text{ ЛЕ/мл}$, $5,0 \text{ ЛЕ/мл}$ сулодексида

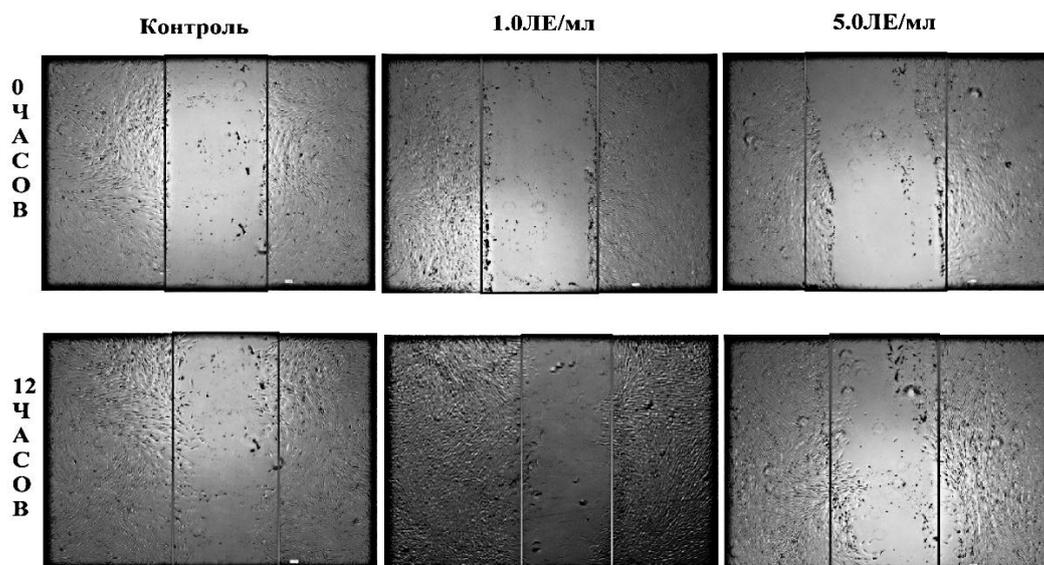


Рисунок 2 – Скретч-тест, патологические (после моделирования баллонной ангиопластики) культуры HUVEC с добавлением 1,0 ЛЕ/мл, 5,0 ЛЕ/мл сулодексида

Полученные данные свидетельствуют о снижении миграционной активности первичных культур HUVEC при воздействии баллонной ангиопластики можно рассматривать как негативный процесс, связанный с механическим повреждением эндотелиоцитов. Инкубация первичных культур HUVEC с сулодексидом характеризуется увеличением миграционной активности культур эндотелиоцитов, как нативных, так и полученных в модели баллонной ангиопластики.

В ходе эксперимента по оценке относительного количества белков маркеров EndMT методом Вестерн-блота было зафиксировано понижение относительного количества vWF в первичной культуре клеток HUVEC после добавления в кондиционную среду препарата сулодексида в концентрациях 0,1 ЛЕ/мл на 47% ($p=0,0001$), 0,25 ЛЕ/мл на 47,3% ($p=0,0001$), 1,0 ЛЕ/мл на 45,6% ($p=0,0002$), 5,0 ЛЕ/мл на 52,7% ($p<0,0001$) по сравнению с контролем. Это может свидетельствовать о влиянии сулодексида на фактор vWF, отвечающий за воспалительные реакции, прокоагуляционную активность, понижая его активность, что соответствует терапевтическими эффектами данного препарата указанным в инструкции по применению и данными полученными в

клинической части исследования. По результатам вестерн-блота не было зафиксировано изменения относительного количества VIM в первичной культуре клеток HUVEC после добавления в кондиционную среду сулодексида в различных концентрациях по сравнению с контролем. При оценке экспрессии TGF β 1 было зафиксировано изменение относительного количества в первичной культуре клеток HUVEC после добавления в кондиционную среду препарата сулодексид в концентрациях 1,0 ЛЕ/мл (на 14,3%) и при концентрации 5,0 ЛЕ/мл (на 22,7%) по сравнению с контролем. Это может говорить об ингибирующем влиянии сулодексида на EndMT и соотносится с данными, полученными в клинической части исследования. По результатам Вестерн-блота было зафиксировано понижение относительного количества vWF в первичной культуре клеток HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики и добавления в кондиционную среду препарата сулодексид в концентрациях 0,25 ЛЕ/мл на 48,6% ($p=0,0039$), 0,5 ЛЕ/мл на 49,0% ($p=0,0037$), 1,0 ЛЕ/мл на 50,0% ($p=0,0032$) 5,0 ЛЕ/мл на 51,6% ($p=0,0025$) по сравнению с контролем, что соотносится с данными, полученными в эксперименте с нативными культурами HUVEC. В культурах эндотелиальных клеток HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики было зафиксировано значимое повышение экспрессии CD31 при добавлении сулодексида в концентрации 0,25 ЛЕ/мл (на 28,3%), 0,5 ЛЕ/мл (на 34%) 1,0 ЛЕ/мл (на 37,6%), 5,0 ЛЕ/мл(на 42,6%); данное повышение экспрессии может свидетельствовать о том, что в нативных эндотелиоцитах и эндотелиоцитах после моделирования баллонной ангиопластики сулодексид способствует повышению относительного количества основного белка межклеточных контактов данных клеток – CD31. Экспрессия α SMA в эксперименте с первичной культурой HUVEC после моделирования баллонной ангиопластикии добавлении различных концентраций сулодексида, статистически значимо не изменялась. По результатам Вестерн-блота с культурами HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики было зафиксировано значимое изменение относительного количества VIM в первичной культуре клеток HUVEC после добавления в кондиционную среду

препарата сулодексид в концентрации 0,25 ЛЕ/мл (на 20,3%) ($p=0,0095$), 0,5 ЛЕ/мл (на 34%) ($p=0,0008$), 1,0 ЛЕ/мл (на 37,6%) ($p=0,0046$), 5,0 ЛЕ/мл (на 42,7%) ($p=0,0015$) по сравнению с контролем. Данные результаты могут свидетельствовать о влиянии сулодексида на относительное количество данного белка в первичной культуре HUVEC в модели баллонной ангиопластики, и возможном снижении активности EndMT под воздействием данного препарата, что соотносится с данными клинической части исследования. Было зафиксировано изменение относительного количества TGF β 1 в первичной культуре клеток HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики и добавления в кондиционную среду препарата сулодексид в концентрациях 0,25 ЛЕ/мл (на 33,3%) ($p=0,0041$), 0,5 ЛЕ/мл (на 27,3%) ($p=0,016$), и при концентрации 5,0 ЛЕ/мл (на 36,6%) ($p=0,0023$), по сравнению с контролем. Это может говорить об ингибирующем влиянии сулодексида на EndMT и соотносится с данными, полученными в клинической части исследования и результатами эксперимента с нативными культурами HUVEC. При межгрупповом анализе относительного количества маркеров EndMT в культурах нативных HUVEC и HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики зафиксировано статистически значимое повышение относительной концентрации vWF у клеток после моделирования баллонной ангиопластики на 42% ($p=0,0098$), что может быть связано с повышением белка маркера воспаления после механического повреждения эндотелиоцитов. Помимо этого, при межгрупповом анализе зафиксировано статистически значимое повышение относительного количества VIM после моделирования баллонной ангиопластики на 60,6% ($p=0,0019$), что может быть связано с процессом эндотелиально-мезенхимального перехода и повышением экспрессии мезенхимальных маркеров после механического повреждения эндотелиоцитов.

В клинической части исследования уровень vWF в консервативной группе пациентов, получающих сулодексид повышался, а в экспериментальной части исследования, при воздействии данным препаратом на клетки HUVEC его экспрессия статистически значимо снижалась, подобное расхождение может

свидетельствовать о выбросе данного белка в кровеносное русло *in vivo* и дальнейшей его детекцией методом ИФА в плазме пациентов с ОААНК. Помимо этого, при межгрупповом анализе относительного количества маркеров EndMT в культурах нативных HUVEC и HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики зафиксировано статистически значимое повышение относительного количества VIM после моделирования баллонной ангиопластики на 35,3% ($p=0,007$), что может быть связано с процессом эндотелиально-мезенхимального перехода ввиду повышения экспрессии белка VIM, ассоциированного с EndMT.

Клиническая часть исследования

Статистический анализ данных клинической части исследования показал, что реваскуляризирующая операция (в объеме баллонной ангиопластики и/или Статистически значимое увеличение ЛПИ в оперативной группе относительно точки включения в исследование (V0) и первой контрольной точки (V1) (на 81,25%), свидетельствует об эффективности реваскуляризирующей операции (баллонной ангиопластики и/или стентирования) $p=0,001$. Отмечается статистически значимое снижение уровня ЛПИ (на 26,03%) в оперативной группе в контрольных точках V1 и V2, что может быть связано с развитием рестеноза в зоне оперативного вмешательства. В оперативной группе наблюдается статистически значимое повышение уровня vWF в V0 (на 31,25%) в V1 (на 57%) в V2 ($p=0,002$), что, вероятно, связано с тем, что ангиопластика вызывает активацию эндотелиоцитов в ответ на механическое воздействие; это проявляется повышением уровня маркера воспаления и гемостатической дисфункции vWF.

В консервативной группе в течение трёх месяцев зафиксировано статистически значимое снижение ЛПИ. Данные изменения можно связать с процессом прогрессирования атеросклероза в течении трёх месяцев. Помимо этого, в данной группе пациентов статистически значимо снижался уровень vWF; подобное снижение маркера воспаления и гиперкоагуляции можно связать с положительным воздействием сулодексида. Было зафиксировано значимое

повышение уровня CD31 данные изменения можно связать с положительным влиянием сулодексида на основной маркер клеточных контактов эндотелиоцитов ($p < 0,001$). Было зафиксировано значимое снижение уровня TGF β 1, что может свидетельствовать о существенном ингибирующем влиянии сулодексида на ключевой маркер EndMT.

Были получены статистически значимые различия между показателями ЛПИ между оперативной и консервативной группой через 3 месяца после включения в исследование, в оперативной группе ЛПИ превышал данный показатель в консервативной на 44,06%, данное явление можно связать с эффективностью оперативного лечения в течении 3х месяцев ($p = 0,027$). Помимо этого, в оперативной группе зафиксировано более низкое значение такого показателя как α SMA (на 24,1%), данные изменения могут характеризовать особенности ответа клеточных элементов сосудистой стенки на механическое воздействие при баллонной ангиопластике. Важно отметить, что в норме α SMA в эндотелиоцитах не содержится, этим можно объяснить отсутствие влияние сулодексида на изменение уровня данного маркера.

В оперативной группе спустя три месяца после включения наблюдается более высокий уровень vWF (на 196,64%) в сравнении с группой, получавшей только консервативное лечение с сулодексидом. Данное явление можно связать с двумя факторами. Первый - ангиопластика, которая вызывает активацию эндотелия в ответ на механическое воздействие, что в свою очередь проявляется избыточной экспрессией маркера воспаления и гемостатической дисфункции vWF. Второй – это противовоспалительное действие препарата сулодексид. Меньшие значения такого показателя как CD31 в оперативной группе, относительно консервативной (на 13,09%), вероятно, связано с проявлениями эндотелиальной дисфункции в виду заведомо более тяжёлой стадии заболевания и перенесённой операцией в оперативной группе в ответ на механическое воздействие. Полученные данные представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Динамика количественных маркеров EndMT

Группа	Показатель	V0	V1	V2	p
Оперативная	ЛПИ	0,46 (0,31-0,73)	0,83 (0,69-1,15)	0,66 (0,4-0,81)	0,001 0-1 p=0,101 0-2 p=0,438 1-2 p=0,001
	α SMA, нг/мл	1,92 (1,32-2,62)	1,97 (1,51-2,65)	1,66 (1,12-2,14)	0,217
	vWF, нг/мл	79,57 (51,6-130,02)	104,35 (74,95- 147,63)	163,63 (88,85- 202,04)	0,002 0-1 p=0,172 0-2 p=0,002 1-2 p=0,353
	CD31, нг/мл	5,02 (4,03-5,52)	4,75 (3,85-5,86)	5,5 (5,06-6,32)	0,068
	VIM, нг/мл	3,21 (1,84-6,82)	4,12 (2,76-6,52)	4,16 (2,61-5,61)	0,218
	TGF β 1, нг/мл	210,13 (131,51- 721,5)	321,97 (180,36- 757,95)	162,49 (132,24- 187,2)	0,082
Консервативная	ЛПИ	0,49 (0,42-0,55)	-	0,455 (0,4-0,535)	0,005
	α SMA, нг/мл	1,91 (1,37-2,88)	-	2,06 (1,54-2,65)	0,317
	vWF, нг/мл	51,6 (33,64-93,72)	-	41,24 (32,32- 46,2)	0,004
	CD31, нг/мл	5,03 (4,37-6,12)	-	6,22 (5,72-6,6)	<0,001
	VIM, нг/мл	5,01 (2,36-10,2)	-	3,83 (1,7-5,18)	0,047
	TGF β 1, нг/мл	397,81 (153,11-873)	-	162,85 (146,85- 178,5)	0,001

ВЫВОДЫ

1. Разработанная в ходе экспериментальной части исследования модель баллонной ангиопластики позволяет получить первичные культуры HUVEC с измененной метаболической (митохондриальной) и миграционной активностью для изучения эндотелиально-мезенхимального перехода *in vitro*.

2. Моделирование баллонной ангиопластики характеризуется изменением

параметров эндотелиально-мезенхимального перехода: повышением относительного количества vWF на 42% ($p=0,0098$); VIM на 60,6% ($p=0,0019$); TGF β 1 на 35,3% ($p=0,007$) в лизате первичных культур HUVEC.

3. Применение сулодексида в концентрации 0,25 ЛЕ/мл способствует: повышению относительного количества CD31 (на 28,3%), 0,5 ЛЕ/мл (на 34%) 1,0 ЛЕ/мл (на 37,6%), 5,0 ЛЕ/мл (на 42,6%); понижению vWF в концентрациях 0,25 ЛЕ/мл на 48,6% ($p=0,0039$), 0,5 ЛЕ/мл на 49,0% ($p=0,0037$), 1,0 ЛЕ/мл на 50,0% ($p=0,0032$) 5,0 ЛЕ/мл на 51,6% ($p=0,0025$) в первичных культурах HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики; понижению vWF в концентрациях 0,1 ЛЕ/мл на 47% ($p=0,0001$), 0,25 ЛЕ/мл на 47,3% ($p=0,0001$), 1,0 ЛЕ/мл на 45,6% ($p=0,0002$), 5,0 ЛЕ/мл на 52,7% ($p<0,0001$); понижению TGF β в концентрациях 1,0 ЛЕ/мл на 14,3%, 5,0 ЛЕ/мл на 22,7% ($p=0,007$); понижению VIM в концентрациях 0,25 ЛЕ/мл на 20,3% ($p=0,0095$), 0,5 ЛЕ/мл на 34% ($p=0,0008$), 1,0 ЛЕ/мл на 37,6% ($p=0,0046$), 5,0 ЛЕ/мл на 42,7% ($p=0,0015$); понижению TGF β 1 концентрациях 0,25 ЛЕ/мл на 33,3% ($p=0,0041$), 0,5 ЛЕ/мл на 27,3% ($p=0,016$), и при концентрации 5,0 ЛЕ/мл на 36,6% ($p=0,0023$) в нативных культурах HUVEC.

4. Частота развития неблагоприятных исходов после эндоваскулярного лечения пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей в срок 12 месяцев составила: рестенозов – 21 случай (52,5%), прогрессирования стадии ХИНК – 17 случаев (42,5%), тромбозов – 2 случая (5%), повторных операций – 10 случаев (25%), летальных исходов - 4(10%), ампутаций - 10(25%), у пациентов оперативной группы IIb-IV стадии заболевания по классификации А.В. Покровского. У пациентов консервативной группы II-IV стадии заболевания по классификации А.В. Покровского прогрессирование стадии ХИНК выявлено в 6 случаях (15%) тромбозов не выявлено, необходимость в повторных операциях на артериях нижних конечностей возникла в 2 случаях (5%), количество летальных исходов составило 4 случая (10%), ампутаций не было.

5. У пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних

конечностей на фоне эндоваскулярного лечения отмечаются статистически значимое повышение уровня vWF с 79,57 (51,6-130,02) нг/мл в момент включения в исследование, на 31,25% спустя 1 месяц после операции и на 57% к 3 месяцу после операции ($p=0,002$). В группе консервативного лечения статистически значимо снижался уровень vWF с 51,6 (33,64-93,72) нг/мл до 41,24 (32,32-46,2) нг/мл ($p=0,004$); повышался уровень CD31 с 5,03 (4,37-6,12) нг/мл до 6,22 (5,72-6,6) нг/мл ($p<0,001$); было зафиксировано значимое снижение уровня TGF β 1 с 397,81 (153,11-87) нг/мл до 162,85 (146,85-178,5) нг/мл ($p=0,001$). Остальные показатели не достигли статистически значимых различий.

6. Развитие рестеноза в течение трёх месяцев после эндоваскулярного оперативного вмешательства ассоциировалось с уровнем CD31 в сыворотке или плазме крови до операции равном или выше 5,29 нг/мл. При уровне VIM до операции равном или ниже 4,38 нг/мл прогнозируется развитие рестеноза в течение 1 года после операции. На основе полученных данных построены прогностические модели развития рестеноза у пациентов с данной патологией.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В научно-исследовательских лабораториях рекомендуется использовать предложенный способ моделирования баллонной ангиопластики для получения клеточных культур эндотелиоцитов со сниженной миграционной и метаболической активностью.

2. Для оценки параметров EndMT при моделировании баллонной ангиопластики возможно использование методики вестерн-блот.

3. Пациентам с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей рекомендуется назначение сулодексида с целью снижения уровня мезенхимальных маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода.

4. Пациентам с ОААНК целесообразно оценивать относительное количество маркеров EndMT (CD31, vWF, VIM, TGF β 1) в сыворотке/плазме крови для прогнозирования развития неблагоприятных исходов.

5. Пациентам с ОААНК целесообразно оценивать уровень маркера EndMT -трансформирующего фактора роста β 1 в крови для прогнозирования

летального исхода в течении года после эндоваскулярного оперативного вмешательства.

6. Пациентам с ОААНК целесообразно оценивать уровень маркера EndMT виментина в крови для прогнозирования прогрессирования рестеноза и стадии ХИНК в течение года после эндоваскулярного оперативного лечения на артериях нижних конечностей.

7. Пациентам с ОААНК целесообразно оценивать уровень маркера EndMT CD31 в крови до операции для прогнозирования прогрессирования рестеноза в течении трёх месяцев после эндоваскулярного оперативного лечения на артериях нижних конечностей.

8. Пациентам с ОААНК целесообразно оценивать уровень маркера EndMT фактора фон Виллебранда в крови до операции для прогнозирования летального исхода в течение года после эндоваскулярного оперативного лечения на артериях нижних конечностей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Роль эндотелиально-мезенхимального перехода в развитии рестенозов после эндоваскулярного лечения пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков И.А., Н.Д. Мжаванадзе, **И.Ю. Суров** // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2023. – Т. 16, № 5. – С. 469-473.

2. Виментин как потенциальный маркер рестеноза после эндоваскулярных операций на артериях нижних конечностей / **И.Ю. Суров** [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. Журнал имени академика А.В. Покровского. – 2025. – Т. 31, №1. – С. 69-75. (соавт. Калинин Р.Е., Пшенников А.С., Мжаванадзе Н.Д., Никифоров А.А., Поваров В.О., Сучков И.А.) DOI: 10.33029/1027-6661-2025-31-1-69-75.

3. Трансформирующий фактор роста бета 1 (TGF- β 1) у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей при эндоваскулярном и консервативном лечении / **И.Ю. Суров** [и др.] // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2025. – Т. 13, № 2. – С. 285-294. (соавт. Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, А.С. Пшенников, Л.В. Никифорова, Ю. В. Абаленихина, В.О. Поваров, Н.Д. Мжаванадзе) DOI: 10.23888/HMJ2025132285-293

4. Показатели эндотелиально-мезенхимального перехода у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей / Калинин Р.Е., Сучков И.А., Пшенников А.С., Мжаванадзе Н.Д., Поваров В.О., Никифоров А.А., **Суров И.Ю.**, Стрельникова Е.А. // в книге: Горизонты современной ангиологии, сосудистой и рентгенэндоваскулярной хирургии. Материалы XXXIX Международной конференции. Москва, 2024. – С. 219-220.

5. Стрельникова Е.А., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Короткова Н.В., **Суров И.Ю.** Способы моделирования эндотелиально-мезенхимального перехода в изучении сердечно-сосудистых заболеваний *in vitro* // в сборнике: Актуальные вопросы сердечно-сосудистой хирургии. Материалы Всероссийской научно-практической конференции. Курск, 2024. – С. 14-16.

6. **Суров И.Ю.**, Поваров В.О., Никифоров А.А., Никифорова Л.В. Взаимосвязь биохимических показателей крови с развитием рестеноза при эндоваскулярных вмешательствах у пациентов с атеросклерозом // II Рязанский кардиологический конгресс 16.11.2024 (постерный доклад).

7. **Суров И.Ю.**, Калинин Р.Е., Мжаванадзе Н.Д., Короткова Н.В., Стрельникова Е.А., Никифорова Л.В., Никифоров А.А., Поваров В.О., Захаров А.С., Калинина А.Р. Изменения метаболической и миграционной активности первичной культуры эндотелиоцитов в модели баллонной ангиопластики *in vitro* // Материалы VI Национального конгресса по регенеративной медицине [электронный ресурс]; Санкт-Петербург, 13–15 ноября 2024 г. Санкт-Петербург: Эко-Вектор, 2024. – С. 958–959.

8. Патент RU 2841982 C1 (51). Способ прогнозирования развития рестеноза на основании значений виментина (VIM) в сыворотке крови у пациентов после проведения эндоваскулярного оперативного вмешательства на артериях нижних конечностей / Калинин Р.Е., Сучков И.А., Пшенников А.С., **Суров И.Ю.**, Мжаванадзе Н.Д., Поваров В.О.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – Заявка: 2024130335, опубл. 08.10.2024.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БЛП – баллон с лекарственным покрытием

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГМК – гладкомышечные клетки

ОААНК – атеросклерозом артерий нижних конечностей

ИБС – ишемическая болезнь сердца

КИНК – критическая ишемия нижних конечностей

ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс

ПХ – перемежающаяся хромота

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ХИНК – хроническая ишемия нижних конечностей

α SMA – альфа-актин гладких мышц (α -Smooth muscle actin)

CD31 – кластер дифференцировки 31 (cluster of differentiation 31)

EndMT – эндотелиально-мезенхимальный переход (endothelial to mesenchymal transition)

HUVEC – эндотелиальные клетки пупочной вены человека (human umbilical cell)

PECAM-1 – молекула адгезии тромбоцит-эндотелиальных клеток (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1)

ROC-кривая – рабочая характеристика приёмника (receiver operator characteristic)

TGF β 1 – трансформирующий фактор роста бета (transforming growth factor beta)

VIM – виментин (vimentin)

vWF – фактор фон Виллебранда (von Willebrand factor)