

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Короткова Наталья Васильевна

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

1.5.4. Биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук, профессор
Калинин Роман Евгеньевич

Рязань – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	25
1.1. Эндотелий: современные представления о строении и участии в биохимических процессах.....	25
1.2. Адгезивная функция эндотелия как звено эндотелиальной дисфункции....	29
1.3. Селектины - белки клеточной адгезии: общие представления.....	31
1.3.1. Р-селектин: структура, функции и участие в биохимических процессах.....	40
1.3.2. Е-селектин: структура, функции и участие в биохимических процессах.....	42
1.3.3. L-селектин: структура, функции и участие в биохимических процессах.....	48
1.4. PSGL-1 – общий лиганд селектинов.....	51
1.4.1. Структура PSGL-1 и его посттрансляционные модификации.....	51
1.4.2. Взаимодействие PSGL-1 с цитоскелетом клетки, с селектинами и инициируемые им биохимические сигнальные каскады	56
1.5. Участие селектинов и PSGL-1 в патологии.....	62
1.6. Современные представления о цикле оксида азота, как возможном регуляторе функционирования селектинов.....	64
1.6.1. Роль оксида азота (II) и его метаболитов в регуляции процессов свободно-радикального окисления.....	64
1.6.2. Синтазы оксида азота и их роль в патологии.....	68
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	74
2.1. Клиническая характеристика пациентов.....	76
2.2. Характеристика клеточных линий.....	85
2.3. Получение материала для исследований.....	85
2.3.1. Получение сыворотки крови от доноров и пациентов	85
2.3.2. Получение и культивирование первичной линии эндотелиоцитов	86
2.4. Приготовление клеточных лизатов	89

2.4.1. Приготовление клеточных лизатов	89
для проведения анализа вестерн-блот.....	89
2.4.2. Получение клеточных лизатов для проведения биохимических исследований	90
2.5. Фракционирование, культивирование и получение гомогенатов лейкоцитов	90
2.6. Получение пероксинитрита для экспериментальных исследований	92
2.7. Дизайн экспериментального исследования	92
2.7.1. Влияние пероксинитрита на селектины P, E, синтазы NO и показатели нитрозилирующего стресса.....	93
2.7.2. Влияние S-нитрозоглутатиона на селектины P, E, синтазы NO и показатели нитрозилирующего стресса.....	93
2.7.3. Влияние пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона на селектин L и PSGL-1	93
2.8. Определение метаболической активности клеток с применением МТТ-теста	94
2.9. Биохимические методы исследования	96
2.9.1. Определение абсолютного количества sP-, sE-, sL-селектинов, их универсального лиганда PSGL-1 и NO-синтаз.....	96
2.9.2. Определение абсолютного количества нитротирозина.....	96
2.9.3. Определение концентрации стабильных метаболитов оксида азота (II).....	97
2.9.4. Определение битирозина.....	98
2.9.5. Определение относительного количества P- и E-селектинов, NO-синтаз методом вестерн-блот	98
2.9.6. Определение концентрации белка по методу Бредфорда.....	100
2.9.7. Оценка интенсивности окислительной модификации белков в сыворотке крови	101
2.9.8. Оценка концентрации пероксинитрита в сыворотке крови.....	102
пациентов и в клеточных лизатах.....	102

2.10. Методы статистической обработки полученных результатов.....	102
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ КЛИНИЧЕСКОГО	
МАТЕРИАЛА И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	104
3.1. Изучение показателей адгезивной функции эндотелия и степени выраженности нитрозативного стресса у пациентов с сосудистой патологией нижних конечностей: общие тенденции.....	104
3.2. Изучение показателей адгезивной функции эндотелия и степени выраженности нитрозативного стресса в зависимости от типа сосудистой патологии	111
3.2.1. Оценка уровня селектинов sP, sE, sL	111
3.2.2. Оценка уровня PSGL-1	113
3.2.3. Оценка уровня индуцибельной и эндотелиальной синтазы.....	114
оксида азота (II).....	114
3.2.4. Анализ степени выраженности нитрозативного/оксидативного стресса у пациентов с сосудистыми заболеваниями: стабильные метаболиты оксида азота, нитротирозин, битирозин, пероксинитрит и спонтанная окислительная модификация белков.....	115
3.3. Изучение показателей адгезивной функции эндотелия и степени выраженности нитрозативного стресса у пациентов с сосудистой патологией в зависимости от клинических особенностей течения заболевания.....	126
3.3.1. Изучение показателей адгезивной функции эндотелия и степени выраженности нитрозативного стресса у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей в зависимости от стадии хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротической этиологии по классификации	127
А.В. Покровского-Фонтейна.....	127
3.3.2. Изучение показателей адгезивной функции эндотелия и степени выраженности нитрозативного стресса у пациентов с артериальными тромбоэмболическими осложнениями в зависимости от наличия артериального тромба или артериальной тромбоэмболии.....	132

3.3.3. Изучение показателей адгезивной функции эндотелия и степени выраженности нитрозативного стресса у пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей в зависимости от клинического класса ХЗВ по классификации CEAP	138
3.3.4. Изучение показателей адгезивной функции эндотелия и степени выраженности нитрозативного стресса у пациентов с острым венозным тромбозом нижних конечностей в зависимости от локализации тромба	144
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ	
ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	158
4.1. Оценка принадлежности полученных эндотелиальных клеток к линии HUVEC	158
4.2. Моделирование нитрозативного стресса на культуре клеток HUVEC путем внесения растворов пероксинитрита и изучение его показателей	160
4.2.1. Оценка метаболической активности эндотелиоцитов (HUVEC) при моделировании нитрозативного стресса	162
4.2.2. Оценка выраженности нитрозативного стресса при его экспериментальном моделировании по маркерам: стабильным метаболитам оксида азота, битирозину, пероксинитриту	163
4.2.3. Оценка относительного количества Р- и Е-селектинов в лизатах эндотелиоцитов методом вестерн-блот	165
4.2.4. Оценка относительного количества индуцибельной и эндотелиальной синтазы оксида азота (II) в лизатах эндотелиоцитов методом вестерн-блот	170
4.2.5. Оценка абсолютного количества sP- и sE-селектинов в кондиционной среде методом ИФА	174
4.3. Моделирование условий изменения уровня оксида азота (II) на культуре клеток HUVEC путем внесения растворов его донатора S-нитрозоглутатиона	178
4.3.1. Оценка метаболической активности эндотелиоцитов (HUVEC) при их инкубации с донатором оксида азота (II) S-нитрозоглутатионом	178

4.3.2. Оценка выраженности нитрозативного стресса по маркерам: стабильным метаболитам оксида азота, битирозину, пероксинитриту	179
4.3.3. Оценка относительного количества селектинов Р и Е в лизатах эндотелиоцитов методом вестерн-блот.....	181
4.3.4. Оценка относительного количества индуцибельной и эндотелиальной синтазы оксида азота (II) в лизатах эндотелиоцитов методом вестерн-блот.....	185
4.3.5. Оценка абсолютного количества sP- и sE-селектинов	190
в кондиционной среде методом ИФА.....	190
4.4. Оценка абсолютного количества белков селектина L и PSGL-1 при инкубации клеток HUVEC с пероксинитритом и S-нитрозоглутатионом в различных фракциях лейкоцитов.....	195
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	201
ВЫВОДЫ.....	216
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	219
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	220
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	226

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

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

Адгезивные взаимодействия, как между самими клетками, так и между клетками и компонентами внеклеточного матрикса – это важнейший этап биохимических и физиологических процессов. 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 [220].

Активно изучаются взаимодействия отдельных клеток: лейкоцитов, тромбоцитов и эндотелиоцитов между собой, как перспективная мишень в консервативной терапии при прогрессировании различных нозологий. 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 [229], ишемии и реперфузии [86], а также в понимании механизмов регуляции и коррекции последних [308].

На сегодняшний день известны пять классов молекул межклеточной адгезии: интегрины, кадгерины, иммуноглобулины (в том числе нектины), селектины и адрессины. Селектины являются трансмембранными гликопротеинами, высоко асимметричными сложными белками мозаичного строения [96]. 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; Ca^{2+} -зависимого трансмембранного, удерживающего белок в клеточной мембране; домена, подобного эпидермальному фактору роста; домена, содержащего богатые цистеином гомологичные tandemные повторы (от 1 до 9), представляющего основную часть молекулы; N-концевого, расположенного вне клетки, ответственного за распознавание углеводов [333].

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 [236].

Начальный этап каскада адгезии опосредуется специфическими нековалентными взаимодействиями между селектинами и их гликановыми лигандами, при этом гликаны служат связующим звеном между лейкоцитами и эндотелием или раковыми клетками и эндотелием [109, 115, 133]. Селектины взаимодействуют с лигандами, представленными олигосахаридами, с участием ионов кальция. Было показано, что все три селектина распознают общий мотив: сиалированный и фукозилированный тетрасахарид SialylLewisX (sLeX) и его изомерную форму Sialyl Lewis A (sLeA) [113], являющийся терминальным компонентом некоторых N- и O-гликанов. Сродство к связыванию гликановых детерминант sLeX и sLeA находится в миллимолярном диапазоне, они являются важными компонентами многих гликопротеинов и гликолипидных лигандов, которые часто присутствуют в структуре белков и участвуют в многовалентных взаимодействиях. Нацеленность на эти взаимодействия остается одной из основных стратегий разработки новых методов лечения иммунных, воспалительных и онкологических заболеваний.

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 [130]. Существует мнение, что среди адгезионных молекул именно семейство селектинов с их лигандами является одним из основных вкладчиков в межклеточные взаимодействия [148]. 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) [262]. 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 АФА образуется токсичный продукт пероксинитрит и ряд других реактивно способных соединений, и, как следствие, происходит развитие патологии [289].

Пероксинитрит ингибирует ферменты дыхательной цепи, снижая уровень потребления кислорода клетками и приводя к митохондриальной дисфункции [319]. 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, 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 [142].

Решающую роль в выборе клеточного ответа играет уровень сигнала – низкие концентрации пероксинитрита стимулируют защитные системы клетки, а высокие приводят к разрушению клеточных структур и вызывают апоптоз [200]. Пероксинитрит может выполнять регулирующие функции в организме, модифицировать структуры биомолекул, вовлечённых в процессы клеточной сигнализации [111]. 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, Hossain M. с соавторами показали, что введение метилового эфира NG-нитро-L-аргинина (L-NAME) повышает экспрессию Р- и Е-селектинов, но не влияет на адгезию нейтрофилов к клеткам HUVEC [188]. Тем не менее, роль нитрозилирующих токсичных метаболитов оксида азота изучена недостаточно.

Таким образом, изучение роли семейства селектинов в процессе связывания лейкоцитов с клетками эндотелия в условиях нитрозативного стресса (НС) представляется на сегодняшний день актуальным направлением, имеющим важное биомедицинское значение. Разработка представленной темы поможет расширить фундаментальные представления о нарушении механизмов клеточной адгезии вследствие нитрозативного повреждения селектинов, и послужить основой для дальнейших исследований в области коррекции последствий нитрозативного стресса у пациентов с нарушением адгезивной функции на фоне сосудистой патологии.

Степень разработанности темы

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 [179], и по сей день эндотелий вызывает пристальное внимание учёных. Эндотелий и ЭД играют важную роль в патогенезе ряда системных заболеваний, в том числе, сердечно-сосудистых – атеросклероза сосудов нижних конечностей и коронарных сосудов [119,159], дилатационной кардиомиопатии, острого венозного тромбоза [35], хронических заболеваний вен (ХЗВ) [335], лёгочной гипертензии [315], сахарного диабета [152].

Активно изучается и адгезивная функция эндотелия при патологии: с одной стороны, предметом изучения являются жизнеспособность эндотелиоцитов в экспериментальных условиях [140] и взаимодействия между эндотелиоцитами: поддержание целостности метаболически активного органа, и контроль за перемещением растворённых веществ между кровотоком и тканями [81, 216]. С другой стороны, изучаются взаимодействия между лейкоцитами и эндотелиоцитами; и движение лейкоцитов из кровеносного русла в ткани, в частности, в очаги инфекции и воспаления [250], 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 [1, 14, 60].

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 [15, 40]. 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 [1, 111].

S-нитрозоглутатион представляет собою эндогенный нитрозотиол, синтезирующийся в организме и выполняющий роль переносчика и мягкого донатора NO [61]. 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, NOS I), ингибируя её путём снижения активности фосфорилирующей её протеинкиназы [116]. В современной научной литературе есть работы, описывающие функционирование молекул клеточной адгезии в условиях ОС [261], 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 [4, 34, 69]. Был получен 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 [50]. На кафедре сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики активно в течение продолжительного времени изучаются различные аспекты эндотелиальной дисфункции [30, 42, 64].

Тем не менее, одно из важных звеньев функционирования эндотелия, а именно, адгезия клеток, характеризующаяся уровнем специфических молекул-селектинов, в условиях НС практически не изучалась. В связи с этим, целесообразным является проведение исследования уровня селектинов у пациентов с патологией сосудов нижних конечностей во взаимосвязи с показателями нитрозативного повреждения и уровнем эндотелиальной (eNOS, NOSIII) и индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS, NOSII); и экспериментальное исследование на первичной культуре эндотелиальных клеток: изменение относительного количества селектинов Р и Е, абсолютного количества селектина L и лиганда PSGL-1 во фракционированных лейкоцитах периферической крови в условиях воздействия токсического продукта пероксинитрита и эндогенного донатора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона.

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/нитрозилирующего 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/нитрозилирующего 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 нитрозилирующего 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 нитрозилирующего 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 нитрозилирующего 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 исследования

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, 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 (GSNO) в различных концентрациях было продемонстрировано развитие нитрозилирующего стресса, что подтверждалось снижением активности митохондриальных дегидрогеназ, а также 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 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

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 CKX41 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.

Базы данных по исследуемым пациентам были сформированы в таблицах MS Office Excel (Microsoft, США). Для проведения статистического анализа использовалась программа IBM SPSS 26 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc. Chicago, IL, United States) и GrapH Pad Prizm 9.

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: стабильных 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 CEAP. 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 E 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*.

Внедрение результатов исследования

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.

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 (Dushanbe), 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 Ecology NT+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.).

Апробация диссертации состоялась 25 июня 2025 года на межкафедральном совещании кафедр биологической химии; фармакологии; сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики; математики, физики и медицинской информатики; ЦНИЛ 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.

Конфликт интересов

Исследование в полном объеме выполнено за счет бюджета ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Иных финансовых и других конфликтных интересов, получения вознаграждения ни в какой форме от фирм-производителей диагностического и лабораторного оборудования нет.

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.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность научному консультанту, ректору ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, д.м.н., профессору Калинину Роману Евгеньевичу; проректору по научной работе и инновационному развитию ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, д.м.н., профессору Сучкову Игорю Александровичу; профессору кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, д.м.н. Мжаванадзе Нине Джансуговне, а также заведующему ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, к.м.н. Никифорову Александру Алексеевичу за всестороннюю помощь и поддержку на всех этапах научного исследования.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эндотелий: современные представления о строении и участии в биохимических процессах

Материалы данного раздела опубликованы в статье:

Калинин Р.Е., Сучков И.А., Короткова Н.В., Мжаванадзе Н.Д. Изучение молекулярных механизмов эндотелиальной дисфункции in vitro. Гены и клетки. 2019. Том 14, №1. С. 22-32. DOI: 10.23868/201903003

Эндотелий на данном этапе развития науки признан базисом всей системы кровообращения и вызывает неослабевающий интерес среди учёных всего мира [23, 78]. С момента начала его изучения швейцарским анатомом, гистологом и эмбриологом Вильгельмом Гисом (His W., 1865) [47], который и предложил термин «эндотелий», до настоящего времени современная медицина накопила значительный объем сведений о его структуре, свойствах и функционировании, а также о большом количестве биологически активных молекул, к синтезу которых он способен в нормальном состоянии и при патологии, называемой эндотелиальной дисфункцией, и сопровождающей ряд заболеваний, в том числе, кардиоваскулярных [10, 11, 75, 77].

В середине прошлого столетия, в 1946 году, русский ученый, Николай Григорьевич Хлопин, пришел к выводу о том, что эндотелий представляет собой «особый высокоспециализированный тканевой тип, обладающий морфофизиологической характеристикой, так называемых, эпителиальных тканей и качественно отличным на данном этапе эволюции от соединительной ткани; ...биологические особенности эндотелия обнаруживают далеко идущую дивергенцию и специализацию, делающие невозможным их отождествление на данном этапе эволюции» [71]. Как уже упоминалось ранее, в 1980 году была показана роль эндотелия, как самостоятельного регулятора сосудистого тонуса, вводя ацетилхолин в интактный сосуд и вызывая тем самым вазодилатацию и

ускорение скорости кровотока. При этом было отмечено, что в условиях нарушенной функции эндотелия реакция сосуда на введение ацетилхолина может быть парадоксальной и приводить к спазмированию сосуда [179].

Сегодня известно, что эндотелий представляет собою один пласт эндотелиоцитов – специфической формы клеток, как описывал их Гис в своем трактате «Оболочки и полости организма»: «уплощенная форма, прозрачность, неспособность к дальнейшим изменениям и процессам роста» [47]. Впоследствии было установлено, что, выстилая кровеносные, лимфатические сосуды и камеры сердца, именно они играют большую роль в поддержании сосудистого гомеостаза, регуляции сосудистого тонуса и артериального давления, фильтрационной функции почек, сократительной активности сердца, метаболического обеспечения головного мозга [79, 195], в связи с этим было высказано предположение о роли эндотелия как самого крупного эндокринного органа [23, 131, 218].

Известно, что эндотелиоциты и базальная мембрана отделяют кровь от подлежащих тканей, выполняя функцию гистогематического барьера. Эндотелиальные клетки (ЭК) связаны между собою плотными и щелевидными контактами, обеспечивая при этом обмен веществ между окружающими тканями и кровью. Различные вещества способны проникать путем диффузии через поры и фенестры, в капиллярном русле возможен пиноцитоз. Таким образом, нормальный эндотелий поставляет в субэндотелиальные слои белки: коллаген, ламинин, эластин, витронектин, фибронектин; ферменты, например, протеиназы, гликозаминогликаны, то есть, компоненты, обеспечивающие выполнение функции межклеточного взаимодействия и диффузного барьера, предотвращающего попадание крови во внесосудистое пространство [16].

ЭК выполняют множественные функции, среди которых вазомоторная, адгезивная, гемостатическая, ангиогенная, барьерная, иммунологическая. Все они опосредуются генерацией эндотелием биологически важных активных соединений (Рисунок 1).

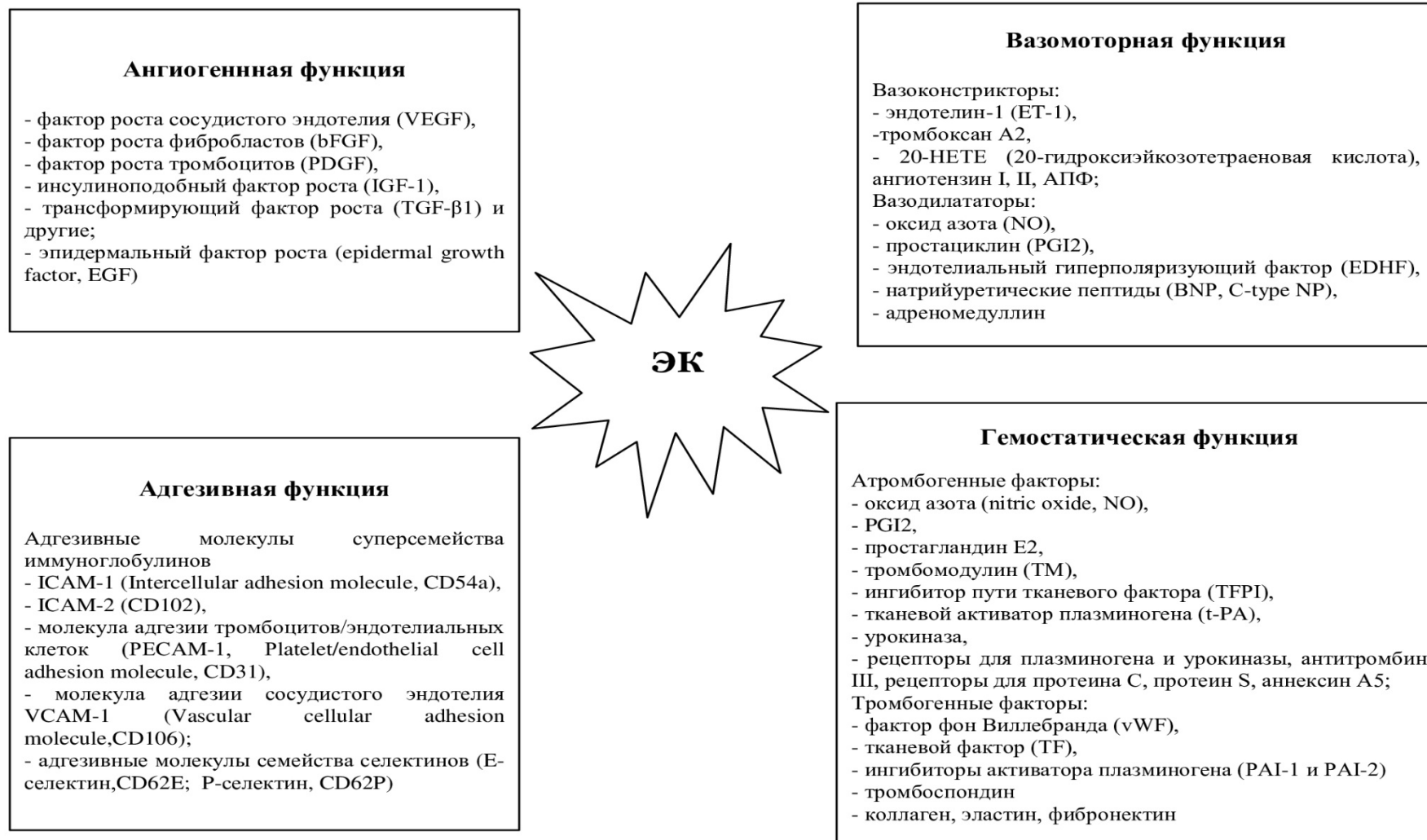


Рисунок 1 – Участие эндотелиальных клеток в обеспечении различных функций посредством синтеза биологически активных веществ

Необходимо отметить особенности основных биохимических процессов, протекающих в ЭК. В норме ЭК взрослого человека находятся в относительном функциональном покое, который обусловлен сниженной активностью аэробного гликолиза и сниженным количеством митохондрий [80]. При обычном метаболизме гликолиз в ЭК имеет преимущества перед аэробным окислением глюкозы в результате того, что лактат может выступать в качестве проангиогенной молекулы [324]. Кроме того, количество доступного для окружающих тканей кислорода остаётся на нормальном уровне; в то же время генерация активных форм кислорода снижена [153]. И, наконец, такой тип метаболизма создает почву для прорастания ЭК в гипоксическую среду, обеспечивая тем самым неоангиогенез [181, 327]. Тем не менее, в настоящее время эндотелиальным митохондриям отводится важное место в поддержании баланса между концентрацией митохондриального кальция, выработкой АФК и оксида азота (II), которые могут выполнять регуляторную роль. При переходе ЭК в состояние ангиогенеза потребление кислорода повышается в три раза, и тогда работа митохондрий становится подобной функционированию митохондрий дрожжей при эффекте Крембтри: снижение дыхания и повышение брожения при повышенном уровне глюкозы («репрессия глюкозой») [328].

Прорастание сосудов обусловлено повышающейся потребностью тканей в кислороде. Когда создаются такие условия, активируются проангиогенные факторы роста: фактор роста эндотелия сосудов (*vascular endothelial growth factor, VEGF*); фактор роста фибробластов (*fibroblast growth factor, FGF*), инсулиноподобный фактор роста (*insulin-like growth factor 1, IGF1*), эпидермальный фактор роста (*epidermal growth factor, EGF*).

При этом VEGF, взаимодействуя со своими рецепторами на эндотелии, вызывает местное расслабление сосуда с нарушением межклеточных контактов, нарушением целостности базальной мембраны и последующей миграцией ЭК. С другой стороны, VEGF способен влиять на активность гликолиза, повышая экспрессию ГЛЮТ-1 (GLUT-1, Glucose transporter), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-2,6-бисфосфатазы-3 (6-phosphofructo-2-kinase/

fructose-2,6-bisphosphatase 3, PFKFB3) [161, 339].

ЭК также активно участвуют в обмене липидов. В эндоплазматическом ретикулуме присутствуют ферменты синтеза триацилглицеринов (ТАГ). В результате возможен синтез последних *de novo*, что необходимо для миграции клеток, и формирование липидных капель. Ингибирование активности ацетил-КоА-карбоксилазы меняет липидный состав мембран ЭК, обеспечивая увеличение полиненасыщенных жирных кислот, что приводит к снижению текучести мембран, и снижению образования филоподий и миграции ЭК [91]. Возможен и гидролиз ТАГ с участием гормончувствительной триацилглицеринлипазы жировой ткани и моноацилглицеринлипазы [213]. Имеются работы, показывающие высокое содержание митохондриального разобщающего белка 2 (*mitochondrial uncoupling protein 2, UCP2*), участвующего в разобщении процессов тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, в митохондриях ЭК, и таким образом, при высоких уровнях глюкозы аэробный метаболизм ЭК сдвигается в сторону окисления липидов и аминокислот [328].

1.2. Адгезивная функция эндотелия как звено эндотелиальной дисфункции

Как уже было отмечено выше, основные функции, реализуемые эндотелием, это гемостатическая, ангиогенная, вазомоторная и адгезивная. Учитывая тот факт, что основное внимание в представленной работе будет уделено именно молекулам адгезии селектинам, необходимо осветить некоторые аспекты адгезивной функции эндотелия.

Адгезия - способность клеток связываться с целью формирования контактов между собой и с компонентами внеклеточного матрикса, а также с целью формирования определенных гистологических структур и с целью прикрепления к различным субстратам, в том числе, синтетическим, например, используемым в качестве заместительных материалов в хирургической практике [22].

Адгезия осуществляется с помощью белковых молекул, так называемых молекул межклеточной адгезии, которые экспонированы на мембранах клеток, а

рецепторы к ним присутствуют на других клетках или на межклеточном матриксе. Адгезивная функция эндотелия определяется гипер- либо гипоекспрессией эндотелиальных молекул адгезии. Повышение адгезивности эндотелия лежит в основе патологии, в частности, воспаления, тромбообразования, метастазирования [51].

Все молекулы межклеточной адгезии (*cell adhesion molecules, CAMs*) делятся на пять классов: 1) интегрины, члены суперсемейства, представители которого способны к взаимодействиям «клетка-клетка» и «клетка-субстрат»; которые представляют собой трансмембранные $\alpha\beta$ -гетеродимеры; 2) молекулы адгезии суперсемейства иммуноглобулинов, участвующие в межклеточной адгезии, которые особо важны в эмбриогенезе, заживлении ран и иммунном ответе: ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1, CD54*), ICAM-2 (*intercellular adhesion molecule 2, CD102*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1, CD 106*), PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule 1, CD31*) и др.; 3) семейство селектинов, представители которого, *P*-, *E*-, *L*-селектины, осуществляющие адгезию лейкоцитов и эндотелиоцитов; 4) семейство кадгеринов, Ca^{2+} -зависимые адгезивные белки, обеспечивающие контакты между эндотелиоцитами, и 5) адрессины, или хоминговые молекулы адгезии MAdCAM-1 (*mucosal adressin cellular adhesion molecule - 1, CD34, GlyCAM-1*), молекулы, обеспечивающие выход лимфоцитов в лимфоидную ткань [308]. Все они связаны с цитоплазматической мембраной, кроме того, некоторые из них имеют трансмембранное расположение и связаны с цитоскелетом клетки. На поверхности клеток молекулы межклеточной адгезии располагаются кластерами, формируя зоны многоточечного связывания и тем самым определяя степень авидности.

Анализ литературных источников показывает, что молекулы адгезии относятся к белкам различных структурных семейств, и их экспрессия на поверхности ЭК регулируется различными факторами и определяет структурно-функциональное состояние эндотелия в целом. Вследствие этого адгезивные молекулы играют важную роль как в физиологических, так и в патологических процессах. Доказано, что адгезивные взаимодействия клеток между собой и с

внеклеточным матриксом играют важную роль во многих функциях тканей, включая эмбриональное развитие, морфогенез органов, воспалительные реакции, заживление ран, иммунный надзор, гемостаз и метастазирование опухоли [229, 236]. Таким образом, изменение экспрессии молекул межклеточной адгезии может вызывать развитие ЭД и приводить к развитию заболеваний. Указанные функции и определяют участие молекул адгезии в широком спектре заболеваний, доказано их участие в развитии патологии: атеросклероза, пролапса митрального клапана, бронхиальной астмы, болезни Крона, атопического дерматита, системных заболеваний соединительной ткани, метастазирования злокачественных новообразований [65, 81, 82, 196, 233, 294].

1.3. Селектины - белки клеточной адгезии: общие представления

Материалы данного раздела опубликованы в статье:

Калинин Р.Е., Короткова Н.В., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Рябков А.Н. Селектины и их участие в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Казанский медицинский журнал. 2022. Том 103, № 4. С. 617-627. DOI: <https://doi.org/10.17816/KMJ2022-617>.

Селектины (кластер дифференцировки 62, или CD 62), были открыты не так давно – в 80-х гг. прошлого столетия. Представляют одно из семейств белков межклеточной адгезии, являются битопическими сложными белками I типа [300]. Селектины относятся к углевод связывающим белкам, или лектинам (от лат. *legere*, что переводится как выбирать, считывать), последние известны на протяжении всего филогенеза: присутствуют у бактерий, растений и животных [79]. Они представляют собой гликопротеины, имеют трансмембранное расположение на клеточной мембране, опосредуют адгезию лейкоцитов, тромбоцитов, гемопоэтических и раковых клеток к эндотелиальным клеткам. Именно с участием селектинов и их контррецепторов осуществляется первый контакт нейтрофилов с эндотелием, и следующее за этим перемещение нейтрофилов по поверхности

эндотелия, называемое роллингом – первый этап каскада адгезии [183, 236]. Каскад клеточной адгезии играет решающую роль в процессах воспаления и инфекции, возвращении лимфоцитов и стволовых клеток костного мозга в свою, так называемую «нишу», в процессах иммунитета и в метастазировании [229, 306].

Класс селектинов включает в себя трех представителей: селектины Р (CD62P), Е (CD62E) и L (CD62L). Они относятся к классу Ca^{2+} -зависимых углевод-связывающих белков лектинов С-типа млекопитающих [138]. Гены селектинов расположены на длинном плече хромосомы 1 (1q24.2) в тандеме, в порядке: L-, Р- и Е-селектин.

Известные сегодня селектины имеют общую структурную организацию, молекула состоит из пяти различных доменов [182]:

(1) N-концевого кальций-зависимого лектинового домена (N-terminal calcium-dependent lectin domain, CRD; или ligand binding calcium-dependent (C-type) lectin domain (CTLCD), состоящего из 120 аминокислот, ответственного за распознавание углеводов и на 60% идентичного лектинам С-типа;

(2) эпидермальному фактору роста-подобного домена (*epidermal growth factor, EGF*);

(3) серии доменов коротких консенсусных повторов (short consensus repeat, SCR), содержащих варьирующее число повторов у разных представителей от 2 до 9 повторов (2 - в L, 6- в Е и 9 -в Р-селектине), приблизительно 60 аминокислот в своем составе, способных связываться с белками комплемента и богатых цистеином;

(4) трансмембранного домена, состоящего приблизительно из 25 аминокислот;

(5) короткого цитоплазматического С-концевого домена (Рисунок 2).

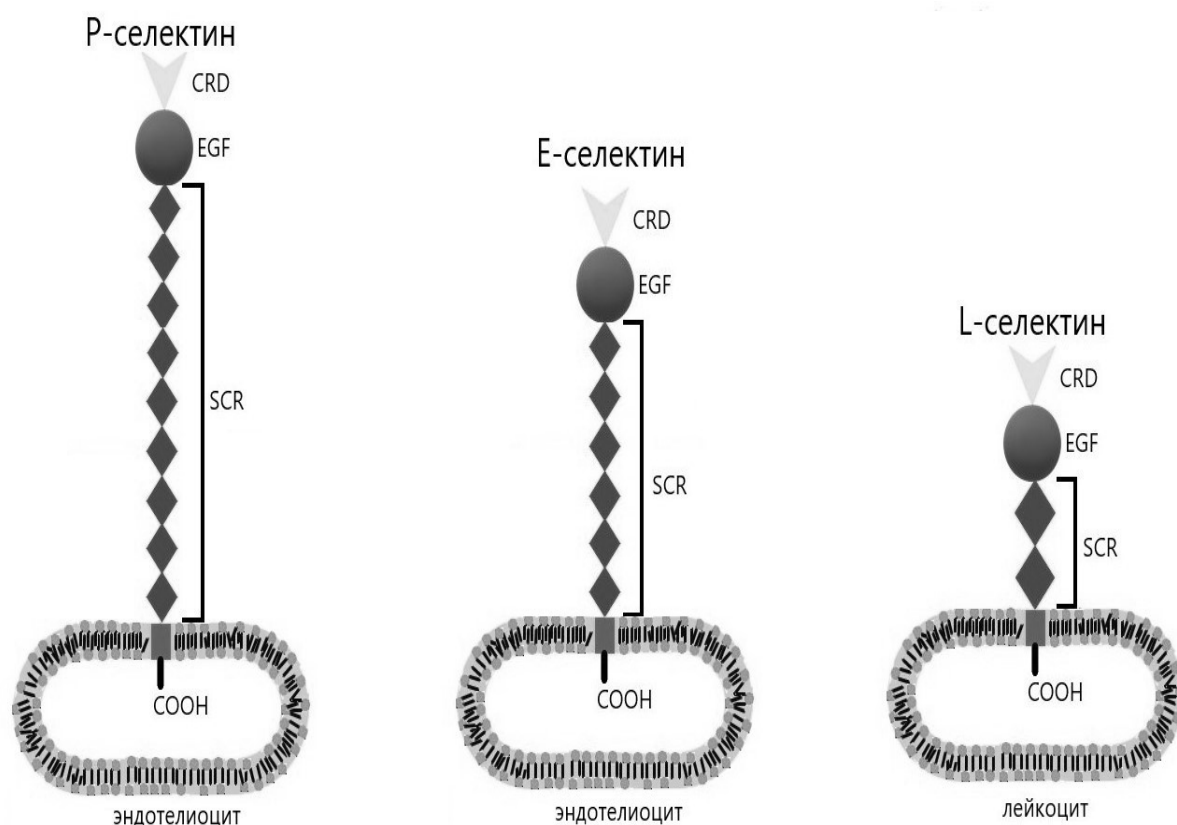


Рисунок 2 – Схематическое представление структуры селектинов

Примечания:

CRD - calcium-dependent lectin domain, кальций-зависимый лектиновый домен

EGF - epidermal growth factor, эпидермальному фактору роста-подобный домен

SCR - short consensus repeat, домен коротких консенсусных повторов

Таким образом, все три селектина заякорены в мембране трансмембранным участком, за которым следует короткий цитоплазматический хвост, состоящий из 17 аминокислот у L-селектина, 32 – у Е-селектина и 35 аминокислот у Р-селектина человека. Существует предположение, что они эволюционировали путем дупликации одного общего гена-предшественника, соответственно все три гена находятся в одном локусе на хромосоме 1q24 (Рисунок 3) [300].

При этом известно, что домены CRD и EGF в высокой степени гомологичны у всех трех селектинов, тогда как структура трансмембранных, цитоплазматических и внеклеточных доменов различна, что ведет к различиям в молекулярной массе, распределении, кинетике связывания и функциях [219].

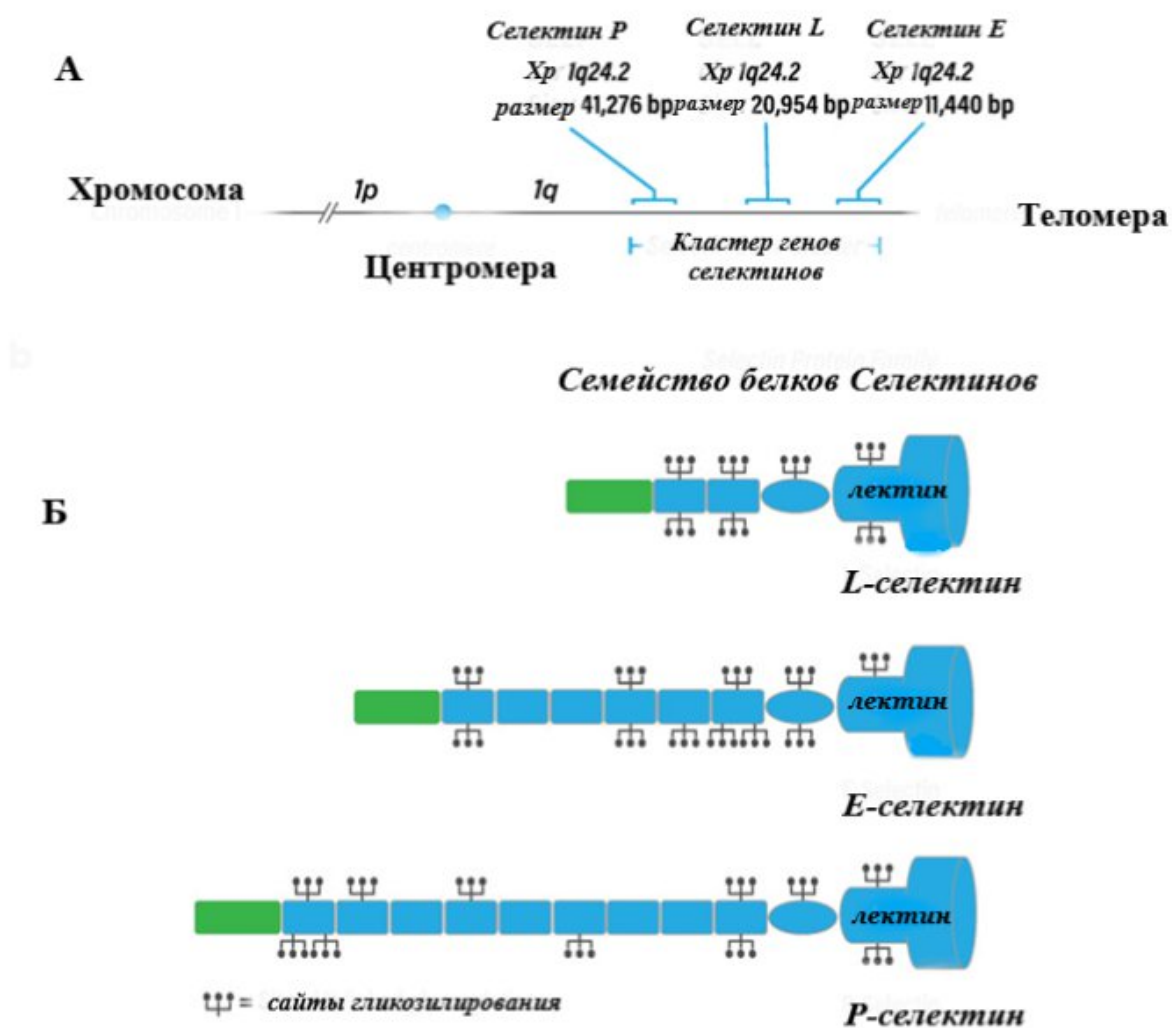


Рисунок 3 – Схема строения кластера гена селектинов и участков гликозилирования селектинов (Цит по: Peterson J.M., 2024) [300]

Примечание – А) кластер гена селектинов на хромосоме 1q; Б) участки гликозилирования селектинов. N-концевой кальций-зависимый домен обозначен как «лектин» справа, за ним следует домен EGF (овальной формы) и различное количество доменов SCR (прямоугольной формы). Внутриклеточные домены представлены зелеными прямоугольниками, а сайты гликозилирования представлены трезубцами

В настоящее время к указанной группе молекул применяется термин *селектин* вместо нашедшего применение ранее LEC-CAM (Lectin-EGF Complement binding-Cell Adhesion Molecule) [325]. Селектины способны связываться с лигандами, представленными олигосахаридами, связывание происходит с участием ионов кальция. Во многом, существующие в настоящее время представления о структуре селектинов обязаны исследованиям Ashwall G. и его коллег, которые выяснили, что гепатоциты содержат кальций-зависимый углевод-

связывающий белок, взаимодействующий с сывороточными гликопротеинами [96]. После открытия селектинов стало известно, что все три селектина распознают общие структурные «мотивы»: сиалированный и фукозилированный тетрасахарид Sialyl LewisX (sLeX) (5-acetylneuraminyl-(2-3)-galactosyl-(1-4)-(fucopyranosyl-(1-3))-N-acetylglucosamine (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β) и его изомерную форму Sialyl Lewis A (sLeA) NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4(Fuc α 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 3Gal β -, являющиеся терминальными компонентами некоторых N- и O-гликанов и составляющие важный компонент внешней поверхности клеток – гликокаликса [337].

Указанные структуры являются значимыми элементами многих рецепторов и гликолипидных лигандов, которые присутствуют на белках и участвуют в многовалентных взаимодействиях (Рисунок 4А).

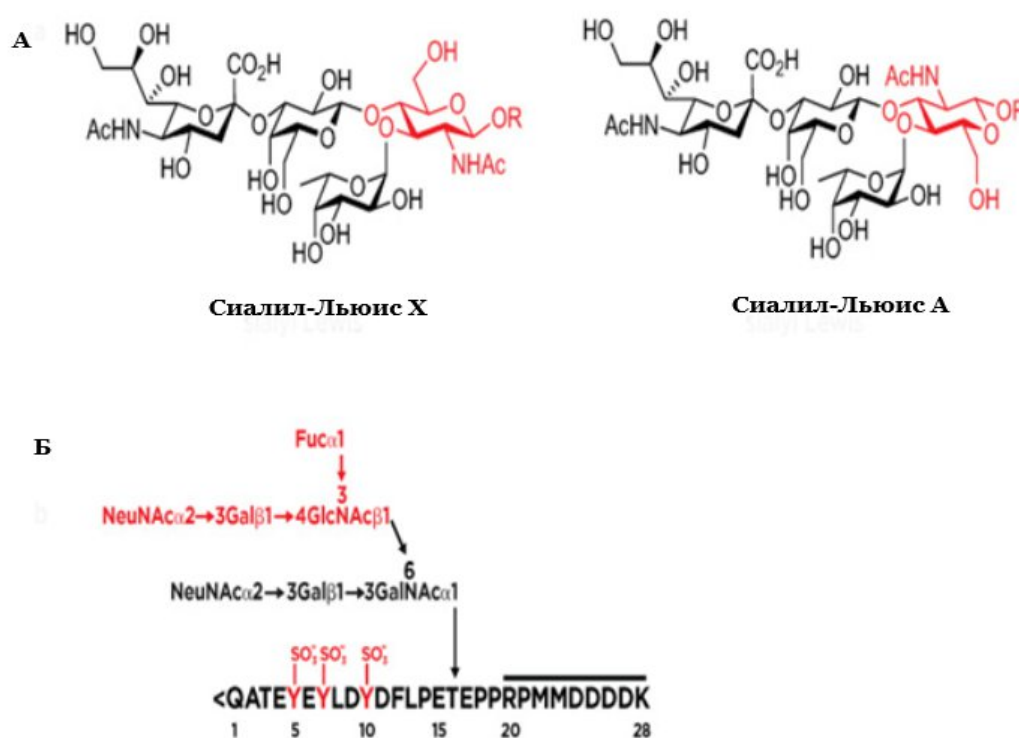


Рисунок 4 – Структуры лигандов, связывающих селектины
(Цит по: Peterson J.M., 2024) [300]

Примечание – А) структуры Сиалил Льюис X (sLeX) и Сиалил Льюис А (sLeA): остаток GlcNAc выделен красным цветом с целью указания на изомерию; Б) структура синтетического лиганда Р-селектина SGP-3, включающего концевые 19 аминокислот PSGL-1, в том числе три сульфатированных по тирозину аминокислотных остатка (sY5, sY7 и sY10) (выделены красным цветом)

В дополнение к этим углеводным мотивам, связывание Р-селектина требует присутствия сульфатированных остатков тирозина, как в синтетическом лиганде Р-селектина SGP-3 (Рисунок 4Б).

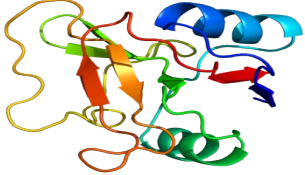
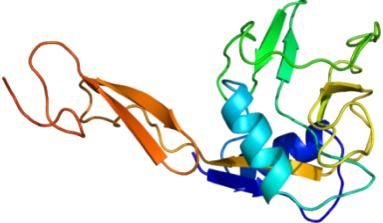
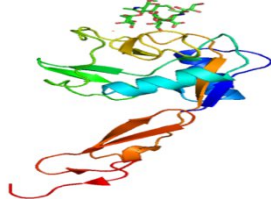
Кроме мембранно-связанных белков, существуют растворимые формы селектинов (*soluble*, *sP-селектин*, *sE-селектин*, *sL-селектин*), циркулирующие в крови либо в виде изолированных белков, либо в составе микровезикул. Они появляются в крови в результате протеолитического отщепления под действием протеолитических ферментов и состоят исключительно из внеклеточных доменов. Для Р-селектина показано образование растворимой формы путем альтернативного сплайсинга предшественника-мРНК, в котором отсутствует экзон, кодирующий трансмембранный домен [56]. Как растворимая, так и мембранная форма экспрессируются стимулированными эндотелиальными клетками и тромбоцитами [290].

Обнаруживаемые в крови даже при отсутствии явного воспаления, циркулирующие растворимые формы селектинов могут влиять на течение воспалительного процесса, хотя их точные функции остаются не полностью изученными. В частности, повышенные уровни растворимых селектинов являются неблагоприятными прогностическими признаками при ряде заболеваний [19, 132, 168, 232, 233, 271, 286, 311].

Общая характеристика селектинов представлена в Таблице 1.

Таблица 1 – Описание L-, E- и P-селектинов и их общебиологических и биохимических свойств (Цит по: Karpeimayer J., 2017) [210, с уточн.]

Селектин	L (LAM-1, CD62L)	E (ELAM-1, CD62E)	P (GMP-140, PADGEM, CD62P, LECAM3)
Экспрессия	Все лейкоциты (Т-клетки, моноциты, полиморфноядерные нейтрофилы)	Активированные эндотелиоциты, сосудистая система костного мозга	Активированные эндотелиоциты/ активированные тромбоциты, некоторые иммунные клетки, некоторые типы раковых клеток
Типы клеток для связывания	Активированные эндотелиоциты	Нейтрофилы/ моноциты	Нейтрофилы/ моноциты
Контроль экспрессии	Конститутивный	Провоспалительные цитокины, гипоксия, IL-1 TNF- α	Тромбин, гистамин, провоспалительные цитокины, АФК, гипоксия, гипергликемия IL-1 TNF- α
Молекулярная масса	75-110 кДа	116 кДа	140 кДа
Размер пептида	~45 кДа	~64 кДа	~90 кДа
% углеводов в составе	50	50	28,8
Количество сайтов N- гликозилирова ния	10	11	12
Лиганд	PSGL-1 GlyCAM-1 MAdCAM-1 CD-34 Podocalyxin	PSGL-1 ESL-1 L-Selectin Podocalyxin	PSGL-1 CD24

Физиологическая роль	Позволяет лимфоцитам перемещаться в лимфатические узлы, обеспечивает кластеризацию лейкоцитов в местах воспаления	Поддерживает пролиферацию гемопоэтических стволовых клеток, Синтез de novo в течение нескольких часов после воспалительной активации, вызывает активацию LFA-1 и прочную адгезию к эндотелиальным клеткам	Предварительно синтезируется и хранится в тельцах Вейбеля-Паладе тромбоцитов и эндотелиальных клеток, экспрессируется в течение нескольких минут после воспалительной активации
Структура и функции	Отображает sLeX который связывается с E-селектином и приводит к активации LFA-1 (LFA-1: антиген-1, ассоциированный с функцией лейкоцитов, sLeX: сиалил-ЛьюисX)	Связывает sLeX на L-селектине, других гликопротеинах и гликолипидах, захватывает циркулирующие лейкоциты, позволяет катиться по активированному эндотелию	Связывает sLeX на сульфатированных гликопротеинах, захватывает циркулирующие лейкоциты и тромбоциты, позволяет катиться по активированному эндотелию
3 – D-структуры			
Примечание – LAM-1– (англ.: Leukocyte adhesion molecule-1), молекула адгезии лейкоцитов-1 ; ELAM – (англ.: Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1), молекула эндотелиально-лейкоцитарной адгезии 1; GMP 140 – (англ.: granule membrane protein-140), гликопротеин плотных гранул тромбоцитов; PADGEM –(англ.: Platelet Activation-Dependent Granule-External Membrane), мембранный белок альфа-гранул тромбоцитов, зависимый от активации тромбоцитов; LECAM2 – (англ.: leukocyte-endothelial cell adhesion molecule), лейкоцитарно-эндотелиальная молекула клеточной адгезии.			

В целом структуру и функции селектинов можно представить следующими схемами (Рисунок 5).

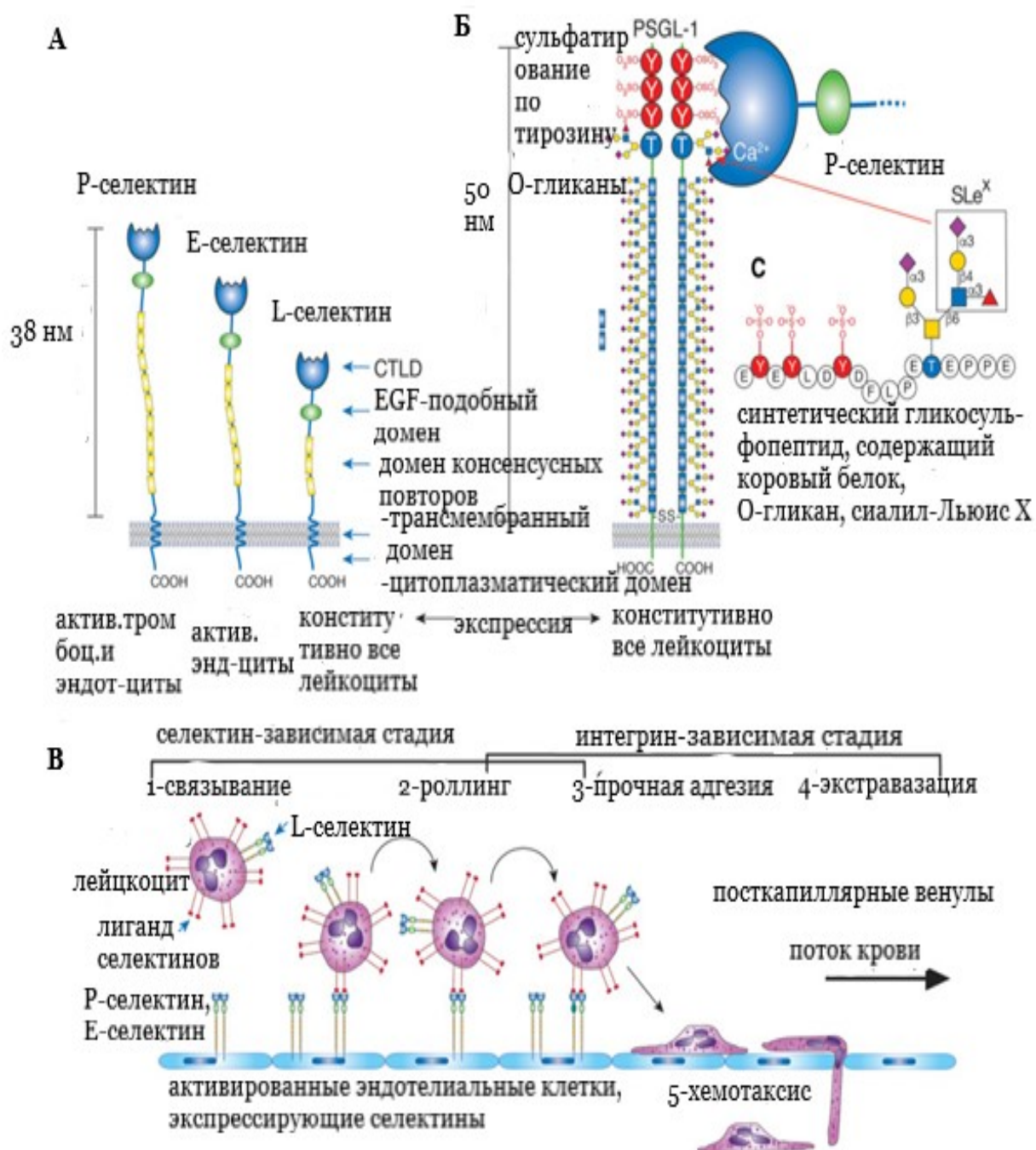


Рисунок 5 – Структура и функции селектинов (Цит. по: Cummings R.D. et al., 2024) [138]

Селектины практически не экспрессируются неактивированными клетками.

Однако, различные физические воздействия, приводящие к активации эндотелиоцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, вызывают повышение экспрессии селектинов, которая может оставаться повышенной в течение определённого времени. К таким воздействиям можно отнести скорость кровотока, pH и температуру микроокружения, нарушение структуры клеток, а также воздействие биологически активных молекул: гистамина, тромбина, активных форм кислорода (АФК) и провоспалительных цитокинов [241].

1.3.1. Р-селектин: структура, функции и участие в биохимических процессах

Р – селектин человека (*P-selectin*; *CD62P*, *GMP-140* – *granule membrane protein-140*, *PADGEM-platelet activation-dependent granule-external membrane protein*; *LECAM3-Leukocyte Endothelial Cell Adhesion Molecule 3*) состоит из 830 аминокислот, имеет молекулярную массу около 140 кДа. В структуре выделяют сигнальный пептид с 1 по 41 аминокислотный остаток. Внеклеточный домен простирается с 42 до 771 аминокислотный остаток, трансмембранный с 772 до 795, цитоплазматический с 796 по 830 аминокислотный остаток. Высота его внеклеточного домена составляет примерно 38 нм от поверхности эндотелия, это в несколько раз меньше толщины эндотелиального гликокаликса, что препятствует первоначальной адгезии циркулирующих иммунных клеток [38]. Впервые был обнаружен как мембранный белок тромбоцитарных гранул [172].

Экспрессируется белок тромбоцитами, эндотелиоцитами, иммунными клетками, а также некоторыми типами раковых клеток. Хранение белка осуществляется в альфа-гранулах тромбоцитов и тельцах Вейбеля-Палладе (*Weibel Palade Body*) эндотелиальных клеток. Трансмембранные участки Р-селектина способны к димеризации в гомодимер с последующим связыванием со своим специфическим лигандом PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*, PSGL-1). Димеризация Р-селектина и PSGL-1 способствует связыванию лейкоцитов с эндотелиоцитами [148]. Участвует во многих процессах: пролиферации, дифференцировке, подвижности и апоптозе клеток и в построении архитектуры

тканей.

P-селектин осуществляет первичное взаимодействие полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) и эндотелиоцитов в каскаде адгезии, в частности, в очаге воспаления. Максимальная концентрация отмечается через пять – десять минут после стимуляции и активации клеток, и в течение 30 минут-1 часа P-селектин отделяется от поверхности клеток [208]. P-селектин попадает на поверхность клеток двумя путями. Первый из них является ключевым и связан с мгновенной мобилизацией из телец Вейбеля-Палладе, осуществляемой в течение двух минут. Происходит это под влиянием гистамина, тромбина, АФК и провоспалительных цитокинов, таких, как интерлейкины 13 и 4 [208]. В этом случае не происходит активация синтеза белка; максимум концентрации достигается на десятой минуте, и продолжается до трех часов [215]. Второй вариант осуществляется в результате усиления транскрипции гена P-селектина под влиянием провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) и интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β). Известно, что у мышей усиление транскрипции мРНК P-селектина и усиление его синтеза в эндотелиальных клетках, то есть, в условиях *in vitro* и *in vivo* происходит под воздействием не только вышеуказанных биологически активных веществ, но и липополисахаридов внешней мембраны бактерий. В указанном регуляторном пути задействованы факторы транскрипции: транскрипционный фактор NF-kB (*Nuclear factor kappa B*, ядерный транскрипционный фактор «каппа-би»; универсальный фактор транскрипции, контролирующей экспрессию генов белков клеточного цикла, апоптоза и иммунного ответа), активирующий фактор транскрипции 2 (*Activating transcription factor 2*, ATF-2), кодирующийся у человека ATF2 геном и являющийся членом семейства лейциновых zip-белков. Показано, что в отличие от других млекопитающих, у человека и приматов данный путь отсутствует. И в целом экстраполировать данные о структуре и функциях селектинов с мышей на людей необходимо с большой осторожностью, поскольку иммунные системы мыши и человека существенно различаются [240, 252].

В условиях *in vitro* было продемонстрировано, что в эндотелиоцитах человека ФНО- α не только не усиливает, но и замедляет транскрипцию мРНК P-

селектина, а также содержание и Р-селектин-опосредованную клеточную адгезию в условиях *in vivo* [147].

По данным М. Hossain и соавторов, регуляция экспрессии молекул селектина Р возможна и с участием системы оксида азота [188]. Так, введение L-NAME (англ: NG-nitro-L-arginine methyl ester, нитро-L-аргинина метиловый эфир) – неселективного ингибитора фермента синтазы оксида азота, сопровождается увеличением содержания Р-селектина на эндотелиоцитах. Кроме того, показано, что содержание селектина Р на поверхности эндотелиоцитов увеличивается под влиянием гипоксии и снижается на фоне гипогликемии [199, 241].

Существуют данные, что для эндотелия в целом и, в частности, для эндотелиальных клеток аорты типична выраженная гетерогенность синтеза молекул адгезии. К примеру, в противовес эндотелиальным клеткам пупочной вены, часть аортальных эндотелиоцитов не экспрессирует селектин Р. Также известно, что фактор фон Виллебранда (vWF) и Р-селектин аккумулируются в тельцах Вейбеля-Палладе эндотелия легочных артерий и артериол, но эндотелий легочных капилляров также экспрессирует указанные факторы, несмотря на отсутствие телец Вейбеля-Палладе [258].

На сегодняшний день известно, что межклеточные контакты и клеточная адгезия, осуществляемые лектиновым и EGF – подобными доменами Р-селектина, опосредуются взаимодействием с интегринами $\alpha\text{IIb}\beta_3$ и $\alpha\nu\beta_3$ (ITGA2B:ITGB3) и $\alpha\text{-V}/\beta\text{-3}$ (ITGAV:ITGB3); действие отдельно лектинового домена гораздо более выражено в этом процессе. То есть, они способны выступать в качестве лиганда. Учитывая тот факт, что интегрины обладают более широким паттерном клеточной экспрессии, нежели истинный лиганд селектинов PSGL-1, можно заключить, что данный путь способствует более широкому разнообразию взаимодействий [320].

1.3.2. Е-селектин: структура, функции и участие в биохимических процессах

Е-селектин (CD62E, ESEL, ECAM-2 (*leukocyte-endothelial cell adhesion molecule 2*), ELAM1 (*endothelial-leukocyte adhesion molecule 1*)) – это гликопротеин

с молекулярной массой около 116 кДа, состоит из 610 аминокислотных остатков. Он был открыт также в восьмидесятые годы прошлого столетия [160], а к сегодняшнему дню накоплен достаточный объем научных данных о нём [163]. Ген *Sel E* человека состоит из 12 экзонов, расположен на первой хромосоме. Сигнальный пептид - с 1 по 21 аминокислотный остаток, внеклеточный лектиновый домен простирается с 22 по 556 аминокислотный остаток, трансмембранный с 557 по 578, и цитоплазматический - с 579 по 610.

Он в первую очередь регулирует адгезию и стабильную остановку лейкоцитов на эндотелии при различной патологии. На сегодняшний день доказано, что экстравазация лейкоцитов из кровотока, способствующая выведению патогена из организма и восстановлению повреждённых тканей, в нормальных физиологических условиях осуществляется с участием Е-селектина, и фукозилирование играет в данном процессе немаловажную роль [340].

На N-концевом лектиновом домене присутствует область из 119 аминокислотных остатков, отвечающая за связывание с олигосахаридными компонентами. Биологическое значение Е-селектина заключается в обеспечении привлечения лейкоцитов в очаг воспаления, и в осуществлении медленного роллинга нейтрофилов по поверхности активированных эндотелиальных клеток [112].

Продукция селектина Е отлична от продукции селектина Р: она является индуцибельной, после клеточной активации требует транскрипции *de novo*; интактным эндотелием селектин Е практически не экспрессируется.

Способность селектинов к связыванию с лигандом имеет решающее значение для обеспечения перемещение лейкоцитов, и было показано, что оно достигается конформационным состоянием, за счёт перехода между изогнутой и вытянутой формой (Рисунок 6). У Е-селектина также, как и у Р-селектина, для которого это было показано ранее, имеется расширенное конформационное состояние, в котором он способен соединяться со своим специфическим лигандом с более высокой аффинностью.

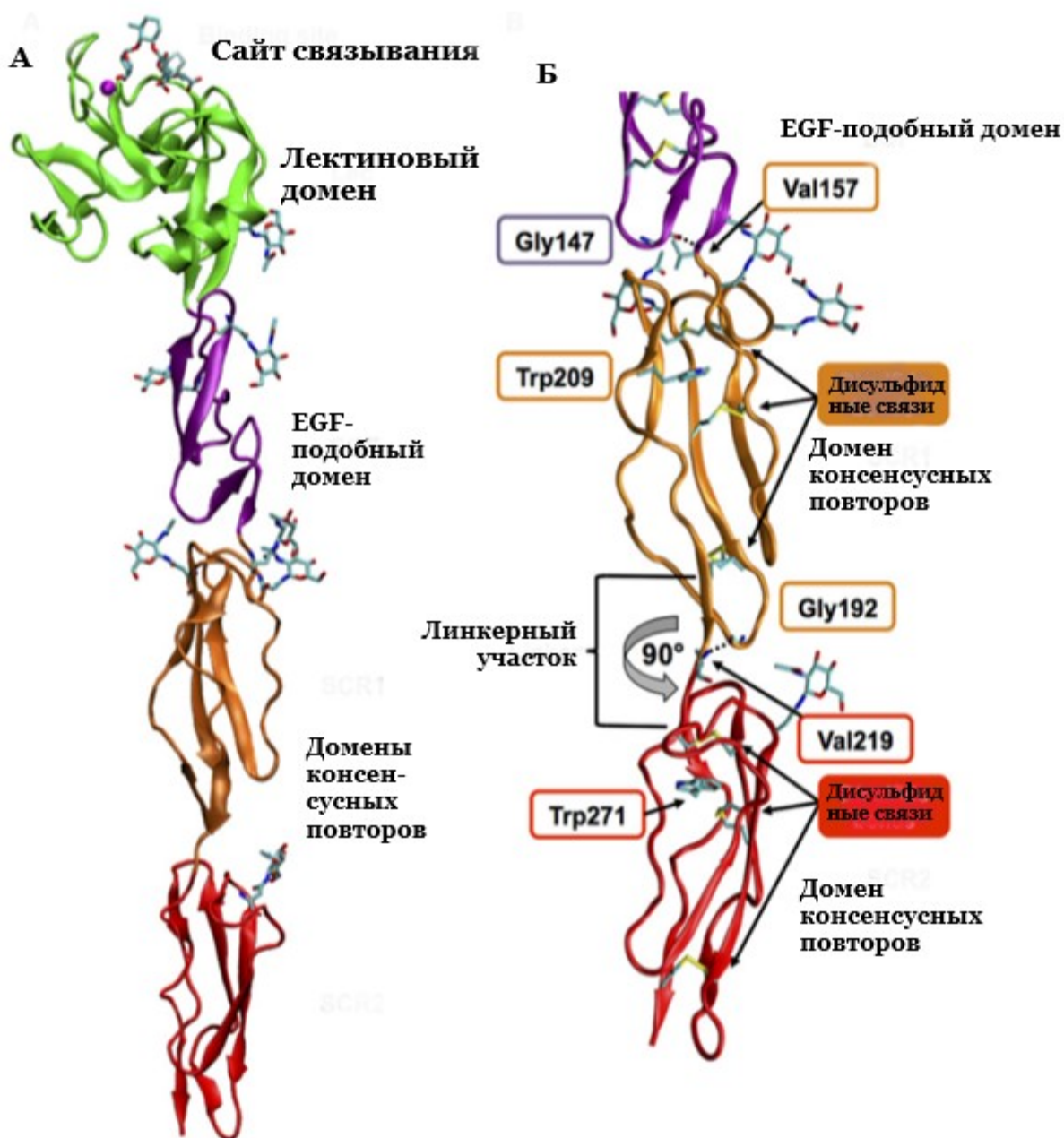


Рисунок 6 – Различные конформационные состояния селектина Е
(Цит. по: Preston R.C., 2016) [164]

Примечание – А) Структура Е-селектина с N-концевым Лес, EGF-подобным и первыми двумя SCR-доменами. Семь N-связанных GlcNAc-фрагментов расположены на междоменных пространствах; Б) Домены SCR выровнены, показан участок вращения SCR 2 относительно SCR1 (90°). Показаны три дисульфидные связи, стабилизирующие домены SCR. Консервативные триптофаны (Trp209/271) расположены между верхней и центральной дисульфидной связью. Гибкость домена коротких консенсусных повторов SCR ограничена водородными связями между Gly147 и Val157 или Гли192 и Val219

Изменение конформации молекулы из изогнутого состояния в вытянутое позволяет Е-селектину обеспечивать связывание быстро движущихся лейкоцитов

с эндотелием сосудов на фронтальном крае клетки, контролируя при этом скорость отсоединения на каудальном крае, тем самым обеспечивая механическую стабильность движения лейкоцитов по кровеносным сосудам. В условиях *in vivo* растянутая конформация поддерживается силой натяжения, действующей вдоль оси Е-селектин-лиганд, и тем самым увеличивается продолжительность взаимодействия. Жесткость линейно расположенных доменов коротких консенсусных повторов поддерживается за счет консервативных междоменных контактов и трех внутридоменных дисульфидных связей и обеспечивает основу для механорецепции дидомена: лектиновый домен-EGF-подобный домен Е-селектина [164].

Существует ряд факторов, которые влияют на синтез Е-селектина. Например, напряжение сдвига и провоспалительные цитокины выступают в качестве факторов, влияющих на экспрессию Е-селектина на мембране эндотелиоцитов [162]. Также, Е-селектин синтезируется эндотелиальными клетками через четыре – шесть часов в ответ на воздействие ФНО- α ; дефицит селектина Е или его ингибирование антителами у мышей предотвращают медленный роллинг лейкоцитов и снижают выраженность воспалительной реакции, индуцируемой ФНО- α . Также экспрессия селектина Е наблюдается под действием интерферона γ (γ -ИФН), вирусной инфекции, бактериального липополисахарида (LPS), интерлейкина 1 β ; для последнего показаны повышение синтеза Е-селектина и инициация адгезии активированных лейкоцитов к эндотелию в зоне воспаления [189, 190]. В экспрессии Е-селектина задействован путь NF-kB-сигналинга [270].

В настоящее время выяснено, что ядерный фактор активации Т-клеток (*Nuclear factor of activated T-cells, NFAT*) является регулятором транскрипции воспалительных цитокинов, в том числе ИЛ – 1 β . А его ингибитор, *Inhibitor of NFAT – Calcineurin Association-6, INCA-6*, вызывает снижение ИЛ - 1 β , и, как следствие, синтез Е-селектина [257].

Повышение концентрации селектина Е бывает не продолжительно и резко падает после достижения максимума, заканчиваясь через сутки – двое. Величина напряжения сдвига, как уже отмечалось выше, а также его продолжительность

значительно влияют на индуцированную указанными выше цитокинами экспрессию Е-селектина; совместное влияние напряжения сдвига и цитокинов приводят к максимальной экспрессии селектина Е через восемь-двенадцать часов [189, 190].

Гипергликемия стимулирует экспрессию Е-селектина через сигнальные пути: с-Jun N-концевые киназы (с-Jun N-terminal kinases, JNK) и митоген-активируемые протеинкиназы (mitogen-activated protein kinase, MAPK p38); также она является NFκB-зависимой. Ингибирование NF-κB и транскрипционного фактора AP-1 (*Activator protein 1*), фактора транскрипции, регулирующего экспрессию генов в ответ на различные стимулы, включая цитокины, факторы роста, стресс, а также бактериальные и вирусные инфекции; контролирующего дифференциацию, пролиферацию и апоптоз) с помощью специфических малых интерферирующих РНК, блокирует индуцированную гипергликемией активность промотора Е-селектина и его экспрессию. Также было показано, что макрофагальные воспалительные белки MIP-1α и MIP-1β (*macrophage inflammatory proteins*) являются основными медиаторами индукции экспрессии Е-селектина эндотелиальными клетками. И тем самым подтверждено: повышенная экспрессия Е-селектина, стимулируемая макрофагами, предварительно обработанными повышенными концентрациями глюкозы, может играть активную роль в атерогенезе при гипергликемии, что предполагает новый механизм развития артериальных заболеваний при сахарном диабете (СД) [187]. Также имеются сведения, что растворимая форма Е-селектина является надёжным независимым предиктором развития СД после ожирения и других клинических параметров и особенностей образа жизни как у мужчин, так и у женщин [152].

Исследование на мышах продемонстрировало, что фактор транскрипции RUNX1 (*Runt-related transcription factor*; фактор транскрипции, регулирующий дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток в зрелые клетки крови, также известный как белок острого миелоидного лейкоза 1), контролирует экспрессию Е-селектина в сосудистой нише костного мозга; а подавление экспрессии RUNX снижает экспрессию Е-селектина в сосудистой нише и

негативно влияет на приживание клеток острого миелобластного лейкоза в костном мозге, что продлевает общую выживаемость мышей с лейкемией [296].

Как уже было отмечено выше, привлечение и адгезия предшественников эндотелиальных клеток также происходит с участием селектина Е, что является способствующим миграции эндотелиальных клеток явлением, и помогает формированию капилляров. На модели ишемии конечностей у мышей было продемонстрировано, что введение аденовирусного вектора, содержащего ген Е-селектина, значительно ускоряет капиллярогенез и перфузию тканей, и уменьшает выраженность некроза, вызванного ишемией. Гиперэкспрессия Е-селектина, как изолированная, так и проводимая параллельно с введением предшественников эндотелиальных клеток, потенцирует образование новых сосудов и подтверждает участие Е-селектина в адгезии предшественников эндотелиоцитов и ангиогенезе [158].

При изучении экспрессии Е-селектина под влиянием ОС, путем добавления перекиси водорода было показано, что ОС вызывает экспрессию Е-селектина в эндотелиальных клетках посредством подавления транскрипционного фактора ERG (*ETS-related gene*, является членом семейства ETS, факторов транскрипции, специфичных для трансформации эритробластов, протоонкоген); ERG подавляет транскрипцию гена Е-селектина и снижает адгезию моноцитов, вызванную окислительным стрессом [261].

Для Е-селектина на сегодняшний день показано участие во многих патологических процессах: бронхиальной астме, COVID-19, раке печени и других органов [124, 154, 225, 323], сердечно-сосудистых и заболеваниях лёгких [264, 310, 329].

Регулироваться экспрессия гена селектина Е может несколькими путями. Было показано, что в его промоторе находятся три регуляторных участка, связывающихся с ядерным транскрипционным фактором NF-κB [298]. Фактор транскрипции 2 (ATF2), кодирующийся одноименным геном *ATF2*, повышает активность промотора гена *Е-селектина* через посредничество семейства белков высокой мобильности HMG I (Y) (*high-mobility group protein 1 (HMG-1)*), которые,

подобно гистонам, участвуют в организации структуры ДНК и в регуляции транскрипции. Они способны самостоятельно реагировать на сигналы ядерного транскрипционного фактора NF-κB. Транскрипционный фактор 1, связанный с Runt (*RUNX1*, *Runt-related transcription factor 1*), о котором говорилось несколько ранее, инициирует люциферазную активность в участке – 320 промотора гена E-селектина и способствует транскрипции генов в эндотелиальных клетках [296].

1.3.3. L-селектин: структура, функции и участие в биохимических процессах

L-селектин, третий представитель семейства, имеет сходную организацию внеклеточных доменов с P - и E - селектинами, но содержит в своей структуре только два коротких SCR домена комплемент-регуляторных белков. Имеет молекулярную массу от 65 кДа в лимфоцитах до 100 кДа в нейтрофилах, которая обусловлена гликозилированием в зависимости от типа экспрессирующей его клетки. L – селектин имеет всего семь сайтов N- гликозилирования. Известно, что именно цитоплазматические «хвосты» селектинов не совсем гомологичны друг другу и, вероятно, именно они передают свои уникальные внутриклеточные сигналы. Существует предположение, что разные паттерны гликозилирования L-селектина могут определять клеточно-специфические функции, но пока данный вопрос активно не изучался [228].

FOXO1 (*Fork head box protein O1*, *фактор транскрипции, кодируемый у человека одноимённым геном FOXO1*) регулирует транскрипцию гена Lселектина человека [177], тогда как для мышиноного L – селектина, есть информация о регулирующем воздействии и других генов: *Mzf 1* (*Myeloid zinc finger 1*), *Klf2* (*Krüppel-подобный фактор транскрипции*), *Sp1* (*specificity protein 1*), *Ets1* (*Protein C-ets-1*) и *Irf1* (*interferon regulatory factor 1*). L-селектин непрерывно продуцируется на лейкоцитах и очень быстро отщепляется с поверхности клетки после её активации. Благодаря ему осуществляется адгезия лейкоцитов к клеткам лимфатических узлов и активированному эндотелию. Сигнальный пептид L – селектина имеет протяжённость с 1 по 38 аминокислотный остаток, внеклеточный

лектиновый домен с 39 по 332 аминокислотный остаток, трансмембранный с 333 по 355, и цитоплазматический - с 356 по 372.

L-селектин способствует первоначальному прикреплению и перемещению лейкоцитов в эндотелии, обеспечивает адгезию лимфоцитов к эндотелиоцитам крупных и посткапиллярных венул периферических лимфатических узлов. N-концевые девять аминокислот играют решающую роль в механизме связывания L-селектина с молекулой лиганда [139]. Кроме того, L-селектин, как и два других белка данного семейства, участвует в метастатических процессах [68], и, кроме того, для него показано участие в имплантации эмбриона [8,178].

Для L селектина показано существование двух различных вариантов транскриптов (v1 и v2), обусловленных наличием/отсутствием дополнительного экзона между экзонами 7 и 8. Тем не менее, такие молекулы обладают цитоплазматическими доменами с более длинной, 30-32 аминокислотных остатка против 17, цепью; повышенная экспрессия данных форм приводит к изменению адгезивных свойств молекул и ускорению перемещения лейкоцитов; это позволяет предположить, что альтернативный сплайсинг является одним из механизмов образования функционально различных белков. Не так давно было открыто, что L-селектин способен к внутриклеточному сигналингу. Так, известно, что его цитоплазматический хвост может взаимодействовать с белками, например, вызывать индукцию фосфорилирования p38 MAPK через сериновые остатки, Ser³⁶⁴ и Ser³⁸¹ [192].

Известно также, что цитоплазматический домен человеческого L-селектина способен связываться с кальмодулином и последний регулирует его протеолитическое отщепление с поверхности клетки, нарушая L-селектин-зависимую адгезию, то есть действует как негативный регулятор [207]. При этом связывании критически важную роль играют Leu 358 и Lys 359 в мембрано-проксимальной области цитоплазматического домена человеческого L-селектина [234]. Кроме того, Arg 357 и Lys 362 цитоплазматического домена человеческого L-селектина важны для связывания белков цитоскелета – ERM (ERM protein family: ezrin, radixin, moesin; семейство белков, состоящих из эрина, моззима и радиксина),

также участвуют в протеолитическом отщеплении и трансэндотелиальной миграции лейкоцитов [205]. Также известно, что последовательность цитоплазматического домена L-селектина, поддерживающая связь с вышеуказанными белками, консервативна на 100% (Рисунок 7).

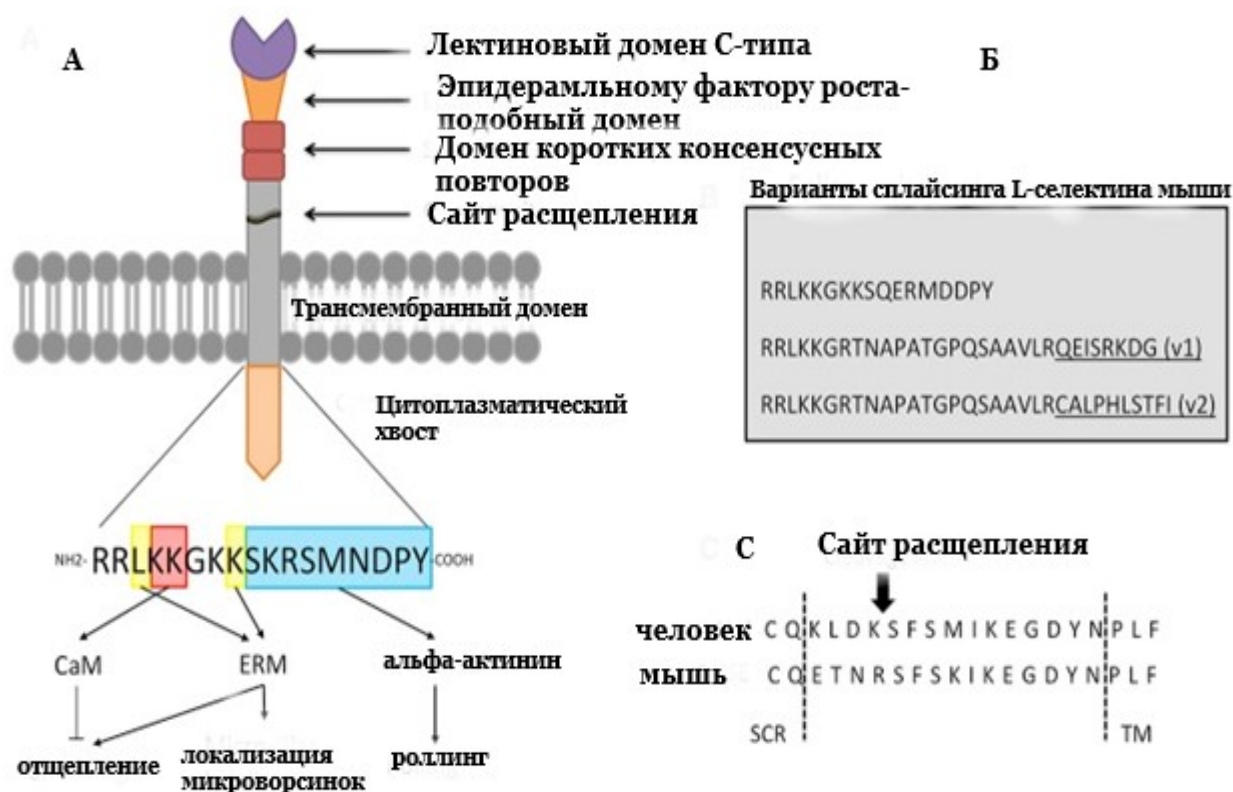


Рисунок 7 – Особенности аминокислотной последовательности L-селектина (Цит. по: Ivetic A., 2019) [228]

Примечание – А) Показана аминокислотная последовательность цитоплазматического хвоста человеческого L-селектина, выделены аминокислоты, осуществляющие связывание с кальмодулином (CaM), ERM-белками и альфа-актинином; Б) Три последовательности соответствуют хвосту L-селектина мыши (при этом хвост L-селектина мыши содержит один серин в положении 364, тогда как хвост L-селектина человека содержит дополнительный остаток серина в положении 367); В) Аминокислотные последовательности, окружающие участок расщепления L-селектина человека и мыши. Стрелка указывает место расщепления. TM - трансмембранный домен; SCR – область консенсусных повторов)

Еще одна важная роль L-селектина заключается в адгезии лейкоцитов к лейкоцитам, уже прикрепленным к стенке кровеносного сосуда, известной как вторичное связывание.

1.4. PSGL-1 – общий лиганд селектинов

Материалы данного раздела опубликованы в статье:

Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Никифорова Л.В. PSGL-1: универсальный лиганд селектинов или сигнальная молекула? Молекулярная биология. 2025. Т. 59, №1. С.32-42 DOI: 10.31857/S0026898425010038, EDN: HDFBQV.

Взаимодействия селектинов с гликоконъюгатами клеточных мембран опосредуют начальный этап каскада адгезии, с помощью которого происходит рекрутирование циркулирующих в кровотоке лейкоцитов к местам инфекции или повреждения. В связывании селектинов важную роль играет ключевой белок, лиганд для всех трех селектинов, димерный гликопротеин, Р-селектина гликопротеиновый лиганд - PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand 1; SELPLG; CD162; CLA; PSGL-1; PSGL1*).

В связи с тем, что для селектинов открыто участие в физиологических: иммунный ответ, гемостаз, процесс заживления тканей, и в патологических реакциях, в том, числе и в канцерогенезе, воздействие на их контакт с лигандами может иметь и терапевтическое значение [285].

1.4.1. Структура PSGL-1 и его посттрансляционные модификации

PSGL-1 был первоначально идентифицирован в нейтрофилоподобных клетках HL-60 (human leukemia cell) человека. В 1993 году PSGL-1 был найден в нейтрофилах. Он является трансмембранным, битопическим, гликопротеином I типа, экспрессирующимся в липидных рафтах на вершинах лейкоцитарных микроворсинок [259]. В настоящее время известно, что его экспрессия осуществляется всеми лейкоцитами: нейтрофилами, моноцитами и большинством лимфоцитов (в том числе, В-клетками, естественными клетками-киллерами, наивными клетками, Т-клетками памяти), а также тромбоцитами и некоторыми

эндотелиальными клетками. Кроме того, имеются сведения о его присутствии в хронически воспаленной ткани простаты человека и на активированных эндотелиальных клетках пупочной вены человека [89, 127].

PSGL-1 представляет собою гомодимер, мономеры которого соединены дисульфидной связью, по мнению большинства ученых, стабилизирующей димерную форму белка (Рисунок 8). Остатки Cys локализованы в непосредственной близости от трансмембранного домена.

Молекулярная масса мономера PSGL-1 составляет 120 кДа. Предшественник PSGL-1 имеет молекулярную массу 43,2 кДа, состоит из 412 аминокислотных остатков: сигнальный пептид (1-17), пропептид (18-412); включает в себя три домена: N – концевой внеклеточный пептид (303 аминокислоты, с 18 по 320), трансмембранный участок (21 аминокислота, с 321 по 341) и короткий С-концевой цитоплазматический домен (71 аминокислота, с 342 по 412) .

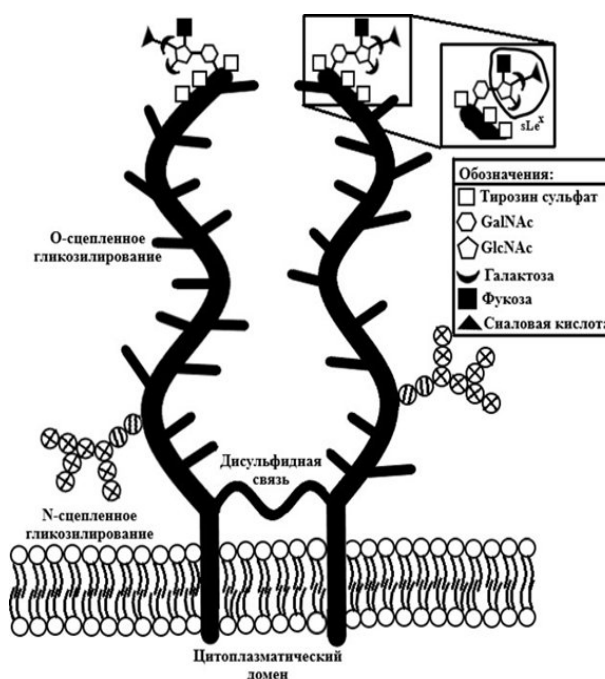


Рисунок 8 – Структура PSGL-1 (Цит. по: TinocoR., 2017, с доп.) [287]

Активируется путём частичного протеолиза, зрелый белок в своем составе содержит 371 аминокислоту. После окончательного созревания и гликозилирования димер PSGL-1 имеет молекулярную массу 240 кДа.

Внеклеточный N концевой домен белка, имеет длину 50-60 нм [267],

содержит сайты ветвления, по которым происходит О- и N-гликозилирование, и терминальные сайты, подвергающиеся окончательным модификациям, приводящим к способности связывания с селектинами. Он богат остатками Thr, Pro, Ser, и три остатка Tyr 46, 48 и 51, по которым происходит сульфатирование; и 14-16 декамерных повторов, несущих О-связанные гликаны [191]. Аминокислотные последовательности трансмембранного и цитоплазматического доменов высоко консервативны. На внеклеточном домене располагаются гликаны, связанные с белком О-гликозидной связью по остаткам Ser и Thr.

Короткий цитоплазматический домен PSGL-1 содержит последовательность из 18 аминокислот (RLSRKGHMYPVARNYSPTE у человека) [288]. С консервативными остатками в цитоплазматическом участке PSGL-1 могут связываться члены семейства белков-адаптеров – эзрин, радиксин, моэзин (ERM), отвечающие за мембранно-цитоскелетные связи [83].

Нормальное функционирование лиганда PSGL-1 требует ряд его важных посттрансляционных модификаций: гликозилирование [171], сульфатирование по тирозину [87, 334] и образование разветвленных углеводных боковых цепей с участием корового белка [274]. Ключевой О-гликан в PSGL-1, содержащий тетрасахариды сиалил-Льюис X и A, локализован в области N-конца PSGL-1 человека на треонине 57. Селектину Е для связывания достаточно одного мотива - sLe^X, двум другим представителям семейства требуется лиганд, модифицированный сульфатированием, например, GlcNAc-6-сульфатирование для L-селектина; селектину Р, кроме sLe^X, требуется по крайней мере один дополнительный О-сульфатированный остаток тирозина полипептидной цепи. Сульфатирование повышает аффинность связывания селектинов с их лигандом. Углеводные структуры, являющиеся детерминантами связывания селектина, являются результатом посттрансляционных модификаций белков или липидных каркасов с использованием ферментов гликозилирования - гликозилтрансфераз, ферментов, катализирующих перенос моносахаридного остатка от донора на гидроксильную группу акцептора. Существует мнение учёных, что для каждой гликозидной связи требуется определенная гликозилтрансфераза [246] (Рисунок

9). Донорами для такого превращения служат нуклеотидные сахара: UDPGlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-Glc, UDP-Gal, GDP-Fuc, GDP-Man, CMP-NeuAc. Также, сульфотрансфераза способна модифицировать гидроксил OH6 GlcNAc путем добавления сульфатной группы, в результате чего образуется 6-сульфо-sLeX, являющийся лигандом L-селектина.

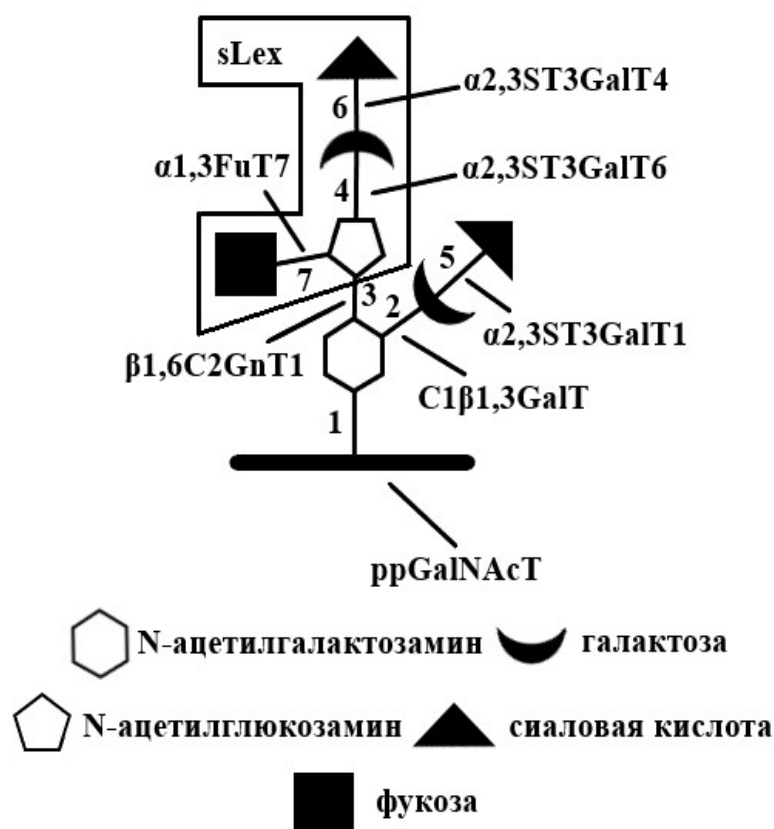


Рисунок 9 – Схема биосинтеза разветвлённых O-гликанов, содержащих сiali (sLex) (Цит. по: Carlow D.A., 2009, с изм.) [284]

Последовательность действия ферментов в этом процессе:

1. О-гликозилирование по остаткам серина и треонина под действием N-ацетилгалактозаминотрансферазы (ppGalNAcT;1);
2. присоединение галактозы, катализируемое «коровый белок-1b1,3-галактозилтрансферазой» (C1b1,3GalT;2) с образованием структуры Galb1-3 GalNAc-коровый белок 1;
3. разветвление O-гликанов ядра 2 инициируется добавлением GlcNAc к структуре ядра 1, катализируется «коровый белок-2b1,6-N-

ацетилглюкозаминилтрансферазой 1» (C2GnT1, 3).

Образование sLex, необходимого для функционирования лиганда селектина, катализируется последовательными действиями β 1,4-галактозилтрансферазы (β 1,4-GalT; 4), α 2,3-сиалилтрансферазы (ST3GalT, 6) и α 1,3-фукозилтрансферазы 7 (FuT7,7).

Ферменты, принимающие активное участие в посттрансляционных модификациях PSGL-1, представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Ферменты, принимающие участие в посттрансляционных модификациях PSGL-1

Фермент	Имя гена	Модификация
Фукозилтрансфераза-IV или VII	<i>FUT4</i> или <i>FUT7</i>	α 1,3-фукозилирование
Core 2 β 1,6-глюкозаминилтрансфераза-I	<i>GCNT1</i>	формирование разветвлённых углеводных боковых цепей
β 1,4-галактозилтрансфераза-I	<i>B4GALT1</i>	β 1,4 галактозилирование
Сиалил 3-трансфераза IV	<i>ST3GAL4</i>	α 1,3 сиалирование
Тирозилпротеинсульфотрансфераза 1 или 2	<i>TPST1</i> или <i>TPST2</i>	тирозин O-сульфатирование

Кроме гликозилирования посттрансляционный процессинг PSGL-1 включает в себя сульфатирование по N-концевым остаткам тирозина, под действием тирозинсульфотрансфераз.

Миелоидные клетки конститутивно экспрессируют ферменты, необходимые для гликозилирования PSGL-1. В отличие от них Т-клетки CD4⁺ экспрессируют значительные уровни PSGL-1, но не имеют ферментов фукозилтрансферазы VII и 2 β 1,6-глюкозаминилтрансферазы-I C2GlcNAcT-I, необходимых для соответствующей модификации [313].

Кроме того, сиалил 3-трансфераза IV в Т-клетках экспрессируется на низких уровнях.

В целом для Т-клеток характерная способность к связыванию с селектинами приобретается лишь во время их пролиферации и дифференцировки, после которой следует активация и индукция экспрессии указанных выше ферментов [89].

Среди посттрансляционных модификаций PSGL-1, важнейшее значение для захвата и связывания имеют $\alpha 1,3$ фукозилирование, $\alpha 2,3$ сиалирование, $\beta 1,4$ -галактозилирование и 2β 1,6-N гликозилирование с помощью ацетилглюкозаминилтрансферазы.

1.4.2. Взаимодействие PSGL-1 с цитоскелетом клетки, с селектинами и инициируемые им биохимические сигнальные каскады

PSGL-1 способен к выполнению адгезивной функции только при условии его связи с цитоскелетом клетки [309]. Происходит связывание цитоплазматического домена PSGL-1 с актиновым цитоскелетом клетки посредством адаптерных молекул - белков эзрина, радиксина и моэзина (*ezrin, radixin, moesin; ERM*). Данная группа белков ERM регулирует перераспределение PSGL-1 по плазматической мембране клеток от кончиков лейкоцитарных микроворсинок к уropодам – выпячиваниям поляризованных клеток, локализованных в каудальном отделе клеток. Фосфорилирование ERM приводит к ускорению перемещения PSGL-1 в уropоды Т-клеток. Кроме молекул актинового цитоскелета PSGL-1 оказывается связанным и с сигнальными молекулами, например, с MAPK (митоген-активируемыми протеинкиназами), функции которых в клетках разнообразны и включают в себя контроль подвижности, пролиферации, и апоптоза клеток, а также транскрипции генов и метаболизма.

Связь между ERM и PSGL-1 осуществляется через С домен последовательности FERM радиксина. FERM состоит из трёх субдоменов: А, В, С. β -цепь PSGL-1 образует антипараллельную β - β структуру с цепью $\beta 5C$ субдомена С путем образования водородных связей, в которых задействованы двенадцать аминокислотных остатков. Сайт связывания PSGL-1 в домене FERM радиксина перекрывается с сайтом связывания ICAM-2 (Intercellular adhesion molecule 2, CD 102). ITAM-подобный мотив (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) – аминокислотная последовательность 191–208, действует как шарнирная область, связывающая субдомены В и С. Последние скрывают два сайта фосфорилирования

Y191 и Y205. То есть, существует эффект стерического препятствия при воздействии сайтов фосфорилирования на ITAM-подобный мотив, и при привлечении нерецепторной тирозинкиназы селезенки Syk (Tyrosine-protein kinase Syk), предотвращая чрезмерную активацию лейкоцитов через сигнальный путь PSGL-1 в условиях нормальной гемодинамики [114].

Еще один белок, связанный с мембраной клеток и локализующийся в липидных рафтах, флотилин-2 (Flot-2), также может играть роль в привлечении PSGL-1 к уроподам в Т-клетках, тем самым способствуя их активации [104]. Кроме того, Flot-2 контактирует с одним из медиаторов основных путей передачи сигнала – рецептором, активируемым протеазой (*Protease-activated receptors, PAR-1*), участвующих в росте клеток, и тем самым может способствовать прогрессированию метастазирования опухолей.

Также PSGL-1 связывается посредством цитоплазматического домена с ранее упоминавшейся цитоплазматической нерецепторной тирозинкиназой селезенки Syk и металлопротеиназой ADAM8 (*Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 8*). Ассоциация цитоплазматического домена PSGL-1 с ADAM8 ведет к его отщеплению PSGL-1 и блокирует роллинг нейтрофилов; в то же время ассоциация домена декамерных повторов PSGL-1 с ADAM28 усиливает связывание с Р-селектином, что обеспечивает привлечение иммунных клеток в участки воспаления [330].

При взаимодействии PSGL-1 с Р-селектином фосфорилируется Syk и напрямую действует на аминокислотную последовательность в N-концевом участке иммунорецептора, являющегося сайтом активации ITAM в белках моэзине или эзрине в Т-лимфобластах человека. Далее возможно фосфорилирование указанных белков по остаткам тирозина, и образование комплекса PSGL-1-Syk-моэзин, итогом образования которого является активация протоонкогена c-Fos [204].

Было показано, что моэзин участвует в PSGL-1-опосредованной активации $\beta 2$ интегрина и замедлении скорости качения лейкоцитов после связывания Р-селектина с PSGL. Так, у мышей, нокаутных по моэзину, отмечалось небольшое

увеличение скорости вращения нейтрофилов в венулах кремастерной мышцы при воздействии фактора некроза опухоли α (TNF- α) [235]. В случае снижения синтеза моэзина, связывание нейтрофилов может быть компенсаторно обеспечено эзрином.

PSGL-1, взаимодействуя с белками ERM, посредством фосфорилирования ERK (*extracellular signal-regulated kinase*, киназы, регулируемой внеклеточными сигналами), участвует в активации митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), и это не связано с фосфорилированием Syk. Отмечено, что активация обоих путей: ERK и Syk, индуцированная PSGL-1, зависит от целостности липидных рафтов [314]. Было показано, что целостность липидного рафта необходима для PSGL-1-опосредованного катания нейтрофилов на Р-селектине. Лигирование PSGL-1 в эксперименте на клетках HL-60 вызывает фосфорилирование β -аддуцина и опосредует зависимое от лигирования распределение PSGL-1 путем диссоциации от актинового цитоскелета [224].

В настоящее время PSGL-1 признан наиболее изученным физиологическим лигандом, который с высоким сродством способен связываться через N-концевой участок полипептидной цепи со всеми тремя селектинами, но сродство такого связывания отличается, для Р-селектина: $K_D = 320 \mu\text{M}$, для Е-селектина: $K_D = 15 \mu\text{M}$, для L-селектина - $K_D = 5 \mu\text{M}$ [333].

Внеклеточный домен белка наделён конформационной гибкостью, способствующей облегчению связывания с контррецепторами. На нём расположены остатки Ser, Thr и богатые Pro декамерные повторы, которые различаются у разных видов и выступают над поверхностью клетки. В целом внеклеточный домен в отличие от трансмембранного может демонстрировать некоторую вариабельность, несмотря на которую О-сайт гликозилирования треонина Thr-58, расположенный вблизи N-конца, консервативен. Именно он несет на себе sLe^X и его аналог sLe^A , через которые осуществляется связывание с селектинами. Сульфатирование по тирозину (Tyr-46, Tyr-48 и Tyr-51) обеспечивает высокое сродство связывания PSGL-1 человека с селектинами. Кроме того, сульфатированный тирозин способствует связыванию хемокинов CCL19 и CCL21 с N-концом PSGL-1, тогда как разветвление в точках присоединения О-гликанов и

сиалирование снижают связывание [130]. Ключевым событием в связывании селектинов являются электростатические силы между ионами Ca^{2+} и гидроксильными группами при C3 и C4 фукозного остатка тетрасахарида sLe^X . В последующем образуются водородные связи между галактозным остатком sLe^X и Tyr4 и Glu92, и между сиаловой кислотой и Tyr 48, которые и обеспечивают стабилизацию комплекса селектин-лиганд [184]. После связывания с селектинами PSGL-1 локализуется в мембранных микродоменах, на заднем крае мигрирующих лейкоцитов, что приводит его в непосредственную близость с другими адгезивными и сигнальными молекулами, такими как CD43 и CD44, и поддерживает связывание лейкоцитов с эндотелием.

Было установлено, что связывание лиганда с Р-селектином требует сульфатирования хотя бы одного тирозина, а сульфатирование Tyr48 ($K_D \sim 6 \mu\text{M}$) способствует более высокой аффинности, чем сульфатирование Tyr46 ($K_D \sim 10 \mu\text{M}$) или Tyr51 ($K_D \sim 10 \mu\text{M}$) [110]. Модель с тремя сульфатированными Tyr46, Tyr48 и Tyr51 продемонстрировала более высокую аффинность связывания ($K_D = 0,65 \mu\text{M}$), в то время как несulfатированная модель имела значительно меньшее сродство ($K_D \sim 25 \mu\text{M}$). Также было установлено, что вклад фукозы в связывание более значителен, чем вклад сиаловой кислоты; сульфатирование остатка GlcNAcLe^X ведет к образованию 6-сульфо- sLe^X , что увеличивает аффинность связывания с L-селектином. Узнавание и связывание с E-селектином не имеет зависимости от сульфатирования [336].

Мутации в E-, L- и Р-селектинах, например, в положениях 46, 85, 97 и 107 приводят к различиям в функционировании лиганда. Сульфатирование остатков тирозина в положении 51 способствует взаимодействию с Arg85 в селектине-Р, что повышает их сродство, по сравнению с другими селектинами [307].

Для PSGL-1 и селектинов характерны различия вследствие полиморфизмов, что может привести к функциональным нарушениям и развитию сосудистых и метаболических заболеваний. Существует обычная генетическая вариация в PSGL-1 с переменным числом tandemных повторов (*variable number of tandem repeats, VNTR*), от которой зависит длина внеклеточного домена PSGL-1, в том числе

расстояние от сайта связывания Р-селектина до поверхности клетки. У человека идентифицировано три аллельных варианта: А, В и С, которые содержат 16, 15 и 14 соответственно декамерных повторов. Гомозиготные носители коротких аллелей В и С имели более низкий риск преждевременного инфаркта миокарда из-за более низкой адгезивной способности [210].

Декамеры содержат не менее 50 потенциальных О-сайтов гликозилирования. Они характеризуются повторяющимися участками, состоящими из 10 аминокислот, содержащих до 30% О-гликозилированных остатков треонина, 10% - пролина, которые укрепляют белковый каркас. Гликозилирование декамеров составляет почти две трети молекулярной массы PSGL-1. Делеции в генах, кодирующих декамерные повторы, нарушают Р- и, в особенности, L-селектин-зависимые связывания с PSGL-1 [305]. Основная функция декамеров, это удлинение N конца PSGL-1 и «удаления» его от поверхности клетки, чтобы предоставить его текущим лейкоцитам, активированным эндотелиоцитам и тромбоцитам, прикрепленным тромбоцитам или лейкоцитам, и ограничить гибкость пептидного остова. Также они увеличивают способность N-конца PSGL-1 поддерживать L- и Р-селектин-зависимое связывание, играют главную роль в стабилизации зависящих от L-селектина взаимодействий качения; напрямую взаимодействуют с Е-селектином и действуют как рецептор адгезии [279].

Биохимические сигнальные каскады, инициируемые лигандом PSGL-1

Можно отметить, что PSGL-1 – это не только молекула адгезии, но и сигнальная молекула, запускающая ряд сигнальных каскадов, некоторые из них были рассмотрены выше. Например, нерецепторная тирозинкиназа Syk, которая, активируясь фосфорилированием, связывается с ITAM-подобным мотивом в моэзине и, тем самым, опосредованно связывается с PSGL-1 и индуцирует транскрипцию гена раннего ответа c-Fos. C-Fos, в свою очередь, является частью фактора транскрипции белка-активатора-1, приводящего к экспрессии других молекул клеточной адгезии ICAM-1 и VCAM, необходимых для следующих стадий

каскада адгезии. Таким образом, контролируя экспрессию ICAM-1 и VCAM-1, c-Fos также контролирует трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов [221].

PSGL-1 необходим для опосредованной рецептором, сопряжённым с G-белком (*G protein-coupled receptors, GPCR*) независимой активации интегринов. Непрерывное связывание PSGL-1 с E селектином индуцирует сигнальные события, которые активируют сродство LFA-1 (интегрин $\alpha\text{L}\beta 2$; *Lymphocyte function-associated antigen 1*) к ICAM-1 и опосредует более медленное связывание последнего с E селектином.

Недавно был идентифицирован новый регуляторный механизм с участием цитозольных миелоидных белков (MRPs) 8 и 14, секретируемых миелоидными клетками в качестве провоспалительных медиаторов, и также задействующий PSGL-1 [173]. Так, было показано, что взаимодействие E-селектина-PSGL-1 запускает высвобождение Mgr8/14 и, в свою очередь, активирует малую GTPase Rap1 через Toll-подобный рецептор 4 (TLR4), что ведет к активации интегринов $\beta 2$. Это событие, в свою очередь, усиливает адгезию и трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов. Также связывание P-селектина с его лигандом усиливается путём интегрин зависимой активации и адгезии [203].

Связывание PSGL-1 с P-селектином, индуцирует активацию киназы Src, влияющей на процессы клеточной дифференцировки, пролиферации и адгезии; нарушение ее функционирования ведет к прогрессированию клеточной трансформации и онкогенной активности; вместе они влияют и на PI3, гиперактивация которой также ассоциирована с развитием онкологической патологии. Это, в свою очередь, приводит к активации антигена макрофагов-1 (Mac-1, $\alpha\text{M}\beta 2$, CD11b/CD18, CR3) и LFA-1 на лейкоцитах [283]. Таким образом, участие PSGL-1 биохимических каскадах можно представить следующей схемой (Рисунок 10).

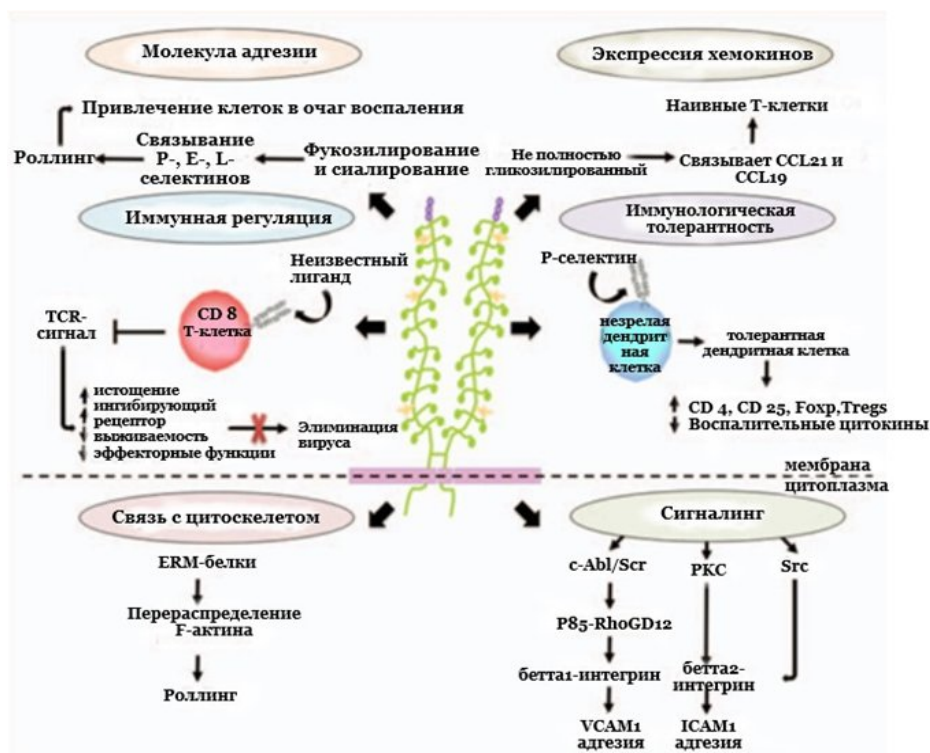


Рисунок 10 – Участие PSGL-1 в биохимических сигнальных каскадах
(Цит. по: Abadier M., 2017) [89]

1.5. Участие селектинов и PSGL-1 в патологии

К настоящему времени накоплено значительное количество сведений о том, что молекулы адгезии, в частности, селектины и PSGL-1, участвуют не только в фиксации клеток в определённых зонах внутри тканей с целью осуществления движения последних, но в процессах передачи биохимической информации из внеклеточной среды посредством инициирования внутриклеточных сигнальных каскадов в специфические клеточные функциональные реакции. Для них продемонстрированы участие в физиологических процессах, таких, как гемостаз, иммунный ответ, заживление ран.

Впоследствии была установлена их вовлечённость в воспалительные процессы [223], процессы метастазирования и в патогенез онкологических заболеваний. За последние три десятилетия существенно расширились знания об их функциях в развитии и прогрессировании ряда патологий, в том числе, сердечно-сосудистой [196].

Так, к примеру, в эксперименте на мышах было показано, что подавление

экспрессии ацетилгалактозаминтрансферазы 4 (*N-acetyl galactosaminyl transferase 4, GALNT4*), одного из ферментов, участвующих в посттрансляционном О-гликозилировании PSGL-1, уменьшает образование атеросклеротических бляшек, адгезию и трансмиграцию моноцитов, через пути Akt/mTOR и NFκB. Таким образом, GALNT4 также может явиться потенциальной терапевтической мишенью для лечения атеросклероза [180].

Также в эксперименте на мышах выяснено, что передача сигналов PSGL-1 и CXCR2 совместно увеличивает частоту возникновения и размер тромбов, способствуя развитию тромбоза глубоких вен, частично стимулируя высвобождение внеклеточных нейтрофильных ловушек NETs. В отличие от нейтрофилов, блокирование передачи сигналов PSGL-1 или CXCR2 в моноцитах не влияло на их привлечение в тромбы или экспрессию тканевого фактора [135].

Показано, что PSGL-1 экспрессируется в повышенных количествах у пациентов с аневризмой аорты. С другой стороны, его дефицит снижает частоту возникновения и тяжесть аневризмы аорты, уменьшает фрагментацию эластина, накопление коллагена и дегенерацию гладкомышечных клеток. Этот защитный эффект ингибирования PSGL-1 был опосредован снижением молекул адгезии и последующим уменьшением адгезии лейкоцитов к эндотелию по пути NF-κB, что в конечном итоге приводит к снижению инфильтрации воспалительных клеток и экспрессии факторов воспаления [280].

При активации нейтрофилов в результате генетического нокаута KLF2 (*транскрипционный Крюппеля-подобный фактор 2; Kruppel-like factor, KLF2*), как ключевого регулятора активации нейтрофилов, или после введения антифосфолипидных антител (APS) происходит кластеризация PSGL-1 путем ремоделирования кортикального актина, при этом усиливается адгезия в местах тромбоза. Использование наночастиц с антителами к PSGL-1, повторяет ситуацию с кластеризацией последнего, и данная процедура приводит к ослаблению проявления тромбоза, демонстрируя важность и осуществимость нацеливания на активированные нейтрофилы для предотвращения имунотромбоза [88].

Нами также было проведено поисковое пилотное исследование по участию

PSGL-1 в патогенезе заболеваний сосудов с целью дальнейшего поиска механизмов регуляции его взаимодействий с селектинами. Были найдены отличия в концентрациях данного белка у здоровых доноров и пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей: варикозным расширением вен, острым венозным тромбозом, периферическим атеросклерозом, что свидетельствует о его участии в патогенезе заболеваний сосудов нижних конечностей [28, 49, 92].

При изучении влияние PSGL-1 на ремоделирование стенки сосудов легкого было выяснено, что лейкоцитарный дефицит PSGL-1 ассоциирован со снижением количества клеток Treg (регуляторные Т-клетки), продукции NO и экспрессии эстрогенового рецептора ER α с последующим увеличением Ang II в легких самок мышей, способствуя развитию легочной артериальной гипертензии [315]. А снижение взаимодействий между PSGL-1 и P селектином уменьшает образование внеклеточных нейтрофильных ловушек и препятствует развитию тромбоза и воспаления.

Также для PSGL-1 известно участие в иммунном ответе при ВИЧ-инфекции [346], в развитии новой коронавирусной инфекции COVID-19 [345], при остром панкреатите [186]. Селектины также задействованы в сердечно-сосудистой патологии: хронической сердечной недостаточности (ХСН) и остром коронарном синдроме (ОКС) [272], ишемии-реперфузии [348], ишемической болезни сердца (ИБС) [73], атеросклерозе [347], тромбозах [349], варикозной болезни вен [132, 185], пролапсе митрального клапана [169].

1.6. Современные представления о цикле оксида азота, как возможном регуляторе функционирования селектинов

1.6.1. Роль оксида азота (II) и его метаболитов в регуляции процессов свободно-радикального окисления

Оксид азота (II) (NO) является полифункциональной биомолекулой, являющейся мессенджером в различных биохимических процессах. Это

газообразная молекула, растворяется в воде и свободно проникает через мембраны клеток. NO имеет структуру свободного радикала, что делает его токсичным, а также обладает дополнительным электроном, что помогает ему оставаться крайне реакционноспособным [122].

Сегодня учёным доступен большой объём экспериментальных и клинических данных по оксиду азота (II), его метаболизму: субстрату синтеза, изоферментам, участвующим в биосинтезе – NO-синтазам (NOS), физиологическим эффектам, и, наконец, патогенетическим аспектам заболеваний, связанных с нарушением его синтеза [53].

Известно, что оксид азота является своеобразным «двуликим Янусом», выполняя двойственную роль: с одной стороны – положительную, регулируя биохимические превращения в клетке, с другой стороны – отрицательную, повреждая белки и ферменты самостоятельно или посредством своих метаболитов, тем самым нарушая их функции [254]. Физиологические эффекты, реализуемые посредством участия оксида азота, представлены на Рисунке 11.

В низких концентрациях, нано- и пикомолярных, оксид азота реализует свои биохимические функции, такие как: апоптоз, транскрипция мРНК, трансляция и посттрансляционные модификации белков, а также физиологические – расширение сосудов, иммунный ответ, репродуктивная функция, нейротрансмиссия [326].

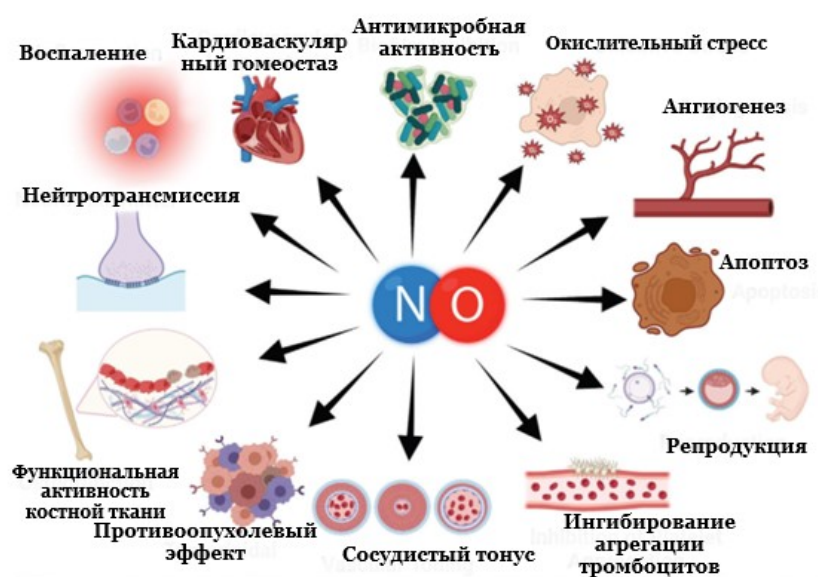


Рисунок 11 – Основные физиологические изменения, обусловленные экзогенным и эндогенно произведенным NO (Цит. по: AndrabiS.M., 2023) [254]

Также он поддерживает нормальную проницаемость эндотелия, участвует в процессах изменения адгезии лейкоцитов к эндотелию, тормозит трансэндотелиальную миграцию моноцитов, тормозит пролиферацию гладкомышечных клеток, ингибирует активацию, адгезию и агрегацию тромбоцитов, активирует тканевый активатор плазминогена, является мощным вазодилататором [254]. В связи с выполнением перечисленных функций в биохимии его считают важным мессенджером и сигнальной молекулой.

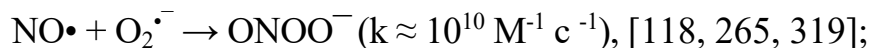
Более высокие, микромолярные, концентрации NO вызывают токсические эффекты, снижают активность ферментов, повреждая их активные центры, а также участвуют в образовании пероксинитрита, приводя к окислительному/нитрозативному стрессу, оказывают прямое цитотоксическое воздействие, значительное деструктивное влияние на клетки и ткани организма. NO вызывает повреждения в структуре всех классов биомолекул: фрагментацию ДНК, нитрозилирование белков и ферментов, перекисное окисление липидов (ПОЛ) [214].

NO является маленькой незаряженной молекулой и содержит, как уже было отмечено выше, неспаренный электрон на внешней π -орбитали [217]. Он практически не вступает во взаимодействия с большинством биомолекул, но очень быстро вступает в реакции с другими радикальными молекулами, поскольку данный процесс приводит к благоприятному спариванию двух неспаренных электронов. К таким радикальным молекулам можно отнести гидроксильный радикал ($\text{OH}\cdot$), супероксид-анион радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), пероксильный ($\text{ROO}\cdot$), тиильный ($\text{RS}\cdot$) и тирозильный ($\text{Tyr}\cdot$) радикалы. Основными конечными продуктами превращения оксида азота являются нитриты и нитраты, которые способны вновь до него восстанавливаться [20].

В настоящее время известно более 100 белков, молекулы которых являются мишенями для NO. В результате действия NO белки способны менять свои свойства – становятся более активными, или же их действие ингибируется [107].

Большинство же цитотоксических эффектов $\text{NO}\cdot$ связано с пероксинитритом (ONOO^-), который образуется в ограниченной диффузией реакции с супероксид-

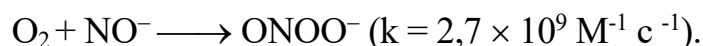
анион радикалом:



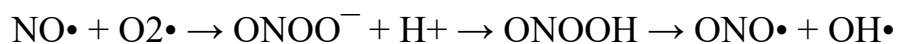
также он может возникать в реакции взаимодействия нитрита с пероксидом водорода:



Следует отметить, что эта реакция происходит в кислой среде. Кроме того, в физиологических условиях ONOO^- может формироваться при взаимодействии молекулярного кислорода с нитроксильным анионом, который является продуктом одноэлектронного восстановления оксида азота:



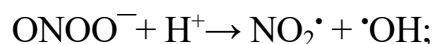
Пероксинитрит это очень сильный окислитель, он интенсивно нитрует белки и является источником токсичного гидроксильного радикала ($\text{OH}\cdot$):



В дальнейшем $\text{OH}\cdot$ вызывает пероксидное окисление липидов; $\text{NO}\cdot$ и его производные могут вызывать пероксидное окисление фосфолипидов и окисление тиольных групп мембранных белков, в том числе митохондриальной мембраны, что также ведёт к высвобождению в цитоплазму факторов апоптоза.

Как было отмечено, пероксинитрит является одной из наиболее реакционноспособных активных форм кислорода и азота, синтезирующихся в организме человека. ONOO^- обладает биоагрессивностью, кроме того, он может вступать в реакции с нуклеиновыми кислотами, липидами и белками, вызывая нарушение функции клетки и повреждение тканей, что играет существенную роль в патогенезе различных заболеваний, как на молекулярном, так и на функциональном уровне [76]. Известно, что в условиях физиологических значений pH время его существования исчисляется всего лишь несколькими миллисекундами [289]. За данное время пероксинитрит может превратиться в другие активные формы кислорода и азота [174]:

а) в радикал диоксида азота (оксид азота (IV)) и гидроксильный радикал:



б) далее диоксид азота может реагировать с оксидом азота с образованием триоксида диазота (оксид азота (III)): $\cdot\text{NO} + \text{NO}_2\cdot \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3$;

в) в свою очередь нитрит-анион возникает в реакции оксида азота и гидроксильного радикала: $\text{NO}^\bullet + \bullet\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^-$;

г) в карбоксил-анион-радикал и радикал диоксида азота (в результате взаимодействия пероксинитрита с углекислым газом):



Часть пероксинитрита может изомеризоваться в нитрат. И как уже отмечалось выше, он способен вызвать ПОЛ мембран, а также проникнуть через плазматическую мембрану в виде пероксинитритной кислоты ONOOH . Данные превращения прямо или опосредованно влияют на транскрипционные факторы и внутриклеточные сигнальные каскады, меняющие жизнедеятельность клетки. Вследствие всего перечисленного изучение токсического действия пероксинитрита является весьма актуальной и интересной задачей современной науки.

1.6.2. Синтазы оксида азота и их роль в патологии

Пристальное внимание учеными уделяется также и ферментам, осуществляющим синтез оксида азота – NO-синтазам (КФ 1.14.13.39), и являющимся цитохром–Р-450-подобными гемпротеинами [97, 103, 277]. Участвуя в генерации оксида азота, они опосредуют биохимические механизмы клеточного сигналинга и адаптации.

На сегодняшний день известны три изоформы NOS: нейрональная (nNOS), эндотелиальная (eNOS) и индуцибельная (iNOS). Первые две экспрессируются конститутивно, в течение короткого времени в ответ на стимуляцию. Индуцибельная (iNOS) может экспрессироваться в течение продолжительного времени под действием различных факторов: эндотоксина, провоспалительных цитокинов и ряда других [20].

Кроме описанных выше, в настоящее время известны и другие идентифицированные изоформы NOS: NOS Мюллеровских глиальных клеток сетчатки (mNOS), митохондриальная (mtNOS), пинеальная (PnNOS), специфичная для яичек (TnNOS), которые являются менее известными типами. Предполагается,

что разнообразие изоформ NOS зависит от различных подтипов сплайсинговых вариантов NOS и их экспрессии в разных тканях [318].

NO в организме человека синтезируется из L-аргинина с помощью NO-синтаз путём окисления терминальной группы гуанидина (Рисунок 12).

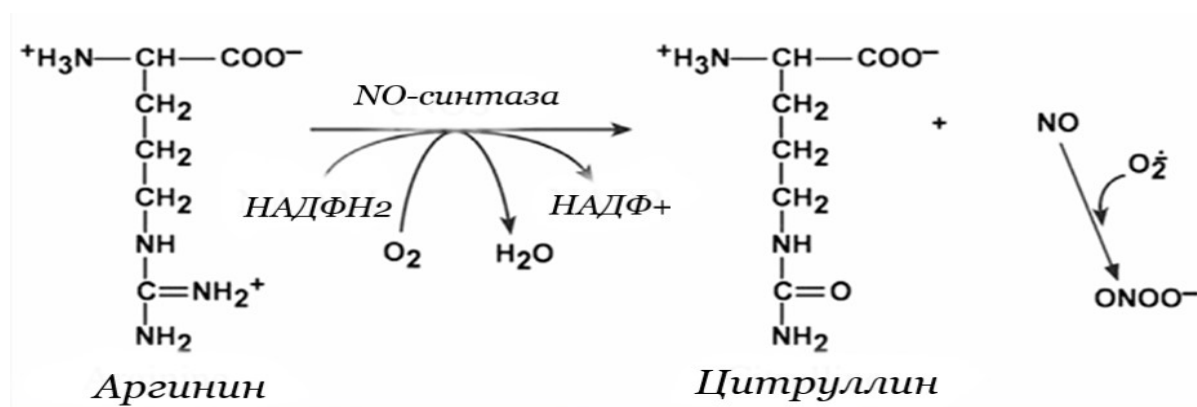


Рисунок 12 – Реакция синтеза NO• из L-аргинина
(Цит. по: Маргиеву О.И., 2024) [39]

Молекулы NO-синтаз содержат домены с редуктазной и оксигеназной активностью (Рисунок 13).

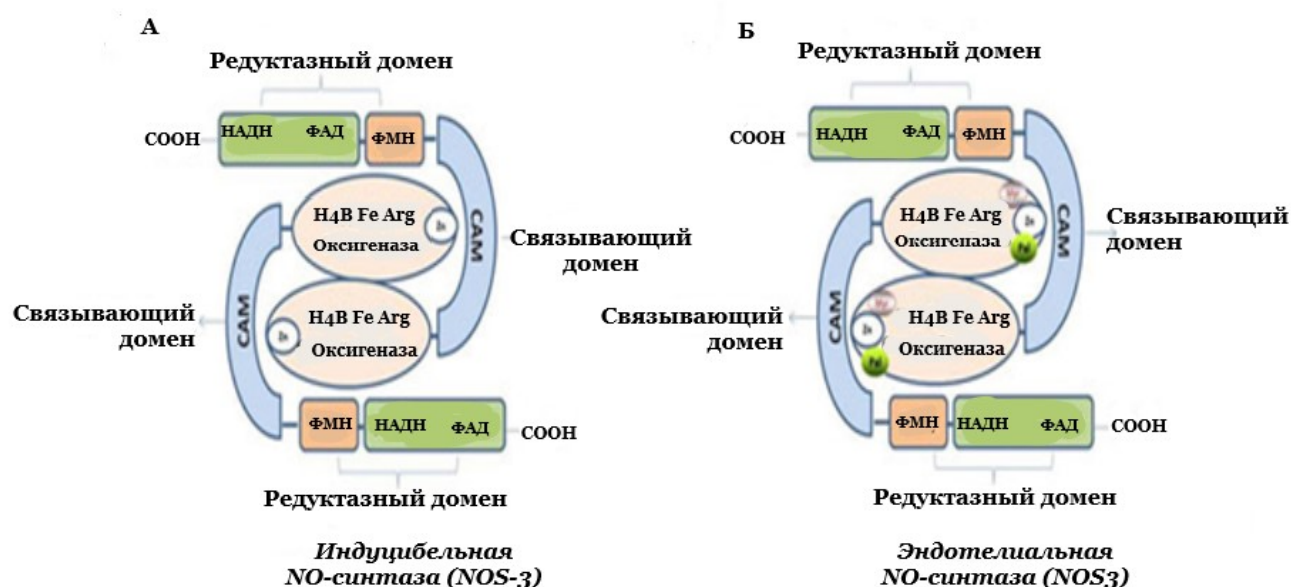


Рисунок 13 – Схема доменной структуры NO – синтазы человека
(Цит.по: Zhang W., 2023) [253]

Реализация биохимических эффектов NO может осуществляться по следующим механизмам:

- 1) цГМФ-зависимому, что присуще конститутивным формам,
- 2) цГМФ-независимому, что более свойственно индуцибельной форме iNOS; эффект реализуется посредством образования ряда промежуточных соединений и продуктов их взаимодействия с белками, то есть, например, через образование того же пероксинитрита (ONOO^-), нитрозилирующего белки и вызывающего развитие НС.

Конститутивные изоформы синтазы оксида азота: нейрональная и эндотелиальная, связаны с мембранными белками, генерируют базовый уровень оксида азота, вследствие чего имеют в основном физиологическую роль. Время жизни NO в организме имеет продолжительность до 30 секунд, в течение которых он вступает во взаимодействие с тиоловыми группами и металлами переменной валентности, что ведет к нарушению структуры и, как следствие, функционирования белков. Он превращается в активные формы азота АФА: нитроксил, нитрозоний, пероксинитрит. Пероксинитрит способен оказывать прямое токсическое действие на клетку [52], а все они способны окислять различные субстраты. Учитывая тот факт, что селектины в своей структуре содержат большое количество остатков цистеина и тиоловый радикал (RS), который имеет неспаренный электрон на атоме серы, повреждение структуры белков селектинов и PSGL-1 может приводить к нарушению роллинга и трансмиграции лейкоцитов в ткани, и являться триггером в развитии сосудистых заболеваний.

Помимо самого NO, его конечные стабильные метаболиты ($\text{NO}^{-2} + \text{NO}^{-3} = \text{NOx}$) также рассматриваются в качестве сигнальных молекул и маркеров патологии, в том числе, и как фактор риска сердечно-сосудистых событий. В научной литературе имеются данные, что NOx в высоких концентрациях могут восстанавливать уровень NO при заболеваниях, связанных с его недостаточной генерацией или сниженной биодоступностью; то есть, нитрат может выступать в качестве субстрата для дальнейшего продуцирования NO [230]. Таким образом, повышение циркулирующих NOx может явиться результатом адаптационных процессов, компенсирующих патологически недостаточный синтез активного

оксида азота в организме [21].

Известно, что изменение физиологических концентраций оксида азота (то есть, их снижение или снижение биодоступности NO) играет ведущую роль в механизмах активации и прогрессирования эндотелиальной дисфункции [157].

В настоящее время признана роль нарушения метаболизма оксида азота и ЭД в патогенезе различных заболеваний, в том числе кардиоваскулярных: атеросклероза, гипертонической болезни, артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, инфаркте миокарда, диабетической кардиомиопатии [13, 155, 202, 262, 322].

Нитрозилирующий стресс, вызванный неадекватным синтезом NO, также является составляющим звеном в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний [255, 263]. В результате генерации избыточных количеств оксида азота (II), как уже отмечалось выше, образуются токсичные продукты, влияющие на структуру белков, при этом в сыворотке крови определяются такие маркеры НС, как нитротирозин, битирозин (БТ), и метаболиты оксида азота.

НТ образуется при взаимодействии АФА с функциональными группами тирозина в структуре белков, и его можно признать маркером образования АФА при ряде клинических состояний [46, 100, 245].

Значительные количества НТ при долгосрочном воздействии АФА превращаются в битирозин (3,3-дитирозин), вследствие чего он также используется в качестве маркера нитрозативного стресса [117].

С другой стороны, НТ может явиться показателем изменения адгезивной функции эндотелия в результате модификации белковых молекул. В настоящее время исследователи отмечают как повышение, так и снижение НТ у пациентов с различной патологией по сравнению с контролем.

Можно предположить, что NO может выступать в качестве регуляторной молекулы для селектинов, поэтому актуальным является дальнейшее изучение возможного регуляторного влияния цикла оксида азота на функционирование молекул клеточной адгезии селектинов P-, E-, L- и их главного лиганда PSGL-1, оценивая выраженность оксидативного/нитрозативного стресса у пациентов с

заболеваниями сосудов нижних конечностей и проводя экспериментальное изучение влияния пероксинитрита и нитрозоглутатиона, как донатора оксида азота, на выработку эндотелиальными клетками и лейкоцитами изучаемых молекул.

В нашем исследовании мы остановили выбор на патологии сосудов нижних конечностей: атеросклерозе, артериальном тромбозе, венозном тромбозе и варикозном расширении вен.

От заболеваний периферических артерий нижних конечностей (ЗПА) страдают более 230 миллионов человек в мире, на их долю приходится 3-4% ампутаций и общий 5-летний уровень смертности 82,4 смерти на 1000 пациенто-лет с поправкой на продолжительность наблюдения. Ситуация осложняется повышенным риском неблагоприятных клинических исходов: ишемической болезни сердца и инсультов, потери конечности. Несмотря на свою распространенность и клиническую важность, ЗПА зачастую недооцениваются медицинскими работниками и пациентами. Это становится возможным вследствие ограниченной доступности диагностического теста первой линии, лодыжечно-плечевого индекса, в клиниках; неверного представления о том, что ЗПА не является смертельным [36, 145, 227, 303].

Необходимо отметить и важность патологии венозной системы. Хронические заболевания вен являются стойкими, прогрессирующими и также, часто недооцениваемыми, заболеваниями, широко распространёнными в общей популяции и имеющими социально-экономическое значение. Они включают в себя широкий спектр венозных аномалий, при которых отмечаются существенные изменения в структуре и функционировании венозной системы. В патофизиологии данных заболеваний взаимодействие между генетикой и факторами окружающей среды приводит к повышению венозного давления и нарушению возврата крови [335]. Кроме того, на их фоне формируются тромбозы глубоких вен (ТГВ) и их наиболее опасное осложнение – тромбоз лёгочной артерии (ТЭЛА) [123, 149].

Резюме

Таким образом, к настоящему времени многочисленные исследования,

включая модели *in vitro* и *in vivo*, продемонстрировали существенную роль селектинов P, L, E и их лиганда PSGL-1 в инициации важных внутриклеточных биохимических сигнальных путей и регуляции межклеточных взаимодействий лейкоцитов с эндотелием. Осуществляя селектин-зависимую активацию, адгезию и трансвазацию лейкоцитов, изучаемые молекулы клеточной адгезии являются непосредственными участниками различных физиологических и патологических процессов, в том числе, кардиоваскулярной патологии. Прерывание каскада взаимодействия лейкоцитов и эндотелиальных клеток является одним из основных направлений современных исследований, и его терапевтический потенциал находится в стадии интенсивного изучения. Разработка реальных ингибиторов взаимодействий селектин-лиганд *in vivo* является сложной задачей из-за двойственной роли селектинов.

Понимая роль оксида азота и его изменённого синтеза, как ключевого фактора в развитии ЭД, и учитывая участие селектинов в адгезивной функции эндотелия, можно предположить, что сам оксид азота и сигнальные молекулы, связанные с его изменённым синтезом, являются потенциальными регуляторами как адгезивной функции эндотелия, так и регуляторами функционирования селектинов.

В связи с вышеизложенным, дальнейшее изучение биохимических сигнальных путей, связанных с селектин-зависимыми клеточными взаимодействиями, даст важное представление о механизмах, участвующих в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, а также в перспективе окажет помощь в поиске новых подходов к разработке новых терапевтических вмешательств.

ГЛАВА 2. 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. Соответствует требованиям Надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice, GCP), а также Хельсинской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования».

В соответствии со сформулированными целью и задачами был разработан дизайн исследования (Рисунок 14), который включал в себя два блока. В первом блоке исследования объектом явились пациенты с заболеваниями периферических сосудов, таких как атеросклероз, артериальный тромбоз, венозный тромбоз и варикозное расширение вен. В качестве контрольной группы выступили здоровые доноры. Материалом для исследований послужила сыворотка крови. Во втором блоке, экспериментальном, объектом изучения послужили первичные клеточные культуры HUVEC (*human umbilical vein endothelial cell*), выделенные из пуповин здоровых рожениц, и фракционированные лейкоциты периферической крови – моноядерные (МЯЛ) и полиморфноядерные (ПМЯЛ), полученные от здоровых добровольцев. Материалом для исследования явились лизаты, гомогенаты клеток и клеточный супернатант.

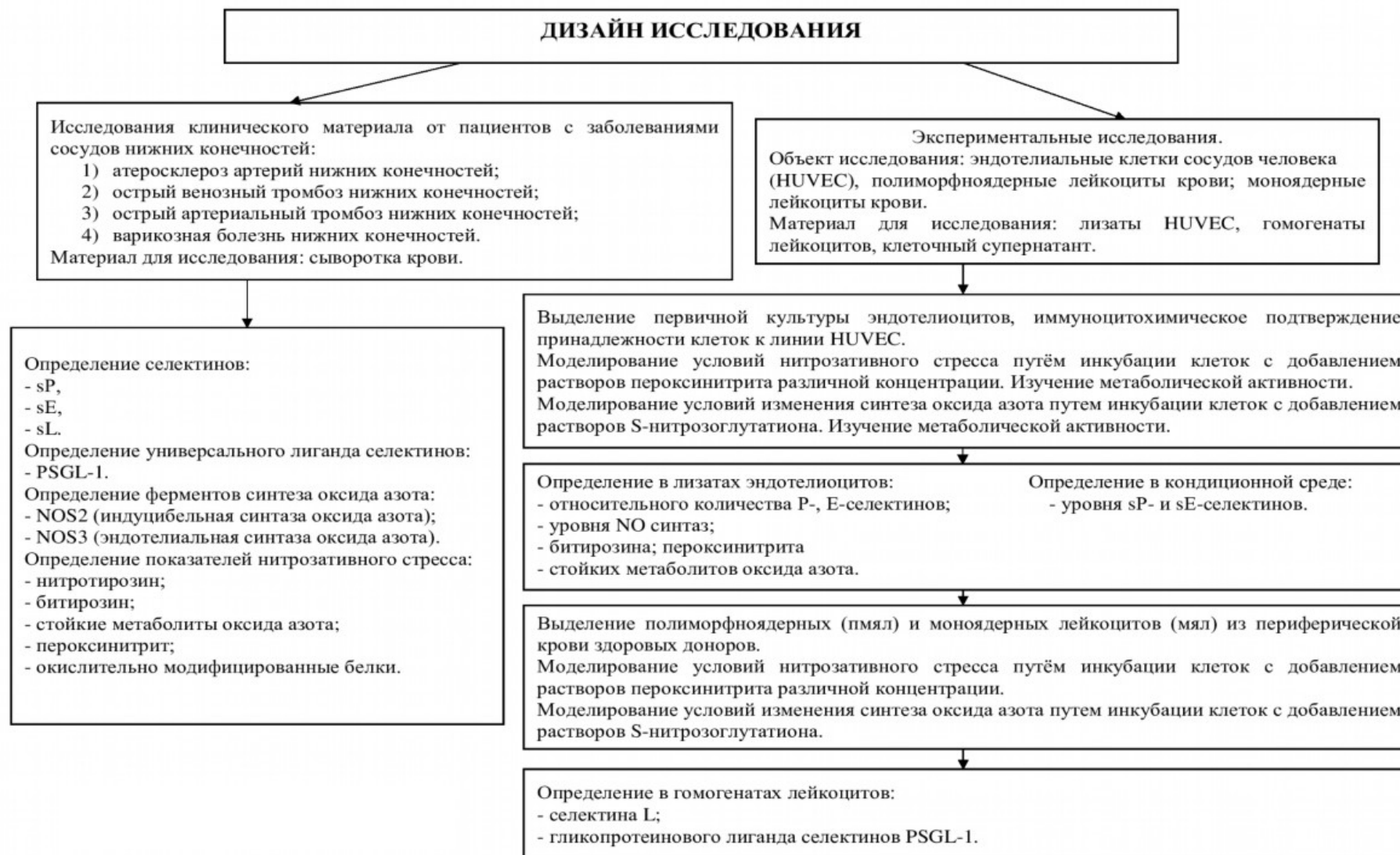


Рисунок 14 – Дизайн исследования

В рамках диссертационного исследования в сыворотке крови пациентов определялись абсолютное количество селектинов Р, Е, L и их универсального гликопротеинового лиганда, а также индуцибельная и эндотелиальная NO-синтазы, нитротирозин, битирозин, стойкие метаболиты оксида азота, пероксинитрит, ОМБ.

На первичной культуре HUVEC и фракционированных лейкоцитах в эксперименте изучалось влияние таких агентов, как пероксинитрит и S-нитрозоглутатион. В лизатах клеток HUVEC определялось относительное количество белков селектинов: Р – селектина, Е – селектина, индуцибельной и эндотелиальной синтазы, а также оценивались уровни компонентов системы цикла оксида азота (II): его стойких метаболитов, а также продуктов влияния оксида азота – битирозина, и взаимосвязи между указанными показателями. В клеточном супернатанте определяли абсолютное количество sP- и sE-селектинов. В гомогенатах лейкоцитов определяли абсолютное количество sL – селектина и PSGL-1.

2.1. Клиническая характеристика пациентов

Объектом исследования 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 тромбоэмболическими осложнениями: артериальный тромбоз или артериальная тромбоэмболия), (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: Государственном бюджетном учреждении Рязанской области «Больница скорой медицинской помощи» и в Государственном бюджетном учреждении Рязанской области «Областная

клиническая больница» в 2020-2023 гг.

Клинически здоровые доноры сдали кровь на исследование в отделении переливания крови Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областная клиническая больница». Письменные информированные согласия на проведение исследований были получены от всех пациентов и доноров. 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.

Специфические критерии невключения для каждой группы в отдельности описаны далее в описании соответствующих групп. Разделение пациентов на группы осуществлялось с использованием данных, представленных в историях болезни: установленного диагноза, анамнеза и данных инструментальных исследований.

Критериями исключения явился летальный исход.

Всем пациентам, поступающим на стационарное лечение, назначались стандартные исследования в соответствии с клиническими рекомендациями: клинический анализ крови (с лейкоцитарной формулой и СОЭ), общий анализ мочи, биохимический анализ крови: глюкоза, мочевины, креатинин, билирубин общий, билирубин непрямой, общий белок, АЛТ, АСТ, группа крови, резус-фактор, RW (сифилис), HCV (гепатит С), HBs (гепатит В), HIV (ВИЧ), ЭКГ (электрокардиография), флюорография или рентгенография легких, коагулограмма; а также ультразвуковое исследование артерий и вен нижних конечностей (УЗИ).

Пациенты всех групп и всех нозологических форм, получали оптимальную медикаментозную терапию согласно действующим клиническим рекомендациям по лечению соответствующей патологии. На момент поступления в стационар пациенты не принимали препараты, способные повлиять на синтез оксида азота

(II) и процессы окислительного/нитрозативного повреждения (нитраты, антиоксиданты).

Характеристика пациентов первой группы (здоровые доноры)

Все доноры, вошедшие в Группу 1, соответствовали предъявляемым к ним требованиям, согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ от 28 октября 2020 г. № 1166н «Об утверждении порядка прохождения донорами медицинского обследования и перечня медицинских противопоказаний (временных и постоянных) для сдачи крови и (или) ее компонентов и сроков отвода, которому подлежит лицо при наличии временных медицинских показаний, от донорства крови и (или) ее компонентов».

Возраст доноров варьировал от 41 до 60 лет, средний возраст составил $52,3 \pm 4,9$ года. По полу они распределились следующим образом: 17 мужчин (57%) и 13 женщин (43%). Средний возраст мужчин составил $52,23 \pm 5,33$ года. Средний возраст женщин составил $53,46 \pm 4,41$ года.

На момент сдачи крови у доноров отсутствовали какие-либо инфекционные заболевания: простуда, грипп, ангина, герпес, расстройства желудочно-кишечного тракта и другие.

Характеристика пациентов второй группы (атеросклероз артерий нижних конечностей)

В исследование был включен 31 пациент с хронической ишемией нижних конечностей I-IV стадии заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна [43]. Критериями невключения в исследование в данной группе пациентов, дополнительно к описанным выше, явились другие причины хронической ишемии нижних конечностей: ишемия, возникшая на фоне васкулитов, а также сосудистые осложнения сахарного диабета, гангрена конечности.

Возраст пациентов варьировал от 50 до 83 лет, средний возраст составил

67,6±7,2 года. По полу пациенты данной группы распределились следующим образом: 28 мужчин (90%) и 3 женщины (10%). Средний возраст мужчин составил 66,57±6,96 лет. Средний возраст женщин составил 75,67±2,08 лет.

Всем госпитализируемым пациентам проводилось стандартное, описанное выше, обследование. При УЗИ у пациентов определялись: окклюзия, стенозирование, нарушение локальной гемодинамики, изменённый кровоток, кальциноз, анэхогенный просвет. Для подтверждения диагноза пациентам проводилась аортоартериография нижних конечностей (КТ-ангиография и/или цифровая субтракционная ангиография).

Практически все пациенты имели сопутствующую патологию. Перечень сопутствующих заболеваний и % пациентов с сопутствующей патологией, по отношению ко всем пациентам в данной группе, представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Сопутствующая патология в группе пациентов с атеросклерозом

Вид патологии	Количество	%
Операция на артериях в анамнезе	3	9,68
ПИКС	6	19,35
ИБС	8	25,81
СД II типа	4	12,90
ГБ	14	45,16
ЦВБ	4	12,90
Ожирение	1	3,23
Хронический гастрит вне обострения	3	9,68
ЯБДПК	2	6,45
ХБП	2	6,45
ХОБЛ	1	3,23
Онкологические заболевания в стадии ремиссии	2	6,45
Примечание – ПИКС - постинфарктный кардиосклероз, ИБС – ишемическая болезнь сердца, СД-сахарный диабет, ГБ - гипертоническая болезнь, ЦВБ – цереброваскулярная болезнь, ЯБДПК – язвенная болезнь 12-перстной кишки, ХБП – хроническая болезнь почек, ХОБЛ - хроническая обструктивная болезнь лёгких.		

Для более детального анализа все пациенты данной группы были разделены на две подгруппы, согласно стадии хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротической этиологии по классификации А.В. Покровского-Фонтейна. В первую подгруппу вошли пациенты с I-IIб стадиями, с хронической ишемией нижних конечностей (ХИНК), проявляющейся перемежающейся хромотой, во вторую – с III-IV стадиями заболевания, то есть хронической ишемией, угрожающей потерей конечности (ХИУПК) (Таблица 4).

Таблица 4 – Количество пациентов с атеросклерозом нижних конечностей в зависимости от стадии хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротической этиологии согласно классификации А.В. Покровского-Фонтейна

	Стадия хронической ишемией нижних конечностей атеросклеротической этиологии I-IIб	Стадия хронической ишемией нижних конечностей атеросклеротической этиологии III-IV
Количество пациентов в подгруппе	11	20

Характеристика пациентов третьей группы (острый артериальный тромбоз нижних конечностей)

В исследование вошло 28 пациентов с данной нозологией, среди них 14 мужчин и 14 женщин. Критериями не включения в исследование в данной группе пациентов явился тромбофлебит поверхностных вен и тромбоз глубоких вен.

Возраст пациентов варьировал от 42 до 88 лет, средний возраст составил $65,5 \pm 15,7$ года. По полу доноры распределились следующим образом: 15 мужчин (50%) и 15 женщины (50%). Средний возраст мужчин составил 65,18 лет. Средний возраст женщин составил $63,18 \pm 16,49$ лет.

Согласно принятой в России классификации острой ишемии конечностей, предложенной в 2002 году И.И. Затевахиным с соавт. [25, 48] среди пациентов этой группы 9,5 % имели ишемию напряжения, 14,3 % - 1А степень, 28,6 % - 1Б степень, 14,3 – 2Б степень, 33,3 – 3 степень ишемии.

На УЗИ у пациентов определялись: окклюзия, стенозирование, нарушение

локальной гемодинамики, изменённый кровоток, кальциноз, анэхогенный просвет, тромботические массы.

Все пациенты с артериальным тромбозом для корректного дальнейшего анализа были разделены на две группы в соответствии с наличием артериального тромба или артериальной тромбоэмболии, их количество отражено в Таблице 5.

Таблица 5 – Количество пациентов с острым артериальным тромбозом нижних конечностей в зависимости от наличия тромба или тромбоэмболии

	Наличие артериального тромба	Наличие артериальной тромбоэмболии
Количество пациентов в подгруппе	16	12

Ряд пациентов имел сопутствующую патологию. Перечень сопутствующих заболеваний и % пациентов с сопутствующей патологией, по отношению ко всем пациентам в данной группе, представлены в Таблице 6.

Таблица 6 – Основные сопутствующие заболевания у пациентов с артериальным тромбозом артерий нижних конечностей

Вид патологии	Количество	%
ПИКС	5	17,85
ИБС	6	21,43
СД II типа	2	4,14
ГБ	11	39,29
ЦВБ	4	14,29
Примечание – ПИКС - постинфарктный кардиосклероз, ИБС – ишемическая болезнь сердца, СД-сахарный диабет, ГБ - гипертоническая болезнь, ЦВБ – цереброваскулярная болезнь		

Характеристика пациентов четвертой группы (варикозное расширение вен нижних конечностей, варикозная болезнь вен нижних конечностей)

В исследование вошло 30 пациентов с данной нозологией. Критериями невключения в исследование в данной группе пациентов явилось расширение вен, носившее вторичный характер: аномалии развития сосудов – венозные мальформации, сосудистые дисплазии, а также расширение подкожных вен,

развившееся вследствие перенесенного тромбоза глубоких вен (посттромботическая болезнь).

Возраст пациентов варьировал от 29 до 72 лет, средний возраст составил $49,4 \pm 11,6$ года. По полу доноры распределились следующим образом: 11 мужчин (36,67%), и 19 женщин (63,33%). Средний возраст мужчин составил $50,30 \pm 10,3$ года. Средний возраст женщин составил $47,72 \pm 12,1$ года.

Течение заболевания было симптомным. Пациентам было проведено УЗИ вен нижних конечностей. При проведении УЗИ у пациентов отмечалось наличие следующих признаков: кровоток фазный изменённый, расширение сафено-фemorального соустья, варикозная трансформация от умеренной до значительной, несостоятельность перфорантных вен заднебольшеберцовой группы, несостоятельность клапанов СФС, СПС, несостоятельность стволовых клапанов, несостоятельность глубоких и перфорантных вен.

В 6,7% случаев пациенты проходили предшествующее лечение с использованием склеротерапии, у 6,7% пациентов в анамнезе проводилась резекция притоков БПВ, у 1 пациента отмечался рецидив заболевания.

При подозрении на вторичный характер варикозной трансформации поверхностных вен, наличие ангиодисплазии или подозрении на сочетание первичного варикозного расширения вен конечности и проксимальной венозной обструкции у пациентов с ХЗВ проводилось выполнение дополнительных инструментальных методов обследования (флебография, МРТ-венография, КТ-венография).

Процентное соотношение пациентов по международной классификации CEAP (Clinical, Etiological, Anatomical, Pathophysiological; С – клинический класс заболевания, Е – этиология, А – анатомическая локализация заболевания, Р – патофизиологический тип расстройства) [55] оказалось следующим: С2 – 50%; С3 – 10%; С4 – 26,7%; С5 – 6,65%; С6 – 6,65%.

Для более детального анализа все пациенты данной группы были разделены также на 2 подгруппы согласно клиническому классу ХЗВ по классификации CEAP: в первую вошли пациенты с клиническим классом ХЗВ С1 - С2, во вторую – с

клиническим классом ХЗВ С3 – С6 по классификации СЕАР (Таблица 7).

Таблица 7 – Количество пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей в зависимости от клинического класса ХЗВ по международной классификации СЕАР

	Клинический класс ХЗВ С1-С2	Клинический класс ХЗВ С3-С6
Количество пациентов в подгруппе	19	11

Из сопутствующих заболеваний у пациентов отмечались следующие (Таблица 8).

Таблица 8 – Основные сопутствующие заболевания у пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей

Вид патологии	Количество	%
ПИКС	1	3,33
ИБС	1	3,33
ГБ	4	13,33
Ожирение	5	16,67
Хронический пиелонефрит	1	3,33
ЦВБ	1	3,33
ХБП	1	3,33
Коксартроз	1	3,33
Примечание – ПИКС - постинфарктный кардиосклероз, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ГБ - гипертоническая болезнь, ЦВБ – цереброваскулярная болезнь, ХБП – хроническая болезнь почек		

У четырёх пациентов болезнь осложнилась тромбофлебитом притоков большой подкожной вены, у одного – подкожной вены правой голени, у одного – состоявшимся кровотечением из язвы в анамнезе.

Характеристика пациентов пятой группы (острый венозный тромбоз нижних конечностей)

В исследование вошло 30 пациентов с данной нозологией. Критериями невключения в исследование в данной группе пациентов явилось наличие сопутствующего артериального тромбоза или эмболии магистральных артерий. Возраст пациентов варьировал от 42 до 73 лет, средний возраст составил $60,30 \pm 9,5$ года. По полу пациенты распределились следующим образом: 15 мужчин (50%) и 15 женщин (50%). Средний возраст мужчин составил $61,33 \pm 8,47$ лет. Средний

возраст женщин составил $59,27 \pm 10,65$ лет.

Пациенты данной группы для более детального анализа были разделены на 2 подгруппы в зависимости от уровня образования тромба: дистальная локализация – поражение на уровне подколенной и берцовой вен; и проксимальная локализация – поражение на уровне бедренно-подвздошного сегмента, а также нижней поллой вены (Таблица 9).

Таблица 9 – Количество пациентов с острым венозным тромбозом нижних конечностей в зависимости от локализации тромба

	Проксимальная локализация	Дистальная локализация
Количество пациентов в подгруппе	15	15

При тромбозах глубоких вен, в случае, когда на УЗИ не получалось определить проксимальную границу тромба, применялось ангиографическое исследование.

При УЗИ у пациентов определялись: признаки тромбоза соответствующей локализации (ЗББВ, МБВ, МПВ, ОБВ, ГБВ, ПБВ) с/без признаков реканализации, признаки флоттирующего тромба, непроходимость, расширение вен.

Также, как и в предыдущих группах, некоторые пациенты имели сопутствующую патологию. Перечень сопутствующих заболеваний и % пациентов с сопутствующей патологией, по отношению ко всем пациентам в данной группе, представлены в Таблице 10.

Таблица 10 – Основные сопутствующие заболевания у пациентов с острым венозным тромбозом вен нижних конечностей

Вид патологии	Количество	%
ПИКС	2	6,67
ИБС	4	13,33
СД II типа	3	10
ГБ	13	43,33
Ожирение	1	3,33
Хронический пиелонефрит	1	3,33
Подагра	1	3,33
Нефрэктомия	1	3,33
Аденокарцинома слепой кишки	1	3,33

Примечание – ПИКС - постинфарктный кардиосклероз, ИБС – ишемическая болезнь сердца, СД-сахарный диабет, ГБ - гипертоническая болезнь, ЦВБ – цереброваскулярная болезнь

2.2. Характеристика клеточных линий

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.

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). Кратковременная доставка в лабораторию не требовала особенностей транспортировки, но при необходимости сохранения материала в течение более длительного времени он хранился в холодильнике при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 4-6 часов.

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).

2.3. Получение материала для исследований

2.3.1. Получение сыворотки крови от доноров и пациентов

Материалом для исследования явилась сыворотка крови. В день включения в исследование образцы крови собирались однократно из локтевой вены утром натощак путём стерильной и атравматической венепункции в пробирки вакуумные, без наполнителя, 9 мл, 16×100 мм, красный, ПЭТФ (Китай), 2 шт. Кровь забирали до начала лечения антикоагулянтами и до проведения оперативного лечения.

Полученные образцы крови откручивали на центрифуге Centrifuge 5702 RN (Eppendorf AG, Hamburg), после 2-х часовой инкубации при комнатной температуре, в течении 20 минут при ускорении 1000g. Аликвотированные образцы хранились при -20 С в течение трёх недель.

2.3.2. Получение и культивирование первичной линии эндотелиоцитов

Выделение и культивирование первичных линий эндотелиальных клеток проводили на базе лаборатории клеточных технологий ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Все работы по пересеву, смене среды и культивированию клеточных культур проводились в ламинарном боксе II класса биологической безопасности (тип A2) ScanLaf MARS PRO (LaboGene, Дания). Клетки культивировали в среде для эндотелия Endothelial Cell Growth Medium (SIGMA, USA, кат. № 211-500) в CO₂ инкубаторе (WS-180SC, World Science, Корея) при температуре 37⁰C с 5% содержанием CO₂, в условиях стерильности.

Выделение первичной линии HUVEC (Primary Human Umbilical vein Endothelial Cells)

Выделение HUVEC проводили с использованием методики, основанной на общепринятых лабораторных протоколах [136, 275], и адаптированной в лаборатории клеточных технологий ЦНИЛ РязГМУ. Предварительно культуральный пластик (флакон культуральный, площадь 25 см², флакон, (Кат. № 70325, SPL Life Sciences, Корея) покрывали раствором коллагена или желатина для лучшей адгезии клеток. Для этого наливали желатин 0,1 % (кат. №Ф061, ООО НПП «ПанЭко, Россия) во флакон таким образом, чтобы он покрыл всё дно, помещали флакон в CO₂-инкубатор на 1 час. После данной процедуры сливали остатки желатина и подсушивали флаконы в течение 15 минут в ламинарном боксе.

Тщательно отмывали пуповину от остатков крови, обильно смачивая ее поверхность 70% этиловым спиртом и слегка массируя для удаления сгустков из сосудов, после чего вносили в ламинарный бокс, обрезали с двух сторон примерно

по 1 см. Затем находили просвет, вставляли в него катетер для вливания в малые вены типа «бабочка», не снимая защитного колпачка с иглы (диаметр колпачка примерно соответствует диаметру вены), закрепляли зажимом. Внимательно следили за тем, чтобы не перфорировать вену. Промывали вену от тромбов фосфатно-солевым буферным раствором Дульбекко (англ.: Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS) в объёме 20-40 мл. Заполняли вену раствором 0,1% раствором коллагеназы (Кат. № П011-1, ООО НПП «Панэко», Россия), пережимали зажимом свободный конец пуповины и еще немного заполняли тем же раствором, чтобы вена надулась, но не повредилась механически с целью получения именно культуры эндотелиоцитов без примеси фибробластов и гладкомышечных клеток (ГМК). Затем помещали вену с зажимами на 20 минут в CO₂-инкубатор при 37° С. Извлекали пуповину из CO₂-инкубатора, поверхность обрабатывали 70% этанолом, обрезали один из концов пуповины выше зажима над 50-мл центрифужной пробиркой и извлекали в пробирку содержимое пуповины, постоянно массируя ее и прогоняя через катетер раствор DPBS с Ca²⁺ и Mg²⁺ (Кат. № P061E, ООО НПП «Панэко», Россия). Клетки осаждали методом центрифугирования в пробирках объемом 15 мл (Кат. № 50115, SPL Life Sciences, Корея), 5 мин при 500g, супернатант удаляли. С целью удаления остатков ферментов клеточный осадок ресуспендировали в 25 мл DPBS и центрифугировали 5 мин при 500g, супернатант снова удаляли.

Клеточный осадок ресуспендировали в специальной питательной среде для клеток HUVEC и тщательно гомогенизировали пипетированием. Засеивали клетками выбранную культуральную посуду, предварительно покрытую 0,1 % раствором желатина (Кат. № Ф061, ООО НПП «Панэко», РФ). Культивировали клетки в питательной среде ECGM (Endothelial Cell Growth medium, CatNo.210-500, Cell Applications, Sigma Aldrich, США) в течение суток, после чего меняли питательную среду, удалив, таким образом, не прикрепившиеся выделенные клетки и, главным образом, зрелые клетки крови. Смену питательной среды осуществляли не реже, чем 1 раз в 3 дня, пересев клеток при достижении 90 % плотности монослоя 1:3 - 1:4 осуществляли на 75 см² фласк (Кат. № 70375, SPL

Life Siences, Корея), с использованием 0,25% раствора трипсина-ЭДТА (Кат. № П043п, ООО НПП «ПанЭко»).

Подсчёт клеток производили на автоматизированном счетчике количества и жизнеспособности клеток Countless (AMQAF1000, ThermoFisher Scientific, США).

Подтверждение принадлежности выделенных клеток к первичной клеточной линии HUVEC

Принадлежность выделенных клеток к первичной линии HUVEC проводили методом иммуноцитохимии с применением антител к специфическим белкам эндотелиальных клеток: CD -31 (англ.: кластер дифференцировки 31) и фактору фон Виллебранда (vWF).

Для этого удаляли питательную среду, промывали клетки раствором DPBS объемом 250 мкл, 3 раза по 5 минут, фиксировали охлажденным до -20°C метанолом объемом 250 мкл, оставляли на 15 минут при комнатной температуре. Далее собирали метанол, промывали клетки раствором DPBS объемом 250 мкл, 3 раза по 5 минут. Добавляли 0,1 %-ый раствор Тритона-Х-100 в объеме 250 мкл на 15 минут с целью пермеабилзации. Удаляли раствор Тритона-Х-100, промывали клетки раствором DPBS объемом 250 мкл, 3 раза по 5 минут. Далее добавляли к клеткам раствор BSA (англ.: Bovine serum albumin, бычий сывороточный альбумин)-DPBS объемом 250 мкл на 30 минут при комнатной температуре, удаляли раствор BSA-DPBS, не промывая клетки. Добавляли первичные антитела в соотношении 1:100: 10 мкл антител + 1,2 мл 1% BSA-DPBS-0,1% Tween-20 на 1 час при комнатной температуре или на ночь при $+4^{\circ}\text{C}$ объемом 150 мкл, после чего собирали их, промывали клетки раствором DPBS объемом 250 мкл, 3 раза по 5 минут. Добавляли вторичные антитела в соотношении 1:100: 10 мкл антител + 1,2 мл 1% BSA-DPBS на 1 час при комнатной температуре в темноте, собирали их, промывали клетки раствором DPBS объемом 250 мкл, 3 раза по 5 минут. Добавляли краситель DAPI в концентрации 0,1-1 мкг/мл и инкубировали 1 минуту. После выполненных процедур проводили фотодокументирование клеточной культуры.

Для идентификации эндотелиоцитов использовали первичные кроличьи

поликлональные антитела Anti-CD31 antibody, (Abcam ab28364) и кроличьи поликлональные Anti-Von Willebrand Factor, (Abcam ab6994), а также вторичные кроличьи антитела Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594 ab150080). Микроскопию проводили с использованием инвертированного лабораторного микроскопа Olympus CKX 53 (Япония), с цветной цифровой камерой (CCD 5 МПикс) с использованием медицинской программы для анализа и обработки цифровых изображений ImageJ (США).

2.4. Приготовление клеточных лизатов

2.4.1. Приготовление клеточных лизатов для проведения анализа вестерн-блот

Клетки культивировали в 6-луночных планшетах, предварительно покрытых 0,1 % раствором желатина, из расчета 10^5 клеток на лунку до достижения ими 90-100 % конфлюэнтности.

После инкубации с исследуемым веществом клетки снимали с поверхности культурального пластика с использованием раствора Трипсин-ЭДТА. Промывали раствором DPBS с целью удаления неприкрепившихся клеток. Подсчитывали количество клеток с 1 лунки планшета.

Центрифугировали клетки в течение 5 минут при 500 g на мультифункциональной настольной центрифуге Labogene ScanSpeed 1580R (Дания). Сливали супернатант, добавляли раствор DPBS.

Процедуру повторяли трижды, после чего сливали надосадок и добавляли лизирующий буфер Cell Lysis Buffer NP40 Thermo («Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ: 2 mM (4-(2-аминоэтил) бензенсульфонилфлуорида гидрохлорида (AEBSF)), 0,3 мкМ апротинина, 130 мкМ бестатина, 1 mM ЭДТА, 14 мкМ транс-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(4гуанидино) бутана (E-64), 1 мкМ лейпептина («Sigma-Aldrich», США) в течение 30 минут при +4°C и постоянном перемешивании из расчета 10^6

клеток на 40 мкл буфера. 30 минут в условиях холодильной камеры при температуре $+4^{\circ}\text{C}$, при этом каждые 10 минут проводили встряхивание на встряхивателе VortexV-32 (Latvia, BiosanSIA).

После описанной процедуры переносили пробы в конические эппендорфы объёмом 2 мл, центрифугировали на миницентрифуге Scanspeed mini (Labogene, Дания) течение 10 минут при 5000 g и 4°C .

Супернатант переносили в эппендорфы и замораживали при -80°C до проведения исследования.

2.4.2. Получение клеточных лизатов для проведения биохимических исследований

Клетки культивировали в 6-луночных планшетах из расчета 10^6 клеток на каждую лунку до достижения ими 90-100 % конфлюэнтности. После этого добавляли питательную среду с растворёнными в ней исследуемыми веществами.

После окончания эксперимента клетки снимали с лунок раствором трипсин–EDTA, 0,25%, кат. № П043п, ООО НПП «ПанЭко»). Далее клетки трижды промывали в 1 мл раствора DPBS, ресуспендируя и центрифугируя после каждого промывания.

После последнего центрифугирования к клеточному осадку добавляли 200 мкл DPBS и 20 мкл 0,5% раствора Тритона X-100, встряхивали на шейкере, инкубировали на льду в течение 10 минут, снова встряхивали на шейкере-инкубаторе, после чего хранили в условиях холодильника.

Перед исследованием продуктов нитрозилирующего стресса проводили трёхкратную разморозку-заморозку со встряхиванием после каждого цикла.

2.5. Фракционирование, культивирование и получение гомогенатов лейкоцитов

Разделение лейкоцитов на фракции производили методом изопикнического

центрифугирования (Рисунок 15) [29, 44].

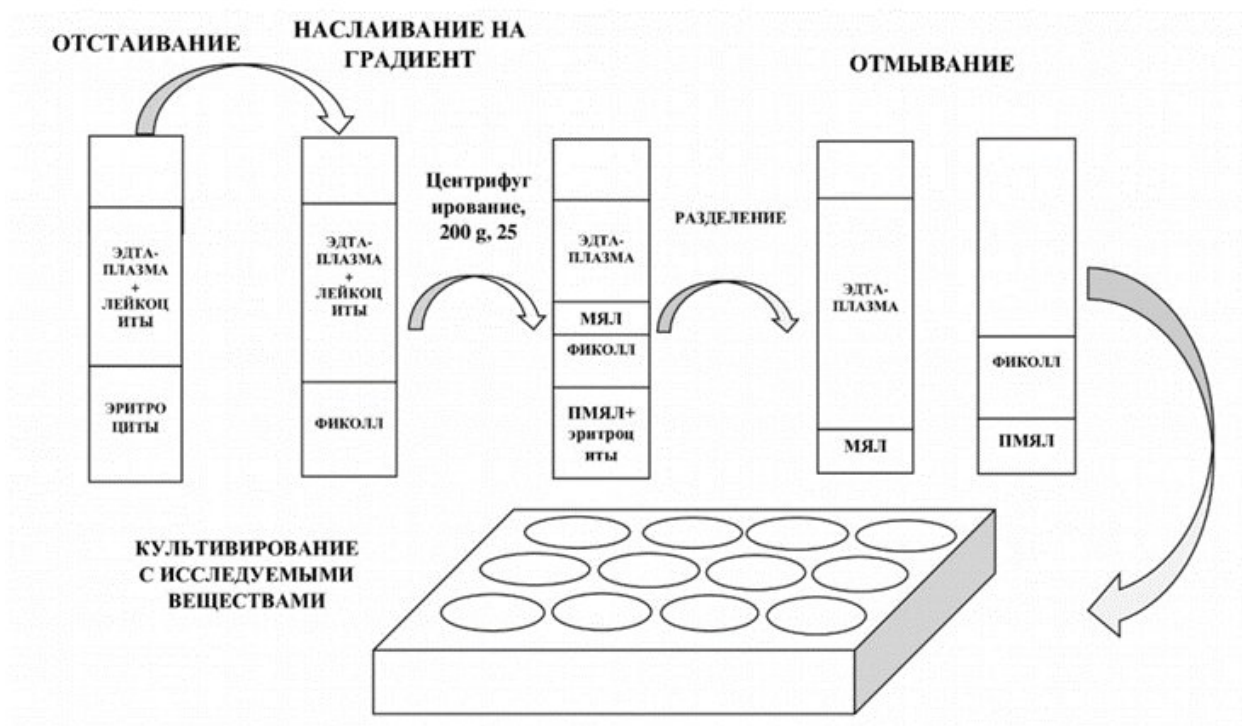


Рисунок 15 – Схема разделения лейкоцитов при изопикническом центрифугировании

С целью фракционирования лейкоцитов на первом этапе осаждали эритроциты 10% раствором реополиглюкина (декстран, средняя молекулярная масса 30000-40000, РУП Белмедпрепараты). После чего плазму, обогащённую лейкоцитами, наслаивали в соотношении 3:1 на раствор фикола, плотность 1,077, (ООО НПП «ПанЭко, Кат. № P052п) и центрифугировали при 200 g в течение 25 минут.

Интерфазный слой, содержащий моноклеары, отбирали и центрифугировали при 600 g в течение 10 минут для отделения от плазмы. Осадок гранулоцитов обрабатывали 0,9 % раствором хлорида аммония (ООО «АО Реахим», Москва, ОСЧ 4-5, ТУ 6-09-587-75) для удаления остаточных эритроцитов и центрифугировали 10 минут при 600 g.

Полученные осадки лейкоцитов троекратно отмывали 0,15 М раствором хлорида натрия (физиологический раствор, pH 5,0-7,5, кат № P011п, ООО НПП «ПанЭко») в соотношении 5:1 и пропускали через капроновый фильтр для удаления конгломератов клеток и подсчитывали в автоматизированном счетчике количества и жизнеспособности клеток Countless (ThermoFisher, США). Чистоту

разделения лейкоцитов проверяли микроскопией с использованием микроскопа бинокулярного «Микромед-2-20» (Микромед, Россия).

Культивирование лейкоцитов осуществляли в 12-луночных планшетах, питательной среде 199 жидкой с солями Хенкса, с глутамином (кат. №С230п, ООО НПП «ПанЭко», Россия) в условиях CO₂ инкубатора (температура 37⁰С, содержание CO₂ 5%).

Получение гомогенатов лейкоцитов

После инкубации лейкоцитов с тестируемыми веществами промывали их фосфатно-солевым буферным раствором Дульбекко (DPBS) без Ca²⁺ и Mg²⁺ (кат.№ P060п-1, ООО НПП «ПанЭко», Россия) и готовили гомогенат: к полученным осадкам отмытых лейкоцитов добавляли 0,01мл 2% раствора тритона X – 100 (TritonX-100, «MP Biomedical», США), доводили до концентрации 10⁶ – 10⁷ клеток/мл раствором DPBS и подвергали трёхкратному замораживанию – оттаиванию для окончательного разрушения плазматических и лизосомальных мембран. Далее с целью гомогенизации проводилось пипетирование через иглу малого диаметра. Нерастворимый материал осаждался центрифугированием (600g, 10 минут), жидкая надосадочная фракция использовалась для определения изучаемых показателей.

2.6. Получение пероксинитрита для экспериментальных исследований

Раствор пероксинитрита получали путём взаимодействия нитрита натрия («Химмед», Россия) и пероксида водорода [37, 76]. Методика получения пероксинитрита, определения его концентрации, количественной оценки непрореагировавших соединений описана в результатах исследования.

2.7. Дизайн экспериментального исследования

С целью проверки гипотезы о влиянии компонентов системы оксида азота на

селектины были проведены экспериментальные исследования, которые включали в себя моделирование НС путем инкубации клеток HUVEC с растворами пероксинитрита и моделирование условий изменения уровня оксида азота с растворами S-нитрозоглутатиона.

2.7.1. Влияние пероксинитрита на селектины Р, Е, синтазы NO и показатели нитрозирующего стресса

Серия 1: Инкубация клеток HUVEC с растворами пероксинитрита в концентрации 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 250 мкМ и 500 мкМ в течение 30 минут.

Серия 2: Экспериментальное моделирование нитрозативного стресса путем инкубации клеток HUVEC с растворами пероксинитрита в концентрации 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 250 мкМ и 500 мкМ в течение 1 часа.

Серия 3: Экспериментальное моделирование нитрозативного стресса путем инкубации клеток HUVEC с растворами пероксинитрита в концентрации 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 250 мкМ и 500 мкМ в течение 2 часов.

2.7.2. Влияние S-нитрозоглутатиона на селектины Р, Е, синтазы NO и показатели нитрозирующего стресса

Серия 1: Инкубация клеток HUVEC с растворами S-нитрозоглутатиона в концентрации 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 250 мкМ и 500 мкМ в течение 3 часов.

Серия 2: Инкубация клеток HUVEC с растворами S-нитрозоглутатиона в концентрации 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 250 мкМ и 500 мкМ в течение 24 часов.

Серия 3: Инкубация клеток HUVEC с растворами S-нитрозоглутатиона в концентрации 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 250 мкМ и 500 мкМ в течение 72 часов.

2.7.3. Влияние пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона на селектин L и PSGL-1

Серия 1: Инкубация фракционированных лейкоцитов крови (моноядерных и

полиморфноядерных) с растворами пероксинитрита в концентрации 50 мкМ, 100 мкМ и 250 мкМ в течение 30 минут.

Серия 2: Инкубация фракционированных лейкоцитов крови (моноядерных и полиморфноядерных) с растворами пероксинитрита в концентрации 50 мкМ, 100 мкМ и 250 мкМ в течение 1 часа.

Серия 3: Инкубация фракционированных лейкоцитов крови (моноядерных и полиморфноядерных) с растворами пероксинитрита в концентрации 50 мкМ, 100 мкМ и 250 мкМ в течение 2 часов.

Серия 4: Инкубация фракционированных лейкоцитов крови (моноядерных и полиморфноядерных) с растворами S-нитрозоглутатиона в концентрации 50 мкМ, 100 мкМ и 250 мкМ в течение 3 часов.

Серия 5: Инкубация фракционированных лейкоцитов крови (моноядерных и полиморфноядерных) с растворами S-нитрозоглутатиона в концентрации 50 мкМ, 100 мкМ и 250 мкМ в течение 24 часов.

Серия 6: Инкубация фракционированных лейкоцитов крови (моноядерных и полиморфноядерных) с растворами S-нитрозоглутатиона в концентрации 50 мкМ, 100 мкМ и 250 мкМ в течение 72 часов.

Контролем в каждой серии явились клетки, инкубируемые в питательной среде с добавлением эквивалентного объема физиологического раствора без добавления тестируемых веществ. Для каждой серии экспериментов, то есть, для каждой временной точки и каждой концентрации было выполнено по 3 повторения.

2.8. Определение метаболической активности клеток с применением МТТ-теста

Определение митохондриальной активности клеток под действием различных концентраций пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона (S-nitrosoglutathione, CAS-No: 57564-91-7, Israel) оценивали с использованием МТТ-теста [332].

Принцип метода основан на реакции восстановления соли тетразолия (3-

(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) жёлтого цвета дегидрогеназами митохондрий живых клеток до нерастворимых кристаллов формазана пурпурного цвета (Рисунок 16).

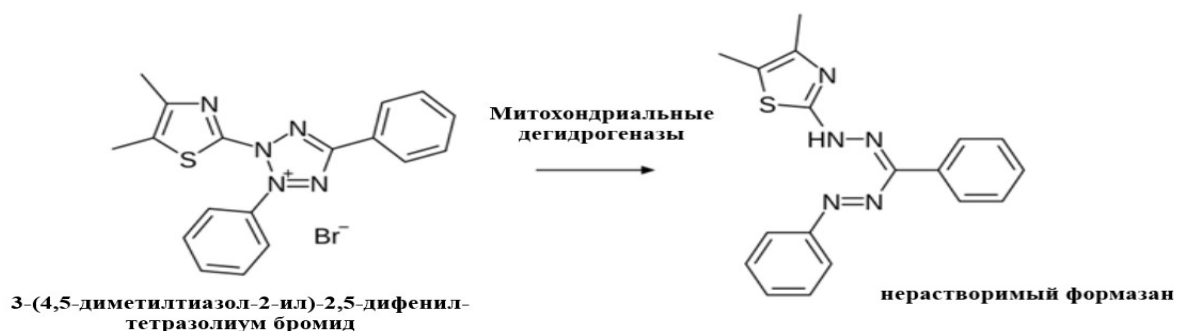


Рисунок 16 – Реакция превращения МТТ реактива (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромида) в формазан

Далее кристаллы формазана растворяют в ДМСО или в смеси HCl-изопропанол и определяют колориметрически.

Ход определения. Эндотелиоциты рассаживали на 96-ти луночный планшет с предварительно нанесенным на поверхность для прикрепления клеток 0,1 % раствором желатина, из расчета 10000 клеток на лунку, и культивировали в течение 24 ч в условиях CO₂ инкубатора. Через сутки, после смены среды, в экспериментальные лунки добавляли рабочие растворы пероксинитрита в культуральной среде и инкубировали в течение 30 минут, 60 и 120 минут. В контрольные лунки добавляли культуральную среду и физраствор. Затем производили смену среды и добавляли по 20 мкл 0,5% раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ, «ПанЭко», Россия) в физиологическом растворе в каждую лунку и инкубировали еще в течение 2 ч, после чего раствор МТТ удаляли и добавляли 100 мкл 1% раствора диметилсульфоксида (ДМСО) («ПанЭко», Россия).

Активность митохондриальных оксидоредуктаз оценивали фотоколориметрически по оптической плотности растворов в лунках, которую определяли через 10 минут при 530 нм, вычитая измеренное фоновое поглощение при 620 нм на микропланшетном ридере для планшетов StatFax 2100

(AwarenessTechnology, США). Результаты выражали в единицах оптической плотности/100 мкл растворителя.

2.9. Биохимические методы исследования

2.9.1. Определение абсолютного количества sP-, sE-, sL-селективных, их универсального лиганда PSGL-1 и NO-синтаз

Количественное определение sP, sE, sL – селективных, их гликопротеинового лиганда PSGL-1 и NO-синтаз проводили с использованием коммерческих наборов фирмы «Cloud-Clone Corp.» (Китай) сэндвич-методом иммуноферментного анализа.

Принцип метода. Метод основан на непрямом неконкурентном гетерогенном ИФА, в котором на планшете иммобилизуют антитела.

Ход определения. Стандартные и исследуемые образцы добавляются в лунки микропланшета, которые сорбированы антителами, специфичными к соответствующему белку. Далее в каждую лунку добавляется авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена, и производится инкубация. После добавления ТМБ (тетраметилбензидина гидрохлорида) происходит изменение окраски в лунках, содержащих селектив, PSGL-1, NO-синтазы. Ферментативная реакция прекращается путем добавления серной кислоты.

Оптическую плотность растворов измеряли на иммуноферментном анализаторе StatFax 2100 (microplatereader) (Awareness technology Inc. PalmCity, FL 34990, USA) на длине волны 410 ± 10 нм. Концентрацию белков рассчитывали в соответствии с калибровочной кривой. В случае разведения образцов концентрация, полученная при помощи стандартной кривой, умножалась на фактор разведения. Результаты выражали в нг/мл сыворотки.

2.9.2. Определение абсолютного количества нитротирозина

Количественное определение НТ проводили с использованием метода

конкурентного иммуноферментного анализа.

Принцип метода: микропланшет в наборе сорбирован моноклональными антителами, специфичными к НТ. Конкурентная реакция происходит между НТ, меченным биотином, немеченным НТ (в образцах или контроле) и сорбированными антителами, специфичными к НТ.

Ход определения. Стандартные и экспериментальные образцы добавляли в лунки 96-луночного планшета, перемешивали, избегая образования пены, далее несвязавшийся конъюгат удаляли отмывкой. Затем авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP), добавляли в каждую лунку планшета и проводили инкубацию. Количество связанного конъюгата пероксидазы хрена было обратно пропорционально концентрации НТ в образце. После добавления ТМБ интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации НТ в образце. Детекцию проводили на иммуноферментном анализаторе StatFax 2100 (microplate reader) (Awareness technology Inc. PalmCity, FL 34990, USA). Результаты выражали в нг/мл сыворотки крови.

2.9.3. Определение концентрации стабильных метаболитов оксида азота (II)

Для определения концентрации стабильных метаболитов NO (нитритов и нитратов) был использован метод в модификации В.А. Метельской [41].

Принцип метода: метод определения суммы ($NO_2^- + NO_3^- = NO_x$) стабильных метаболитов оксида азота в биологическом материале основан на восстановлении NO_3^- до NO_2^- хлоридом ванадия (III) с последующим спектрофотометрическим определением нитрита по окраске в реакции диазотирования нитритом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса.

Ход определения. К 0,2 мл исследуемой пробы приливали 0,4 мл этилового спирта для депротеинизации, центрифугировали 20 минут при 3000 об/мин. Далее в каждую лунку микропланшетного ридера добавляли по 80 мкл супернатанта, 80 мкл хлорида ванадия и 80 мкл реактива Грисса («Нева Реактив», Россия). Измерения производились на иммуноферментном анализаторе StatFax 3200

(microplate reader) (Awareness technology Inc. PalmCity, FL 34990, USA).

Концентрацию NOx рассчитывали по калибровочной кривой, построенной с использованием натрия азотистокислого NaNO₂ (ООО «Реактив», Россия). С целью построения калибровочного графика 1 М раствор NaNO₂ в воде перед употреблением разводили в 1000 раз и готовили серию дальнейших разведений. Интенсивность окраски определяли в видимой области спектра с регистрацией на микропланшетном анализаторе StatFax 2100 (microplatereader) (Awareness Technology Inc., США) при длине волны 540 нм. Результаты выражали в мкмоль/мл сыворотки крови.

2.9.4. Определение битирозина

Принцип метода. Принцип основан на образовании битирозина, который регистрируется по интенсивности флюоресценции в фосфатном буфере (pH 7,4) на спектрофлуориметре «Shimadzu RF-6000» (Япония) при длине волны возбуждения $\lambda_{ext}=325$ нм и длине волны испускания $\lambda_{em}=415$ нм. Флюоресценцию оценивали спектрофлуориметрическим методом. Полученные результаты выражали в единицах флюоресценции на мл сыворотки или на мг белка в лизате клеток.

Ход определения. Исследуемый материал (сыворотка крови, клеточные лизаты) объемом 100 мкл довели фосфатным буфером (pH 7,4) до 2 мл. Интенсивность голубой флюоресценции, которой обладает битирозин, детектировали на длине волны возбуждения $\lambda_{ext} = 325$ нм и длине волны испускания $\lambda_{em} = 415$ нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-6000 (Япония). Полученные результаты рассчитывали с использованием калибровочного графика (в качестве стандарта использовался битирозин, «Cambridge Isotope Laboratories», Франция) и выражали в единицах флюоресценции на мл сыворотки крови и в нмоль/мг белка в клеточных лизатах [94].

2.9.5. Определение относительного количества Р- и Е-селектинов, NO-синтаз методом вестерн-блот

Количество CD62P, CD62E, iNOS и eNOS в клетках линии HUVEC оценивали методом вестерн-блот.

Принцип метода. Метод основан на разделении белков по размеру с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, переносе на твёрдую подложку (нитроцеллюлозную или PVDF мембрану) и детекции с использованием антител, специфичных к заданному белку.

Ход определения. Белки полученного тотального клеточного лизата (30 мкг) подвергали электрофорезу с использованием 7,5% TGX Stain-Free Fast CastAcrylamide Kit («BioRad», США) в буферной системе Laemmli («Bio-Rad», США). Перед загрузкой образцы обрабатывали в соответствии с протоколом «Bio-Rad», смешивали в соотношении 2:1 с буфером для образцов Laemmli («Bio-Rad», США), содержащем 2,5% 2-меркаптоэтанола («Helicon», Россия), инкубировали 5 мин при температуре 70°C.

Электрофорез проводили при 100 В в течение 90 мин.

Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Trans-Blot Turbo MiniSize nitrocellulose, «Bio-Rad», США) с использованием Mini Trans-Blot («Bio-Rad», США) в течение 10 мин при 25 В и 1,3 А. Белки на мембране блокировали 1% раствором Casein Blocker («Bio-Rad», США), содержащим 0,1% Tween-20 («Sigma», Германия), при инкубации в течение 1 ч и комнатной температуре.

Определение относительного количества CD62P проводили с использованием первичных кроличьих антител (CD62P Ab, Cat.#: DF13294, «Affinity Biosciences», Китай); относительного количества CD62E – с использованием первичных кроличьих антител (SELE/CD62E Ab, Cat.#: DF6914, «Affinity Biosciences», Китай), в разведении 1:500 в блокирующем растворе Casein blocker в течение 20 минут при +37°C. Детекцию белка iNOS проводили с использованием первичных кроличьих антител (iNOSAb, Cat.#: AF0199, «Affinity Biosciences», Китай); детекцию белка eNOS проводили с использованием первичных кроличьих антител (NOS3 Ab, Cat.#: DF6450, «Affinity Biosciences», Китай); также в разведении 1:500 в блокирующем растворе Casein blocker в течение 20 минут при +37°C. После инкубации с первичными антителами мембрана

промывалась трис-солевым буферным раствором («BioRad», США), после чего инкубировалась 1 час при комнатной температуре с вторичными козлиными антителами (Goat Anti-Rabbit IgG H+L) HRP Cross-Adsorbed Secondary Antibody, «Affinity Biosciences», Китай) в разведении 1:4000, с последующим интенсивным трехкратным (один раз в течение 10 мин) промыванием TBS-T («BioRad»). Молекулярная масса белков была подтверждена путем сравнения с предварительно установленными маркерами молекулярного размера (Precision Plus Protein Standards Dual Color, «Bio-Rad»). Белок визуализировали хемилюминесценцией с помощью ChemiDoc XRS+ («Bio-Rad»). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения Image Lab («BioRad»). Количество изучаемых белков оценивали относительно белка домашнего хозяйства GAPDH с использованием первичных мышечных моноклональных антител GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight68 (1:1000; «Invitrogen», США) и вторичных антител Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody (1:4000; «Invitrogen», США).

2.9.6. Определение концентрации белка по методу Бредфорда

В супернатанте определяли количество белка по методу Бредфорда с помощью Coomassie Plus (Bradford) AssayKit («Thermo Scientific», США).

Принцип метода: метод основан на спектрофотометрической оценке синего окрашивания, развивающегося в результате взаимодействия красителя «Coomassie brilliant Blue G250» с боковыми радикалами основных и ароматических аминокислот в белке.

Ход определения: к 250 мкл исследуемого материала добавляли 10 мкл раствора красителя «Coomassie brilliant Blue G250» и ждали в течение 10 минут развития окраски. Количество белка оценивалось спектрофотометрическим методом по интенсивности окраски на микропланшетном анализаторе StatFax 2100 («Awareness Technology», США) при длине волны 595 нм [121]. Полученные результаты рассчитывали с помощью калибровочного графика (в качестве

стандарта использовался альбумин бычий сывороточный (QualityA (Standart quality), лот 58171946, Диа-М, Россия) и выражали в мг/мл белка.

2.9.7. Оценка интенсивности окислительной модификации белков в сыворотке крови

Проводилась по методу R.L. Levine [146] в модификации Е.Е. Дубининой [24, 45, 222].

Принцип метода: метод основан на реакции взаимодействия карбонильных групп и иминогрупп окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, обладающих специфическим спектром поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях спектра (Рисунок 17):

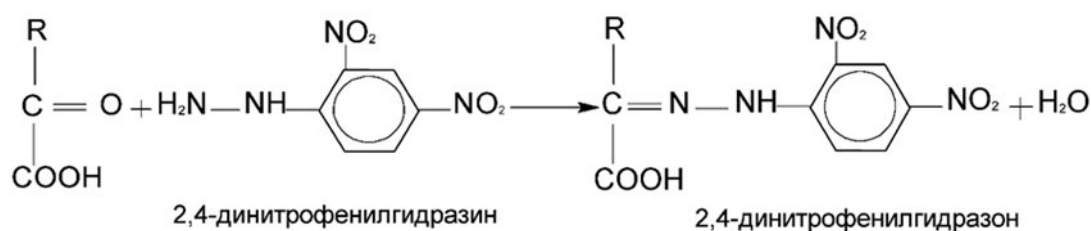


Рисунок 17 – Реакция превращения 2,4-динитрофенилгидразин в 2,4-динитрофенилгидразон

Ход определения. К 0,1 мл плазмы крови или гомогената ткани добавляли 1 мл 20 % раствора ТХУ для осаждения белка, 1 мл 2М раствора HCl в контрольные пробы и 1 мл 0,01 М раствора ДНФГ в 2М растворе HCl в опытные пробы. Пробирки ставили на 1 час в тёмное место. Центрифугировали пробы в течение 15 минут при 1000 g, затем проводили 3-х кратную отмывку полученных осадков от остатков ДНФГ смесью 96% раствора этилового спирта и этилацетата (1:1). Осадки высушивали, растворяли в 8М растворе мочевины, оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов регистрировали на спектрофотометре «СФ-26», Россия, при λ 230, 254, 270, 280, 356, 363, 370, 428, 430, 434, 520, 535 нм. Расчет содержания 2,4 ДНФГ в сыворотке крови выражали в единицах оптической плотности на мл сыворотки. Комплексная оценка содержания ОМБ проводилась

по авторскому патенту на изобретение № 2524667 (Фомина М.А., Абаленихина Ю.В., Фомина Н.В., Терентьев А.А.), разработанному на кафедре биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России [50].

2.9.8. Оценка концентрации пероксинитрита в сыворотке крови пациентов и в клеточных лизатах

Принцип метода. Основан на регистрации интенсивности сигнала по характерной полосе поглощения ONOO- при длине волны 302 нм. Концентрацию пероксинитрита в сыворотке крови и клеточных лизатах оценивали спектрофотометрическим методом на спектрофотометре СФ 2000 («ОКБ Спектр», Россия). Интенсивность сигнала регистрировали по характерной полосе поглощения ONOO- при длине волны 302 нм, далее пересчитывали с использованием молярного коэффициента $\epsilon_{302} = 1670 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. Полученные результаты выражали в нмоль/мг белка для клеточных лизатов [226] и в ммоль/л для сыворотки крови.

2.10. Методы статистической обработки полученных результатов

Базы данных по исследуемым пациентам были сформированы в таблицах MS Office Excel (Microsoft, США). 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 , Q_1 - Q_3), 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.

Критический уровень значимости – $p < 0,05$ (двусторонняя p). 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 ($M \pm SD$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ [58].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изучение показателей адгезивной функции эндотелия и степени выраженности нитрозативного стресса у пациентов с сосудистой патологией нижних конечностей: общие тенденции

Материалы данного раздела опубликованы в статьях:

- 1) Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Никифорова Л.В., Рябков А.Н. Изучение содержания Р, Е – селектинов и гликопротеинового лиганда PSGL-1 у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей. Молекулярная медицина. 2022. Т.20, №2. С. 39-45.
- 2) Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Никифоров А.А., Романов Б.К., Бодрова О.В. Оценка уровня селектинов и их лиганда PSGL-1 у пациентов с острым венозным тромбозом. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022. Т. 25, №. С.3-9.
- 3) Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Никифоров А.А., Захаров А.С. Оценка уровня селектинов и гликопротеинового лиганда PSGL-1 у пациентов с артериальным тромбозом. Технологии живых систем. 2023. Т. 20, № 4. С.72-79.
- 4) Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., и др. Артериовенозный фенотип эндотелиоцитов влияет на экспрессию эндотелий специфичных белков. Прикладные информационные аспекты медицины. 2025. Т.28, №1. С. 83-89. DOI: 10.18499/2070-9277-2025-28-1-83-89.
- 5) Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Никифорова Л.В., Фомина С.И. Взаимосвязь уровня NO синтаз и Р-, Е-селектинов у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей. Бултеровские сообщения. 2023. Т.75, №9. С.40-47.

Изучение биохимических особенностей функционирования эндотелия позволило сформулировать концепцию о его дисфункции, которая ассоциирована с большим количеством кардиоваскулярных заболеваний. В их число входят такие, как артериальный и венозный тромбозы, острый инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения, артериальная гипертензия, варикозное расширение вен нижних конечностей, атеросклероз периферических артерий [75]. Сердечно-сосудистая патология в первой половине нынешнего столетия продолжает оставаться на лидирующих позициях в структуре заболеваемости,

инвалидизации и смертности населения, являясь актуальной медико-социальной проблемой, вследствие чего интерес к изучению биохимических изменений функционирования эндотелия при патологии не угасает [7, 32, 35].

В начале исследования мы сконцентрировали внимание на различиях между изучаемыми показателями у здоровых людей (Группа 1, Контроль) и пациентов с патологией, как артерий, так и вен (Группа 2 и Группа 3 объединены в одну группу, Патология), то есть, между здоровыми донорами и пациентами с заболеваниями сосудов нижних конечностей. Были отмечены следующие тенденции и статистически значимые отличия (Таблица 11).

Таблица 11 – Уровень изучаемых показателей в сыворотке крови при патологии (совместно артериальной и венозной), по сравнению с контрольной группой, Ме [Q1;Q3]

Показатель	Группа	Медиана	Мин	Макс	Q1	Q3	Межквартильный 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

Продолжение Таблицы 11

Битирозин, ед. флюоресцен ции/мл сыворотки	Контроль	19,46	0,69	41,9	14,10	26,00	11,9
	Патологи я	15,2 (p=0,51)	0,5	178,7	4,80	35,65	30,85
Пероксинит рит, ммоль/л	Контроль	6,48	0,80	32,23	4,38	11,79	7,41
	Патологи я	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
	Патологи я	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 битиروزина, 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.

Различия между сосудами артериального и венозного типа подразумевают как фенотипические отличия, так и функциональные. Первое, что можно отметить, это напряжение сдвига: в артериях оно более высокое и достигает 10-40 дин/см². В венах кровотоков пассивный и скорость его в разы меньше: 1-5 дин / см². Артерии и вены имеют разную степень оксигенации и отличные друг от друга межклеточные контакты типа плотных «zona occludens», расположенных под ними адгезивных

контактов типа «zona adhaeren» при участии которых происходит взаимодействие кадгеринов с актиновыми филаментами цитоскелета клетки через прикрепляющие белки катенины [126].

Необходимо отметить наличие разницы между эндотелием сосудов разных органов, а также существование различий между артериальным, венозным и лимфатическим типом эндотелиоцитов. Такая дифференцировка обусловлена генетически на ранних стадиях онтогенеза до формирования сосудов и, собственно, всей системы кровообращения [18]. На ранних этапах эмбриогенеза в ходе нее происходит активация определённых генов. В артериальных эндотелиоцитах начинается экспрессия таких маркерных генов, как *NRP1*, *NOTCH1*, *NOTCH4*, *NOTCH5* и *EFNA1*, и впоследствии, синтез кодируемых этими генами белков: нейропилина 1, Notch-1, -4, -5; эфрина В2. В венозных эндотелиоцитах экспрессируются гены *EFNB4*, *NRP2*, *EMCN* и кодируемые ими белки – эфрин В4, нейропинин 2, эндомуцин, соответственно. На более поздних сроках эмбрионального развития и после рождения артериовенозная специализация проходит под влиянием гемодинамических факторов, которые в различных участках сосудистого русла отличаются [268].

В настоящее время описана так называемая «функциональная гетерогенность» эндотелия, которая подразумевает отличный друг от друга синтез биологически активных веществ эндотелием разных отделов сердечно-сосудистой системы. Как уже было отмечено ранее, эндотелиоциты легочных артерий накапливают фактор фон Виллебранда vWF и Р-селектин в тельцах Вейбеля-Палладе, но эндотелиоциты легочных капилляров также способны к синтезу указанных молекул, даже не имея последних. Ангиотензин-превращающий фермент в большей степени синтезируется в артериях легких, нежели мозга; селектин L не экспрессируется эндотелием клубочков почек в отличие от эндотелия другой локализации, например, эндотелия костного мозга [258]. Артериальный эндотелий обладает более плотными контактами и почти непроницаем для растворимых молекул. В отличие от него, венозный эндотелий более проницаем, вследствие чего является основным местом перемещения лейкоцитов в ткани [244].

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 12).

Таблица 12 – 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	Межквартильный размах
Селектин sP, нг/м	Группа 1	131,18	6,85	373,25	110,70	164,32	53,62
Селектин sP, нг/мл	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

Продолжение Таблицы 12

	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
Нитротирозин , нг/мл	Группа 3	374,20** (p=0,026)	183,8	609,00	293,40	579,60	286,2
Битирозин, ед. флюоресценц ии/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
Пероксинитри т, 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 ($p \leq 0,05$); ** – статистически значимые отличия Группы 2 от Группы 3 ($p \leq 0,05$) Группа 1 – контрольная группа Группа 2 – пациенты с артериальной патологией Группа 3 – пациенты с венозной патологией							

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

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. PSGL-1 в большей степени повышался при артериальной патологии.

Сыворотка крови пациентов с артериальной патологией содержала более высокие уровни NO-синтаз, 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 настоящее время роль оксида азота, генерируемого iNOS, в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний считается доказанной, если присутствует воспаление [17]. Тем не менее, вопрос о роли самого фермента в патогенезе данных заболеваний до сих пор дискутируется [197]. Имеются работы, показывающие ее положительную роль в снижении выраженности атеросклероза. Например, после введения агматина, являющегося продуктом декарбоксилирования аргинина, и являющегося по данным литературы ингибитором iNOS, кроликам с атеросклерозом, вызванным гиперхолестериновой диетой, выраженность атеросклеротических изменений снижалась [151]. В различных экспериментальных моделях на животных было отмечено положительное влияние ингибиторов iNOS на артериальную гипертензию, выраженность оксидативного стресса и нарушение функций сосудов [260].

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 eNO синтазы между пациентами с артериальной и венозной патологией: при артериальной он был выше.

В современной научной литературе имеются сведения, полученные в эксперименте на культуре эндотелиальных клеток, о том, что продолжительное воздействие сдвиговых напряжений стимулирует экспрессию гена eNO синтазы. Такая разница, полученная в клинических исследованиях, вполне может быть обусловлена пульсирующим характером кровотока в сосудах артериального типа. При этом своё влияние оказывает трансдукция растяжения, параллельно повышает

свою активность протеинкиназа В (Akt), фосфорилирующая эндотелиальную NO-синтазу по ключевому Ser1177, и повышающая её активность, вследствие чего происходит высвобождение оксида азота, что, в свою очередь, вносит вклад не только в вазомоторную, но и в другие функции эндотелия [237], включая адгезивную, регулируя трансмиграцию лейкоцитов, а также влияя на процессы адгезии и агрегации тромбоцитов.

Таким образом, можно сделать заключение, что как артериальная, так и венозная патология нижних конечностей сопровождается снижением в сыворотке крови sP-, sL-селектинов и тенденцией к снижению sE-селектина. А уровень PSGL-1, напротив, повышается по сравнению с контролем, и данное повышение гораздо более выражено у пациентов с артериальной патологией. Артериальная патология нижних конечностей ассоциирована с повышением уровней индуцибельной и эндотелиальной NO-синтаз; венозная патология нижних конечностей практически не сопровождается изменением уровня указанных ферментов. Таким образом, артериовенозная специализация эндотелиоцитов при патологии также влияет на синтез эндотелий специфичных белков E-селектина и eNOs, а также P-селектина, универсального гликопротеинового лиганда PSGL-1 и iNOS. Кроме того, артериальная патология связана с более высоким уровнем показателей нитрозативного стресса: нитротирозина, стабильных конечных метаболитов оксида азота – нитритов и нитратов, битирозина, пероксинитрита, ОМБ.

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

3.2.1. 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.

Первым мы оценили уровень растворимой формы sP-селектина и обнаружили её статистически значимое снижение в сыворотке крови пациентов всех изучаемых групп по сравнению с контролем (Рисунок 18).

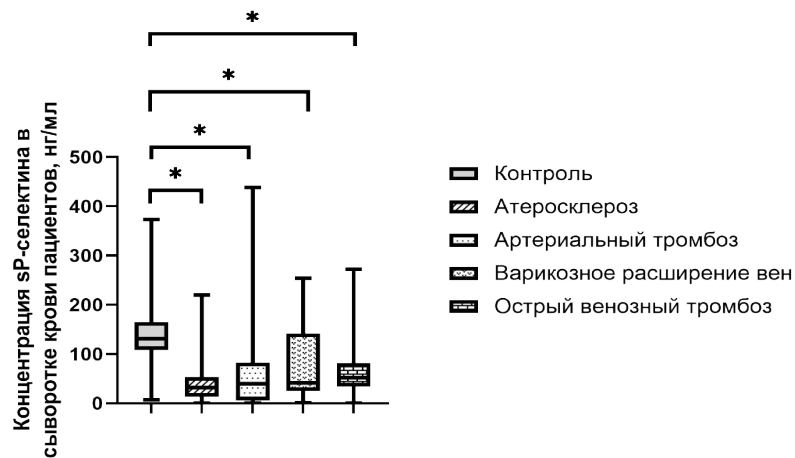


Рисунок 18 – Оценка уровня sP-селектина в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, нг/мл

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 (Рисунок 19).

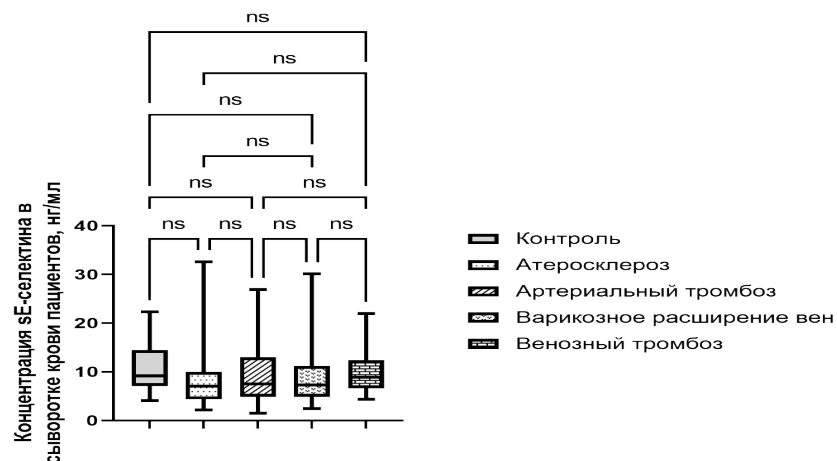


Рисунок 19 – Оценка уровня sE-селектина в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, Me [Q1;Q3], нг/мл

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

Уровень sL-селектина также обнаруживал однонаправленную с молекулами его семейства тенденцию, при этом, в случае с атеросклерозом ($p=0,033$) и варикозным расширением вен нижних конечностей отличия явились статистически значимыми ($p=0,011$) (Рисунок 20).

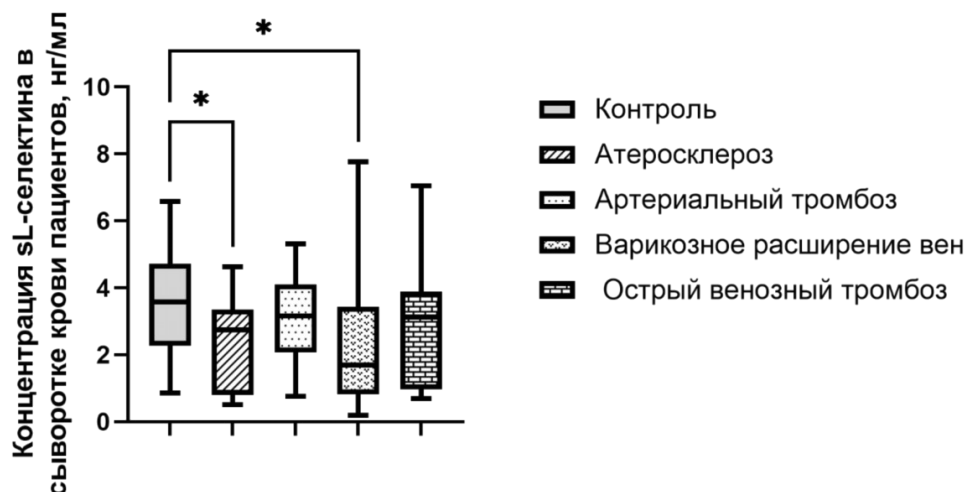


Рисунок 20 – Оценка уровня sL-селектина в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, Me [Q1;Q3], нг/мл

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

Таким образом, все три изучаемых нами молекулы клеточной адгезии, селектины sP, sE и sL у пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей демонстрировали более низкое содержание в сыворотке крови пациентов по сравнению со здоровыми лицами, что позволяет сделать вывод о вовлеченности каждого из них в патогенез сосудистой патологии.

3.2.2. Оценка уровня PSGL-1

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 ($p=0,014$) (Рисунок 21).

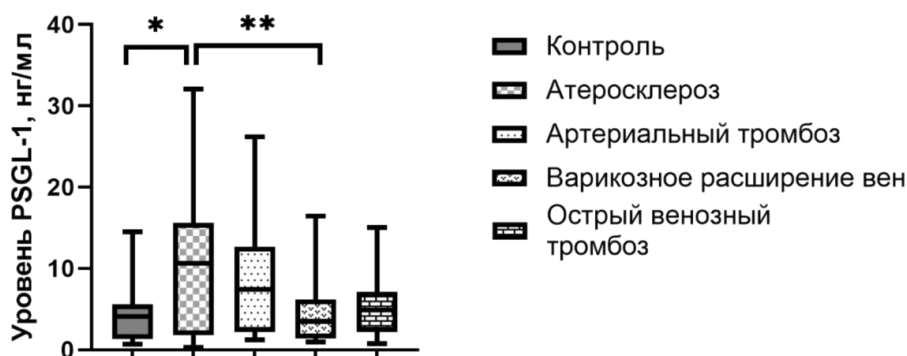


Рисунок 21 – Оценка уровня PSGL-1 в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, Ме [Q1;Q3], нг/мл
Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$
** - статистически значимые отличия от группы с атеросклерозом, $p \leq 0,05$

Кроме того, данный показатель был статистически значимо выше у пациентов с атеросклерозом, по сравнению с пациентами с варикозным расширением вен нижних конечностей ($p=0,047$).

3.2.3. 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 венозным тромбозом она была несколько ниже, чем в контроле (Рисунок 22).

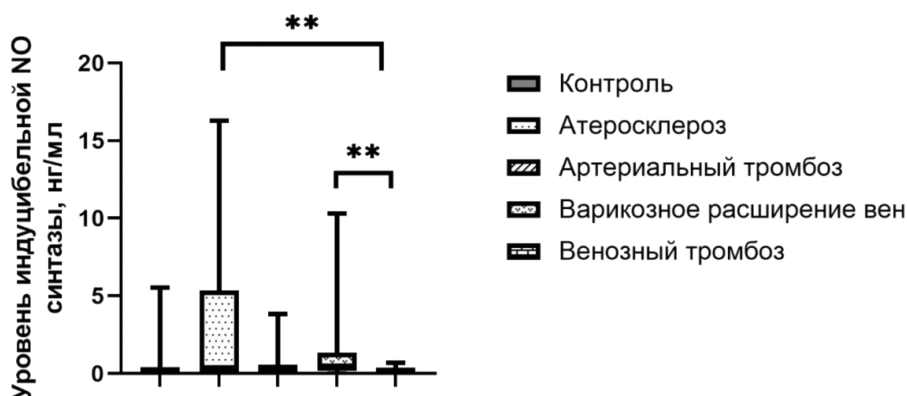


Рисунок 22 – Оценка уровня индуцибельной NO-синтазы в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, Ме [Q1;Q3], нг/мл
Примечание –** – статистически значимые отличия между группами, $p \leq 0,05$

Эндотелиальная NO-синтаза при сосудистой патологии нижних конечностей не демонстрировала статистически значимых изменений как по сравнению с контролем, так и между патологией ($p=0,103$) (Рисунок 23).

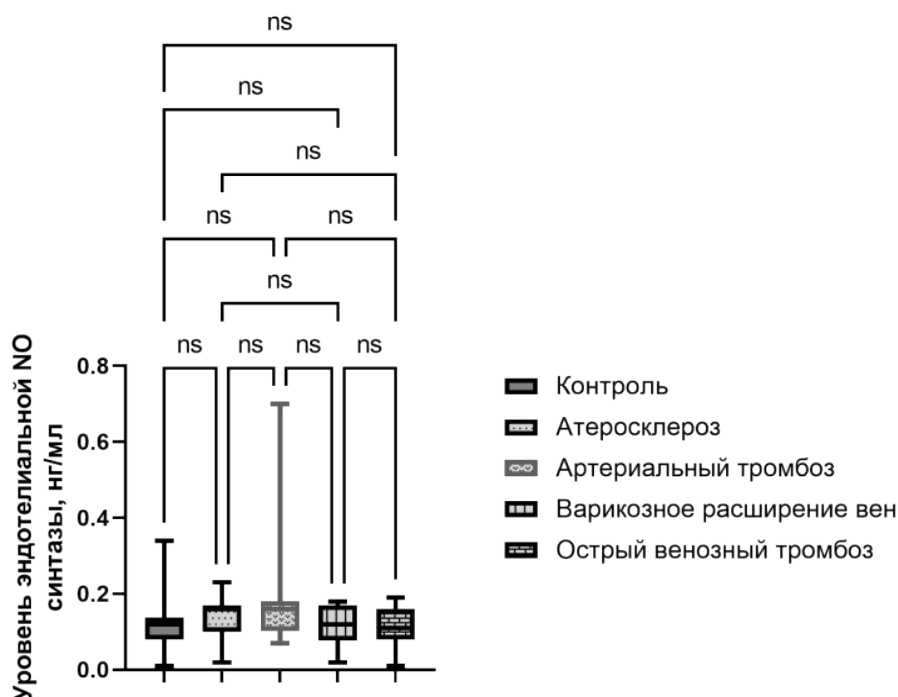


Рисунок 23 – Оценка уровня эндотелиальной NO-синтазы в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, Me [Q1;Q3], нг/мл
Примечание – ns – статистически не значимые отличия, $p>0,05$

3.2.4. Анализ степени выраженности нитрозативного/оксидативного стресса у пациентов с сосудистыми заболеваниями: стабильные метаболиты оксида азота, нитротирозин, битирозин, пероксинитрит и спонтанная окислительная модификация белков

Материалы данного раздела опубликованы в статьях:

1) Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Никифоров А.А., Фомина С.И., Алексеенко А.Д. Оценка связи между концентрацией PSGL-1, NO-синтаз и метаболитов оксида азота в сыворотке крови пациентов с острым артериальным тромбозом. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2024. Т.27, №7. С. 16-21.

2) Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Никифоров А.А. Идентификаторы нитрозативного стресса у пациентов с периферическим атеросклерозом. Прикладные информационные аспекты медицины. 2024. Т.7, № 2. С. 56-63.

Оценка уровня стойких метаболитов оксида азота в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей

Первым из показателей НС мы определили стабильные 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 24). 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 ($p=0,001$).

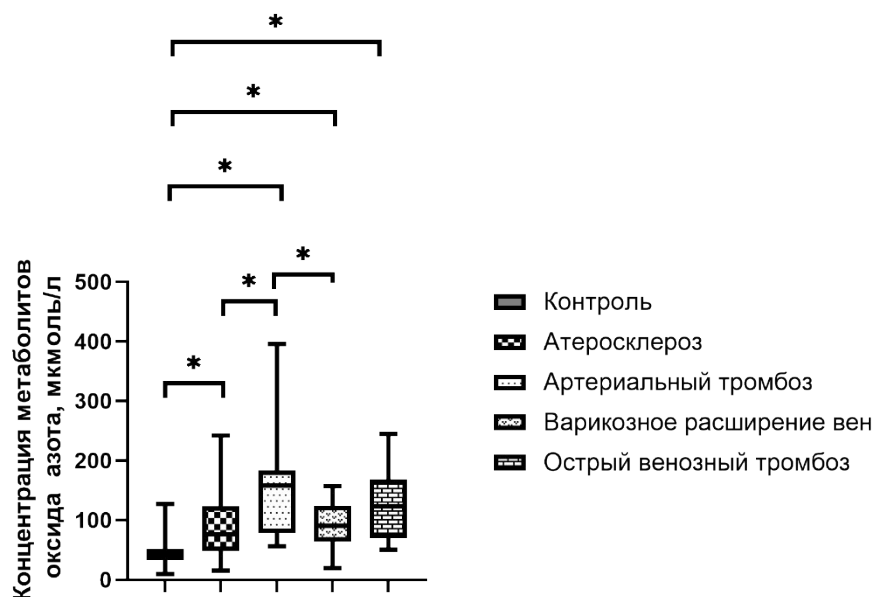


Рисунок 24 – Оценка уровня стабильных метаболитов оксида азота в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, Me [Q1;Q3], мкмоль/л

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

Оценка уровня нитротирозина в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей

Мы отметили, что нитротирозин при изучаемых патологиях имел тенденцию к повышению у пациентов с атеросклерозом, артериальными тромбозомболическими осложнениями, варикозным расширением вен по

сравнению с контролем (Рисунок 25). У пациентов с острым венозным тромбозом отмечался более низкий уровень нитротирозина, но статистическая значимость по сравнению с контролем отсутствовала. Однако, была отмечена статистически значимая разница в этом показателе между пациентами с артериальными тромбоэмболическими осложнениями и пациентами с острым венозным тромбозом ($p=0,015$).

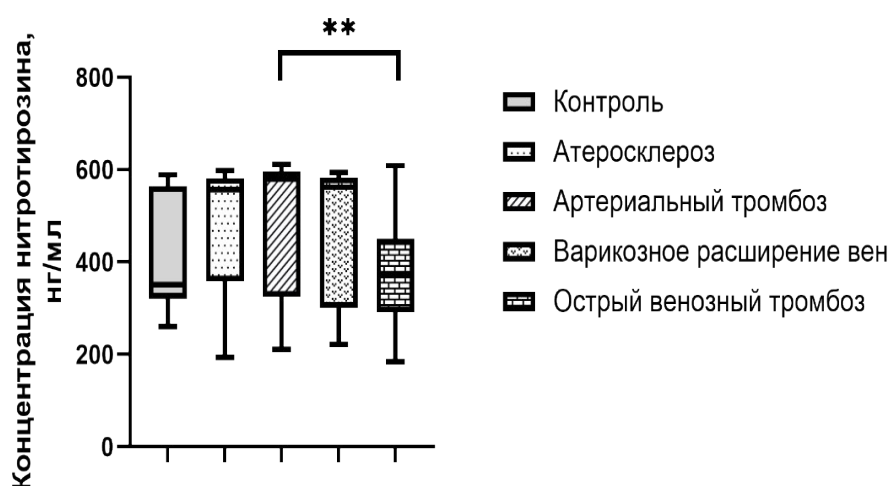


Рисунок 25 – Оценка уровня нитротирозина в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, Me [Q1;Q3], нг/мл
Примечание – ** – статистически значимые отличия от группы с артериальным тромбозом, $p \leq 0,05$

Оценка уровня битирозина в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей

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 26).

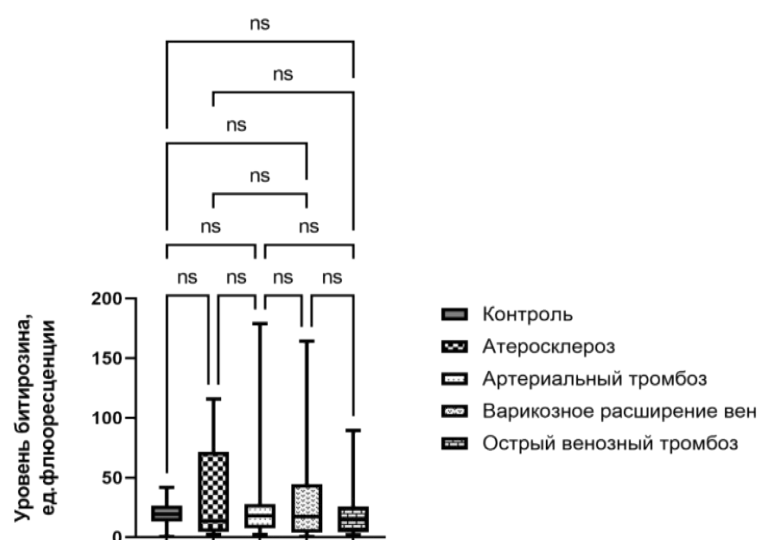


Рисунок 26 – Оценка уровня битирозина в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, Me [Q1;Q3], ед. флюоресценции
Примечание – ns – статистически не значимые отличия, $p > 0,05$

Оценка уровня пероксинитрита в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей

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 27).

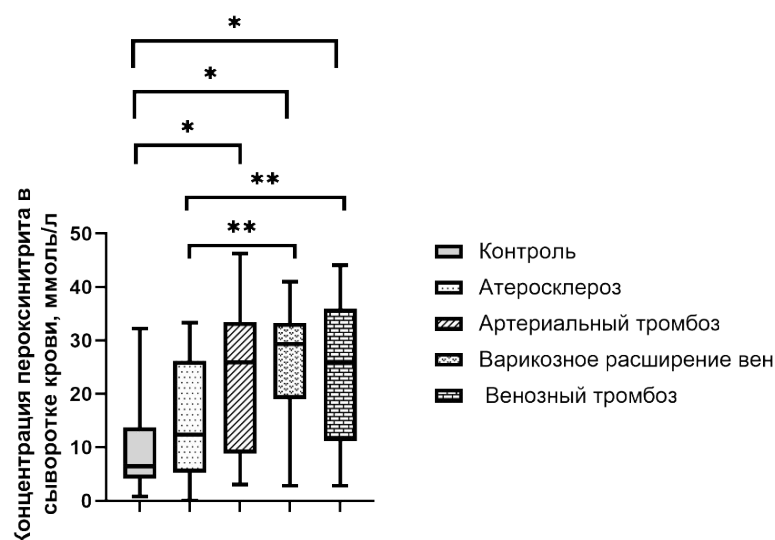


Рисунок 27 – Оценка уровня пероксинитрита в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, Me [Q1;Q3], ммоль/л
Примечание – * – статистически значимые отличия от группы контроля, $p \leq 0,05$;
** – статистически значимые отличия между группами с патологией, $p \leq 0,05$

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

Оценка уровня спонтанной окислительной модификации белков в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей

Далее было проанализировано изменение показателя спонтанной окислительной модификации белков, как маркера окислительного повреждения биомолекул (Рисунок 28).

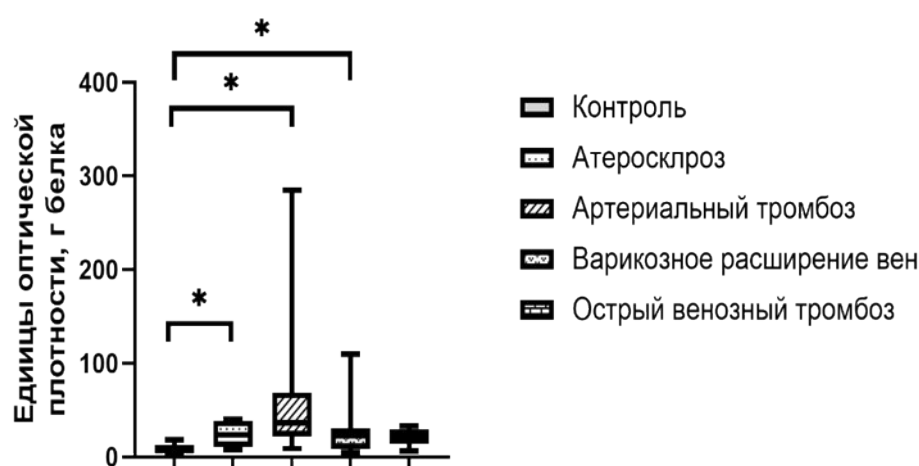


Рисунок 28 – Суммарная площадь под кривой спонтанной окислительной модификации белков в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, Me [Q1;Q3], ед.опт пл/г белка

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

При оценке ОМБ были получены статистически значимо повышенные по сравнению с контролем результаты в отношении групп пациентов с атеросклерозом ($p=0,019$), артериальным тромбозом ($p=0,0001$), варикозным расширением вен ($p=0,038$). Острый венозный тромбоз сопровождался тенденцией к повышению данного показателя, что не явилось статистически значимым.

ОМБ может быть как обратимой, так и необратимой. Обратимая, как правило, связана с повреждением остатков цистеина, в результате образуются глутатионтиолы, нитрозотиолы, дисульфиды, сульфеновая и сульфоновая кислоты.

Конечными продуктами необратимой ОМБ являются карбонилированные белки, нитротирозин, битирозин.

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

При проведении комплексной оценки состояния спонтанной окислительной модификации белковых молекул в сыворотке крови пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей были получены следующие сведения (Таблица 13, Рисунок 29). Суммарный уровень окислительно модифицированных белков был выше у пациентов с патологией по сравнению с группой контроля статистически значимо. Преобладающими фракциями, превышающими по числовым значениям группу контроля, явились первичные маркеры ОС – альдегиддинитрофенилгидразоны (АДНФГ), как нейтрального, так и основного характера. Их накопление свидетельствует о фрагментации белковых молекул в результате ишемических изменений на фоне атеросклероза. Хроническая ишемия приводит к нарушению кислородного метаболизма, развитию ацидоза и высвобождению катализаторов свободнорадикальных реакций, например, ионов металлов.

Обращает на себя внимание снижение вторичных маркеров ОС –кетондинитрофенилгидразонов (КДНФГ) в данной группе пациентов. В литературных источниках присутствуют отдельные сведения о пониженных уровнях карбонилированных белков, например, у мужчин с повышенным уровнем кортизола или у женщин с героиновой недостаточностью [63].

Кроме того, В. Gryszczyńska и соавторы (2017), изучая механизмы формирования карбонилированных белков при некоторых заболеваниях, связанных с атеросклерозом, пришли к выводу о разных уровнях исследуемого показателя у пациентов со следующими нозологиями: аневризмой абдоминальной аорты, аорто-подвздошной окклюзионной болезнью и хронической болезнью почек.

Таблица 13 – Комплексная оценка спонтанной окислительной модификации белков в сыворотке крови пациентов с атеросклерозом, Me [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					

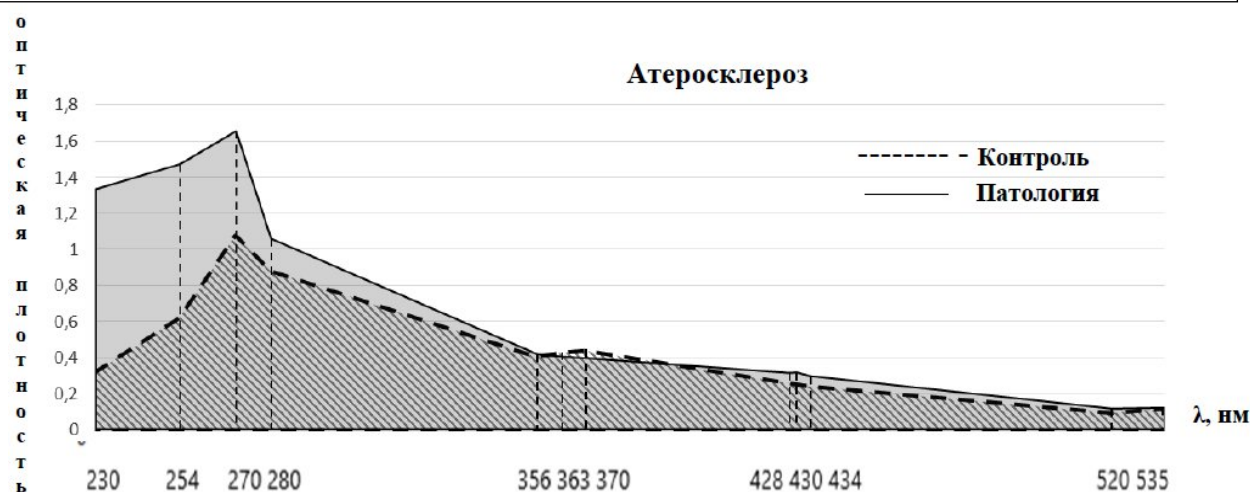


Рисунок 29 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов и их компонентов спонтанной ОМБ в сыворотке крови пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей, ед. опт.плотности

Опираясь также и на литературные данные, авторы высказали предположение о том, что широко применяемый спектрофотометрический метод определения концентрации ОМБ на основе реакции с 2,4-ДНФГ, вероятно, не выявляет все карбонилированные белки. ДНФГ реагирует исключительно со «свободными» реакционноспособными группами C=O, в то время как другие, менее доступные группы C=O, или сильно модифицированные карбонилированные белки не вступают в реакцию. Аналогичные предположения были сделаны для спектрофотометрического измерения на основе реакции с хлораминами T [93].

В то же время известно, что КДНГ являются вторичными маркерами ОМБ, свидетельствуют об агрегации белковых молекул; их снижение по сравнению с

контролем может указывать на активацию протеолитических систем, целью которых является деградация белков, утративших свои функции.

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

Суммарная оценка спонтанной окислительной модификации белков в сыворотке крови пациентов с артериальным тромбозом обнаружила тенденцию к повышению всех производных карбонилированных белков – как АДНФГ, так и КДНФГ (Таблица 14, Рисунок 30).

Таблица 14 – Комплексная оценка спонтанной окислительной модификации белков в сыворотке крови пациентов с артериальным тромбозом, Me [Q1;Q3], ед.опт.плотности/г белка

Группы	САДНФГ _н	САДНФГ _о	СКДНФГ _н	СКДНФГ _о	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					

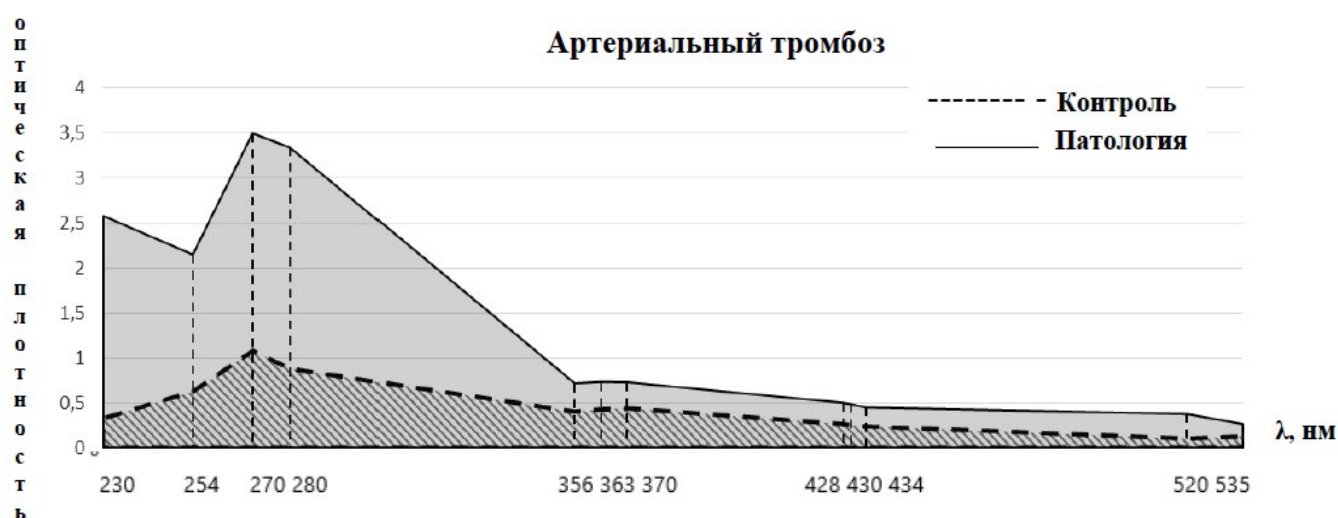


Рисунок 30 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов и их компонентов спонтанной ОМБ в сыворотке крови пациентов с артериальным тромбозом нижних конечностей, ед. опт. плотности

Статистически значимым при этом оказалось повышение КДФГ нейтрального характера и общей суммы ОМБ. То есть, при артериальном тромбозе отмечаются как явления первичного повреждения белков - фрагментации, так и более позднего - агрегации белковых молекул.

Также необходимо отметить, что именно при данной патологии повышение ОМБ было максимальным. При артериальном тромбозе происходит изменение или прерывание тока крови, что ассоциируется с явлениями ишемии-реперфузии, во время которых в эндотелиальных клетках генерируются высокие уровни АФК, что приводит к изменению функционирования митохондрий и, в конечном итоге, к усилению окислительных процессов и апоптозу эндотелиоцитов.

Суммарная оценка спонтанной окислительной модификации белков по общей площади под кривой в сыворотке крови пациентов с варикозным расширением вен

Анализ суммарного содержания окислительно модифицированных белков в сыворотке крови пациентов с варикозным расширением вен показал статистически значимое повышение АДНФГ нейтрального характера по сравнению с контролем (Таблица 15, Рисунок 31). Вторичные маркеры ОС так же, как и при атеросклерозе демонстрировали некоторую тенденцию к снижению по сравнению с группой контроля.

Таблица 15 – Комплексная оценка спонтанной окислительной модификации белков в сыворотке крови пациентов с варикозным расширением вен, Me [Q1;Q3], ед.опт.плотности/г белка

Группы	САДНФГ _н	САДНФГ _о	СКДНФГ _н	СКДНФГ _о	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					

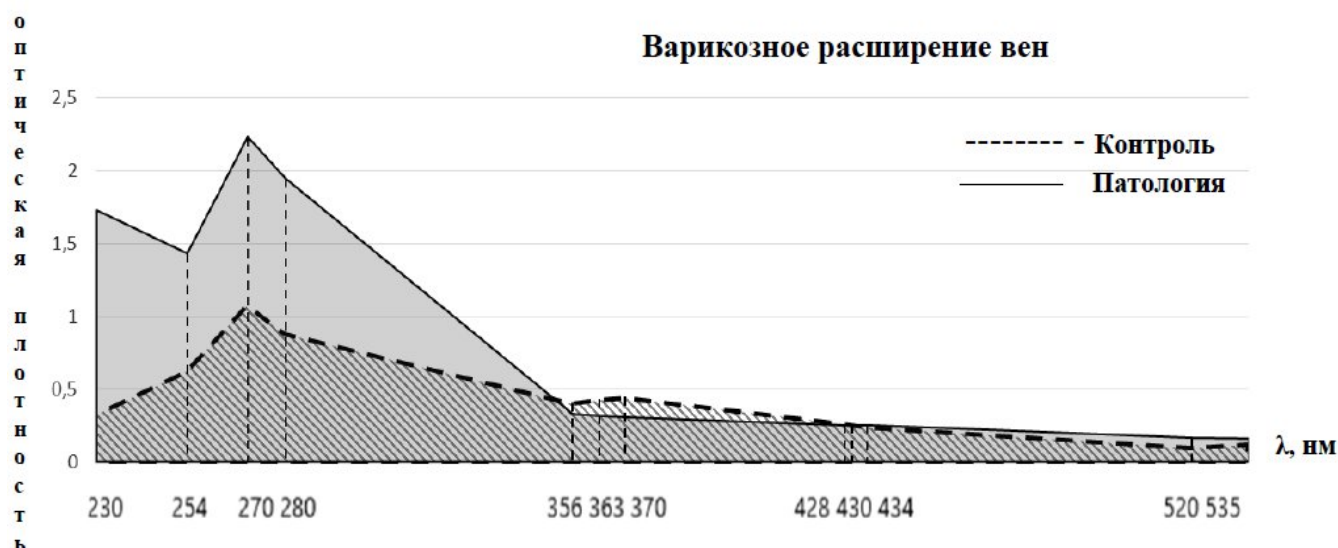


Рисунок 31 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов и их компонентов спонтанной ОМБ в сыворотке крови пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей, ед. опт. плотности

Суммарное же содержание ОМБ было статистически значимо выше, нежели в группе контроля, главным образом за счет показателей первичного повреждения белков - фрагментации белковых молекул.

Суммарная оценка уровня спонтанной окислительной модификации белков в сыворотке крови пациентов с острым венозным тромбозом

Анализ суммарного содержания продуктов спонтанной окислительной модификации белков у пациентов с острым венозным тромбозом не показал статистически значимых результатов, была отмечена тенденция к повышению общей суммы ОМБ по сравнению с группой здоровых доноров (Таблица 16, Рисунок 32). Максимальную тенденцию к повышению обнаружили также первичные маркеры оксидативного повреждения белков АДНФГ нейтрального характера, но данные отличия не явились статистически значимыми.

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.

Таблица 16 – Комплексная оценка спонтанной окислительной модификации белков в сыворотке крови пациентов с острым венозным тромбозом, Me [Q1;Q3], ед.опт.плотности/г белка

Группы	САДНФГ _н	САДНФГ _о	СКДНФГ _н	СКДНФГ _о	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					

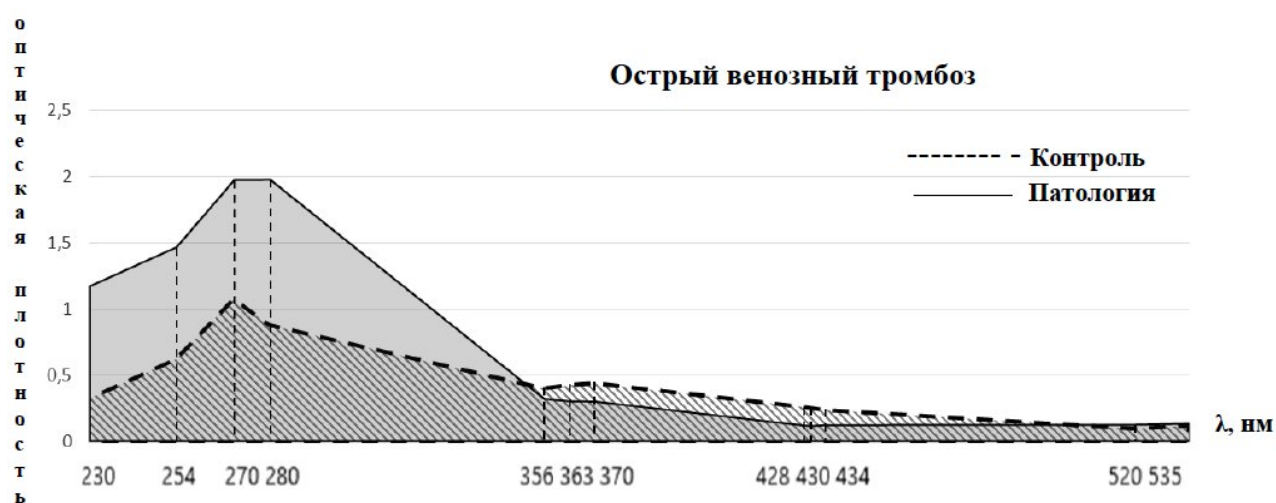


Рисунок 32 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов и их компонентов спонтанной ОМБ в сыворотке крови пациентов с острым венозным тромбозом нижних конечностей, ед. опт. плотности

При всей изучаемой нами патологии, максимально повышающейся по сравнению с контрольной группой, явилась фракция первичного повреждения белков АДНФГ, а вторичные маркеры ОС – КДФГ демонстрировали тенденцию к снижению при всех изучаемых патологиях, за исключением острого артериального тромбоза.

Подводя итог, можно отметить, что одним из факторов снижения селективных 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.

3.3. Изучение показателей адгезивной функции эндотелия и степени выраженности нитрозативного стресса у пациентов с сосудистой патологией в зависимости от клинических особенностей течения заболевания

Материалы данного раздела опубликованы в статьях:

1) Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Никифоров А.А., Фомина С.И., Алексеенко А.Д. Оценка связи между концентрацией PSGL-1, NO-синтаз и метаболитов оксида азота в сыворотке крови пациентов с острым артериальным тромбозом. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2024. Т.27, №7. С. 42-48. DOI: 10.29296/25877313-2024-07-00.

2) Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Никифоров А.А. Идентификаторы нитрозативного стресса у пациентов с периферическим атеросклерозом. *Прикладные информационные аспекты медицины*. 2024. Т.7, № 2. С. 56-63.

3) Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Поваров В.О., Никифоров А.А. Экспрессия селективных и выраженность нитрозирующего стресса у пациентов с острым тромбозом вен нижних конечностей. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2025. №3. С. 29-37. DOI: 10.29296/25877313-2025-03-04.

Для более детального изучения проблемы, и проведения более тонкого сравнительного анализа полученных на первом этапе результатов пациенты с каждой нозологией были разделены на подгруппы.

Так, пациенты с атеросклеротическим поражением были разделены на две подгруппы в зависимости от стадии хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротической этиологии по классификации А.В. Покровского-Фонтейна. В первую группу вошли пациенты со стадиями заболевания I-IIб; во вторую – со стадиями III-IV.

Пациенты с артериальным тромбозом были разделены на подгруппы в зависимости от наличия артериального тромба (1-я подгруппа) или артериальной тромбоэмболии (2 подгруппа).

Пациенты с варикозным расширением вен нижних конечностей были разделены в зависимости от клинического класса хронических заболеваний вен по классификации CEAP на две подгруппы: C1-C2 и C3-C6.

Пациенты с острым венозным тромбозом были разделены на две подгруппы в зависимости от локализации тромба: на подгруппу с проксимальной локализацией тромба и подгруппу с дистальной локализацией тромба.

3.3.1. Изучение показателей адгезивной функции эндотелия и степени выраженности нитрозативного стресса у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей в зависимости от стадии хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротической этиологии по классификации А.В. Покровского-Фонтейна

Оценка уровня селектинов sP, sE, sL

При внутригрупповом сравнении мы отметили снижение sP-селектина, статистически значимое по сравнению с контролем в обеих группах (Рисунок 33).

Мы отметили более выраженное снижение sP селектина – в 5 раз ($p=0,001$), у пациентов 1 группы, то есть, с менее выраженной стадией хронической ишемии, нежели во второй подгруппе. Во второй подгруппе показатель был ниже контрольных значений в 2,9 раза ($p=0,001$).

Таким образом, у пациентов, как с начальными, так и с более выраженными стадиями хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротической этиологии отмечается снижение растворимой формы молекулы клеточной адгезии sP-селектина в сыворотке крови по сравнению со здоровыми людьми.

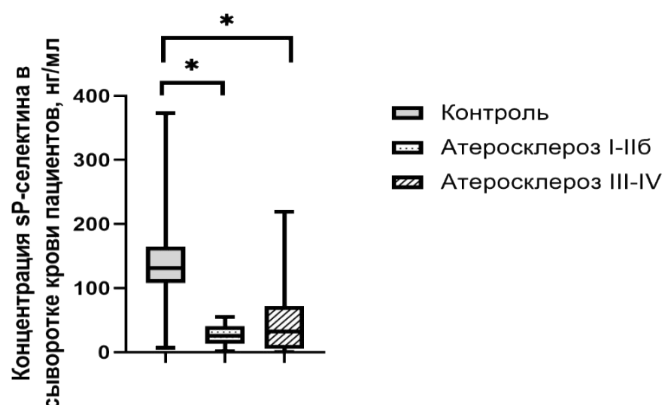


Рисунок 33 – Оценка уровня селектина sP в сыворотке крови пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей, Me [Q1;Q3], нг/мл
Примечание —*— статистически значимые отличия от контроля, $p \leq 0,05$

При оценке содержания sE-селектина и проведения межгруппового анализа была отмечена тенденция к снижению у пациентов с I-IIб стадиями хронической ишемии, и статистически значимое снижение данного селектина, в 1,4 раза по сравнению с контролем, для пациентов с III-IV хронической ишемии ($p=0,05$) (Рисунок 34).

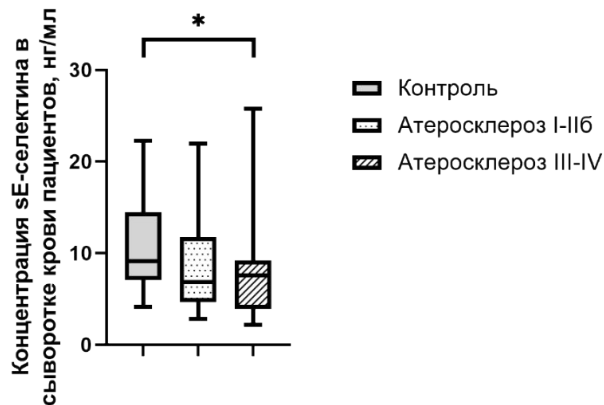


Рисунок 34 – Оценка уровня селектина sE в сыворотке крови пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей, Me [Q1;Q3], нг/мл
Примечание –*– статистически значимое отличие от контроля, $p<0,05$

Изменения концентрации sL-селектина было аналогичным изменению sE-селектина, продемонстрировало тенденцию к снижению у пациентов с начальными - I-IIб стадиями хронической ишемии атеросклеротической этиологии, при этом вторая подгруппа демонстрировала статистически значимое его снижение ($p=0,045$) (Рисунок 35).

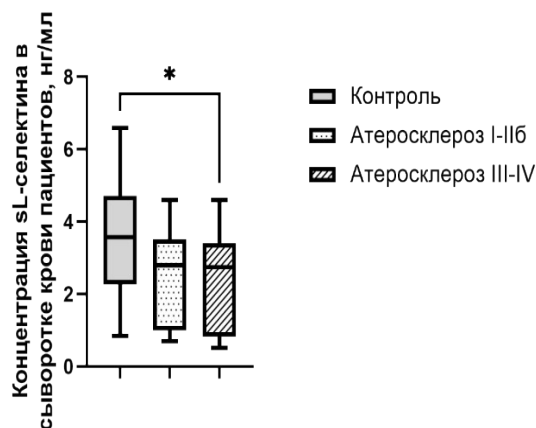


Рисунок 35 – Оценка уровня селектина sL в сыворотке крови пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей, Me [Q1;Q3], нг/мл
Примечание –*– статистически значимое отличие от контрольной группы, $p<0,05$

Оценка уровня PSGL-1

Уровень PSGL-1 имел также тенденцию к повышению по сравнению с контрольными значениями у пациентов с I-IIб стадиями хронической ишемии атеросклеротической этиологии. У пациентов с III-IV стадией хронической ишемии атеросклеротической этиологии данное повышение оказалось статистически значимым, и превышала таковой показатель у доноров в 2,5 раза ($p=0,008$) (Рисунок 36).

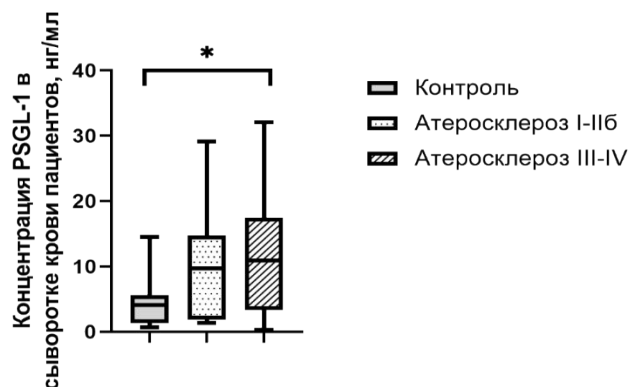


Рисунок 36 – Оценка уровня селектина PSGL-1 в сыворотке крови пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей, Me [Q1;Q3], нг/мл

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

Оценка уровня индуцибельной и эндотелиальной синтазы оксида азота

Уровень изучаемых синтаз оксида азота демонстрировал разные тенденции (Рисунок 37).

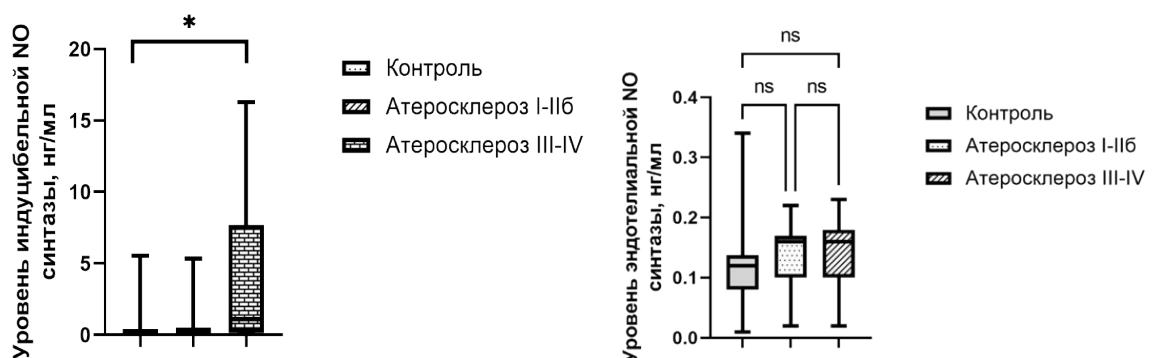


Рисунок 37 – Оценка уровня NO синтаз в сыворотке крови пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей, Me [Q1;Q3], нг/мл

Примечание – * – статистически значимое отличие от контрольной группы, $p < 0,05$;

ns – статистически не значимые отличия, $p > 0,05$

Индуцибельная повышалась статистически значимо у пациентов с III-IV стадией хронической ишемии атеросклеротической этиологии ($p=0,007$) по сравнению с контролем.

Эндотелиальная NO-синтаза имела тенденцию к повышению, как у пациентов первой, так и второй подгруппы.

Анализ степени выраженности нитрозативного/оксидативного стресса

Далее были проанализированы показатели, являющиеся маркерами нитрозилирующего стресса (Таблица 17).

Таблица 17 – Анализ степени выраженности нитрозативного/оксидативного стресса у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей, Ме [Q1; Q3]

Показатель	Группа	Медиана	Мин	Макс	Q1	Q3	Межквартильный размах
Метаболиты оксида азота, мкмоль/л	Группа 1	43,15	9,97	45,09	33,5	51,12	17,62
	Группа 2	115,11* ($p=0,001$)	54,64	260,31	71,40	146,31	74,91
	Группа 3	92,39* ($p=0,004$)	15,75	241,82	46,94	127,43	80,49
Нитротирозин, нг/мл	Группа 1	350,9	259,50	420,37	320,00	560,80	240,80
	Группа 2	544,00 ($p=0,18$)	228,10	597,80	364,90	560,80	195,90
	Группа 3	571,00 ($p=0,18$)	192,80	609,00	383,80	581,50	197,70
Битирозин, ед. флуоресценции/мл сыворотки	Группа 1	19,46	0,69	20,07	14,10	26,00	11,90
	Группа 2	38,40 ($p=0,28$)	3,00	115,73	6,85	89,03	82,18
	Группа 3	12,35 ($p=0,28$)	2,50	112,40	5,49	37,18	31,69
Пероксинитрит, ммоль/л	Группа 1	5,86	0,80	32,23	1,91	17,44	19,35
	Группа 2	13,88* ($p=0,05$)	7,09	32,07	8,02	21,43	29,45
	Группа 3	10,79 ($p=0,066$)	2,78	33,31	3,71	28,98	32,69

Примечание – Группа 1 – контрольная группа;

Группа 2 – пациенты со стадией хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротической этиологии I-IIб;

Группа 3 – пациенты со стадией хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротической этиологии III-IV;

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

**– статистически значимые отличия Группы 2 от Группы 3 ($p \leq 0,05$)

Среди показателей НС также повышались по сравнению с контролем конечные метаболиты оксида азота, пероксинитрит, ОМБ.

Нитротирозин и битирозин не менялись статистически значимо, тем не менее, нитротирозин имел тенденцию к повышению в сыворотке крови пациентов с атеросклерозом по сравнению с контрольной группой, а битирозин – тенденцию к повышению в первой подгруппе и тенденцию к снижению – во второй подгруппе.

Наиболее предпочитаемая локализация атеросклеротических бляшек в периферических артериях – это зона бифуркаций. Вследствие расширения просвета сосуда в результате его анатомического деления замедляется кровоток, что сопровождается явлениями турбулентности, повреждающими эндотелиальную выстилку. Развивается ишемия тканей, отмечается ухудшение микроциркуляции и нарушение метаболических процессов в конечности с накоплением недоокисленных продуктов обмена, ведущие к метаболическому ацидозу.

Как правило, атеросклеротическое поражение сопровождается воспалительными процессами в стенке сосуда, при этом наблюдается усиленная адгезия нейтрофильных лейкоцитов к мембране эндотелиоцитов и их инфильтрация в интиму [70]. Селектины усугубляют первичную адгезию лейкоцитов, что приводит к активации последних. Результатом становится повышенное образование лейкоцитами активных форм кислорода и азота, вызывающих перекисное окисление белков (ПОБ) и липидов (ПОЛ), и повреждение ДНК. Сами по себе ишемические условия, характерные для атеросклероза, также сопровождаются усилением продукции АФК и АФА. Реактивные молекулы повреждают компоненты внеклеточного матрикса с последующей деградацией тканей стенки сосуда. Нейтрофилы еще в большей степени продуцируют АФК, а их фагоцитарная активность снижается [2, 6]. Повышается концентрация провоспалительных цитокинов. Один из них - ФНО-альфа, усиливает процесс адгезии и миграции. Поэтому можно считать молекулы адгезии косвенными участниками образования атеросклеротических бляшек [5, 72]. Другие провоспалительные цитокины: Ил-6, Ил-1, Ил-8, ФНО, играют решающую роль в увеличении проницаемости капилляров и в формировании

тромбов, и также усугубляют повреждение тканей. АФК и АФА обладают мембранотоксическим действием, что способствует повреждению лизосомальных мембран и высвобождению лизосомальных ферментов, лизирующих биополимеры, и в конечном итоге приводит к некрозу и апоптозу клеток [3,7, 54]. Снижение растворимых форм sP и sE селектинов вписывается в данную концепцию вследствие того, что происходит гибель эндотелиоцитов, способных к синтезу изучаемых адгезивных белков при атеросклерозе периферических артерий [312], а в случае Р-селектина в крови может присутствовать и тромбоцитарная фракция.

Являясь контррецептором селектинов, гликопротеиновый лиганд PSGL-1, видимо, остаётся не востребованным, вследствие чего его концентрация в сыворотке крови увеличивается статистически значимо по сравнению с контролем. Кроме того, как уже было отмечено выше, патогенез атеросклероза включает в себя элемент воспаления, с чем может быть связано повышение количества лейкоцитов в периферической крови и высвобождаемого гликопротеинового лиганда в больших количествах. Также, провоспалительный цитокин ФНО- α , в экспериментах *in vitro* замедлял транскрипцию мРНК Р-селектина.

Еще одной вероятной причиной изменения PSGL-1 может явиться компенсаторное повышение на снижение селектинов. Все перечисленные изменения являются нарушением адгезивной функции эндотелия у пациентов с атеросклерозом периферических артерий нижних конечностей.

3.3.2. Изучение показателей адгезивной функции эндотелия и степени выраженности нитрозативного стресса у пациентов с артериальными тромбоэмболическими осложнениями в зависимости от наличия артериального тромба или артериальной тромбоэмболии

Для дальнейшего более углубленного анализа изучаемых показателей все пациенты, входящие в данную группу, были разделены на две подгруппы в зависимости от наличия тромба (артериальный тромбоз) или тромбоэмболии (артериальная тромбоэмболия).

Оценка уровня селектинов sP, sE, sL

При оценке растворимой формы селектина Р в сыворотке крови пациентов также было отмечено его статистически значимое снижение в обеих подгруппах (Рисунок 38). В подгруппе с артериальным тромбозом показатель был ниже контрольного в 5 раз ($p=0,001$), в подгруппе с артериальной эмболией в 2 раза ($p=0,043$).

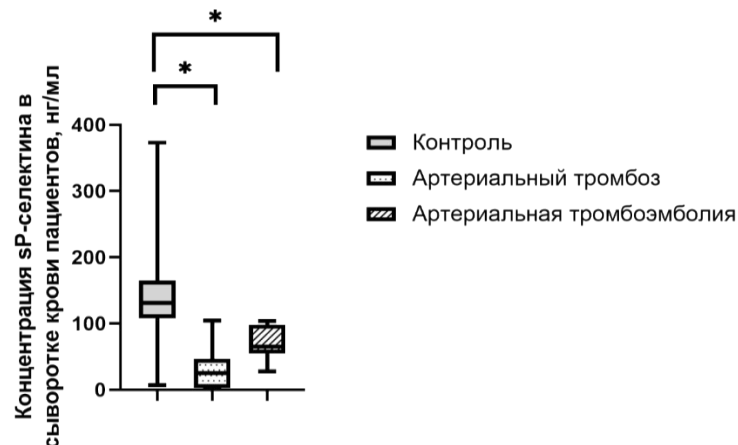


Рисунок 38 – Оценка уровня селектина sP в сыворотке крови пациентов с артериальными тромбоэмболическими осложнениями нижних конечностей, Ме [Q1;Q3], нг/мл

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

Растворимая форма Е-селектина практически не менялась в сыворотке крови пациентов, её изменения не явились статистически значимыми ($p=0,178$) (Рисунок 39).

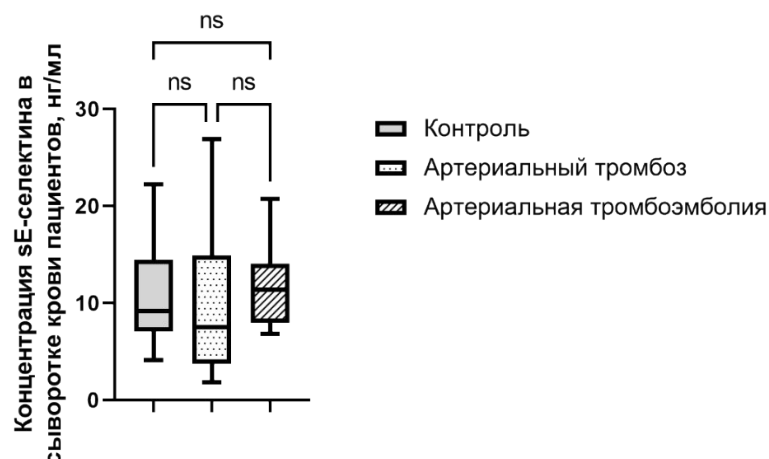


Рисунок 39 – Оценка уровня селектина sE в сыворотке крови пациентов с артериальными тромбоэмболическими осложнениями нижних конечностей, Ме [Q1;Q3], нг/мл

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

Та же тенденция отмечалась и для растворимой формы селектина sL. Её концентрация несколько снижалась в обеих подгруппах по сравнению с группой контроля, но отличия не явились статистически значимыми ($p=0,178$) (Рисунок 40).

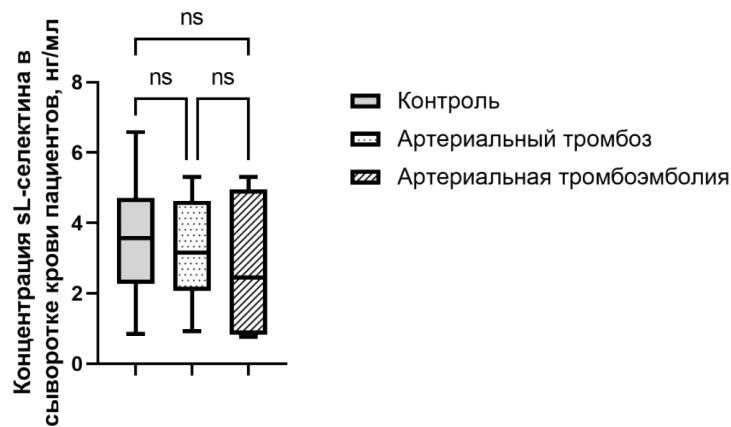


Рисунок 40 – Оценка уровня селектина sL в сыворотке крови пациентов с артериальными тромбоземболическими осложнениями нижних конечностей, Ме [Q1;Q3], нг/мл

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

Оценка уровня PSGL-1

Оценка уровня лиганда селектинов показала его повышение у пациентов в группе с артериальными тромбоземболическими осложнениями, причем у пациентов с артериальной тромбоземболией статистически значимо ($p=0,006$) (Рисунок 41).

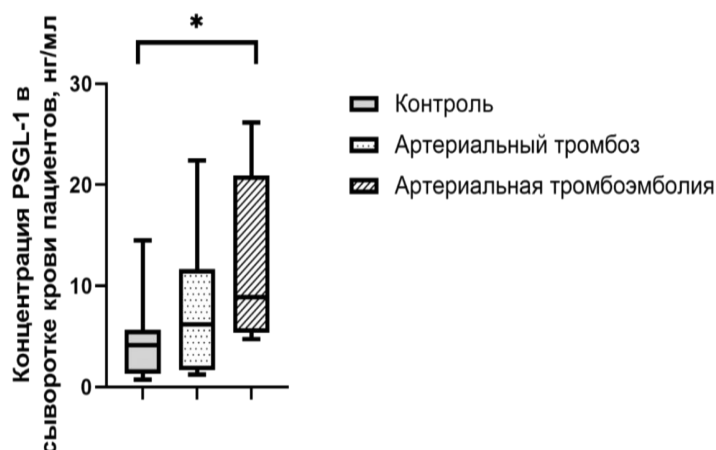


Рисунок 41 – Оценка уровня PSGL-1 в сыворотке крови пациентов с артериальными тромбоземболическими осложнениями нижних конечностей, Ме [Q1;Q3], нг/мл

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

Оценка уровня индуцибельной и эндотелиальной синтазы оксида азота

Уровни индуцибельной и эндотелиальной синтаз оксида азота в сыворотке крови пациентов с артериальными тромбоэмболическими осложнениями увеличивались по сравнению со здоровыми людьми (Рисунок 42), но в случае iNOS они не явились статистически значимыми ($p=0,564$), когда для eNOS повышение в группе с артериальной тромбоэмболией явилось статистически значимым ($p=0,007$).

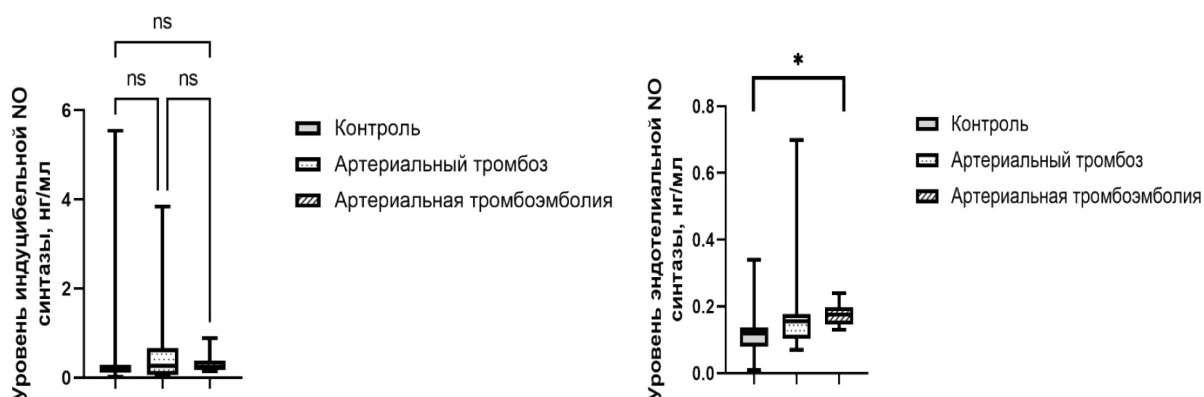


Рисунок 42 – Оценка уровня NO-синтаз в сыворотке крови пациентов с артериальными тромбоэмболическими осложнениями нижних конечностей, Me [Q1;Q3], нг/мл

Примечание –*– статистически значимое отличие по сравнению с группой контроля, $p<0,05$;
 ns – статистически не значимые отличия, $p>0,05$

Анализ степени выраженности нитрозативного/оксидативного стресса

Анализ показателей НС при данной патологии обнаружил следующие тенденции, данные представлены в Таблице 18.

Метаболиты оксида азота повышались в обеих подгруппах статистически значимо ($p=0,001$).

Пероксинитрит также демонстрировал повышение в обеих подгруппах статистически значимо (0,001).

Нитротирозин был выше в обеих подгруппах, битирозин снижался в подгруппе с артериальным тромбозом, но повышался в подгруппе с артериальной тромбоэмболией, но в обоих случаях, так же, как и при атеросклерозе, данные

изменения не имели статистической значимости. Битирозин имел тенденцию к снижению в первой подгруппе и тенденцию к повышению – во второй.

Из данных научной литературы известно, что развивающаяся на фоне атеросклероза артерий нижних конечностей эндотелиальная дисфункция приводит к нарушению микроциркуляторного гомеостаза и возникновению сужения просвета сосуда, отёку тканей, развитию воспаления и прокоагулянтного состояния [167]. Активируются клетки крови, такие, как лейкоциты и тромбоциты, и эндотелиоциты.

Таблица 18 – Анализ степени выраженности нитрозативного/оксидативного стресса у пациентов с артериальными тромбоэмболическими осложнениями, Ме [Q1; Q3]

Показатель	Группа	Медиана	Мин	Макс	Q1	Q3	Межквартильный размах
Метаболиты оксида азота, мкмоль/л	Группа 1	43,15	9,97	45,09	33,5	51,12	17,62
	Группа 2	128,21* (p=0,001)	56,19	395,49	93,35	166,70	73,35
	Группа 3	169,80* (p=0,001)	58,50	311,50	113,21	221,86	108,65
Нитротирозин, нг/мл	Группа 1	350,9	259,50	420,37	320,00	560,80	240,80
	Группа 2	590,35 (p=0,11)	211,30	604,30	317,60	595,70	278,10
	Группа 3	576,4 (p=0,11)	296,70	611,11	353,55	598,50	244,95
Битирозин, ед. флуоресценции	Группа 1	19,46	0,69	20,07	14,10	26,00	11,90
	Группа 2	15,80 (p=0,6)	4,58	178,70	8,15	25,40	17,25
	Группа 3	27,00 (p=0,6)	2,5	88,70	8,30	31,42	23,12
Пероксинитрит, ммоль/л	Группа 1	5,86	0,80	32,23	1,91	17,44	19,35
	Группа 2	33,92* (p=0,016)	7,09	32,07	18,05	42,41	24,36
	Группа 3	20,2* (p=0,014)	8,33	32,07	8,33	20,20	11,87
Примечание – Группа 1 – контрольная группа Группа 2 – пациенты с артериальным тромбозом Группа 3 – пациенты с артериальной тромбоэмболией * – статистически значимые отличия от контрольной группы (p≤0,05); ** – статистически значимые отличия Группы 2 от Группы 3 (p≤0,05)							

В настоящее время пересмотрены и дополнены некоторые механизмы

образования артериальных тромбов. Классическая триада Вирхова одним из составляющих описывает замедление скорости тока крови, что не совсем подходит под патогенез артериального тромбоза. Вследствие чего все чаще употребляется термин «нарушения кровотока» [12].

При артериальном тромбозе эндотелий повреждается в результате образования капсулы атеросклеротической бляшки, при этом активируются тромбоциты, обнажается тканевой фактор, запуская коагуляционный гемостаз [98].

Тем не менее, гиперкоагуляция не настолько важна в патогенезе артериального тромбоза, как венозного.

Так, имеются в научной литературе работы, описывающие незначительное влияние Лейденской мутации на развитие инфаркта миокарда и инсульта, а мутация в гене протромбина не ассоциирована с риском возникновения артериального тромбоза [212, 278]. Большую роль играет сужение просвета артерии, в связи тем, что в этом случае значительно увеличиваются как скорость тока крови, так и напряжение сдвига [90].

Еще одним важным моментом в развитии артериального тромбоза является уникальная способность фактора фон Виллебранда vWF под влиянием ускоренных гидродинамических сил менять свою конфигурацию. При этом глобулярный мультимер разворачивается в нити до 15 мкм в длину, открывая контактные участки для ряда связываний: A-1 для связывания с тромбоцитами через GPIIb-рецептор, A2 – с ферментом ADAMTS-13 (*A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin type 1 motif, member 13*), A3 с фактором II, C4 – с GPIIb/IIIa-рецепторами тромбоцитов, последствием чего является активация и агрегация тромбоцитов [317, 341].

Известно, что в дальнейшем, в участках, расположенных ниже места сужения, скорость тока крови замедляется, изменяется напряжение сдвига, нарушается функция эндотелия. Доказано, что это происходит через активацию провоспалительных клеточных сигнальных систем: митоген-активируемых протеинкиназ (*mitogen-activated protein kinase, MAPK*) и ядерного фактора транскрипции (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB*) [239].

Таким образом, снижение растворимых форм селектинов sP и sE может быть связано с повреждением эндотелиоцитов вследствие активации процессов окислительного стресса, повреждением мембран самих эндотелиоцитов и их лизосом, как это было описано выше; также к этому можно добавить активацию и агрегацию тромбоцитов, формирование тромбов, вследствие чего синтез sP селектина также может снижаться.

В отличие от P- и E-селектинов, экспрессия PSGL-1, как и L-селектина является конститутивной. Он экспрессируется нейтрофилами и моноцитами, описана экспрессия PSGL-1 тромбоцитами и некоторыми эндотелиоцитами и его участие в тромбозе [106]. PSGL-1 локализуется с другими молекулами адгезии-интегринами в липидных рафтах, находящихся на поверхности циркулирующих лейкоцитов, на вершинах их микроворсинок [259].

R. Tinoco et al. показали участие PSGL-1 в развитии тромбозов, поскольку тромбоцитарный P-селектин связывается с PSGL-1 на лейкоцитах и образует тромбоцитарно-лейкоцитарные комплексы, которые стимулируют выработку хемокинов (включая CCL2 и CCL5) и цитокинов, таких как, например, интерлейкин-1 β (IL-1 β), в конечном итоге еще больше активируя лейкоциты и способствуя развитию тромбоза и атеросклероза [287].

Полученные в нашем исследовании данные согласуются с данными литературы и вполне могут объяснить повышение гликопротеинового лиганда селектинов в сыворотке крови пациентов с артериальными тромбоэмболическими осложнениями.

3.3.3. Изучение показателей адгезивной функции эндотелия и степени выраженности нитрозативного стресса у пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей в зависимости от клинического класса ХЗВ по классификации CEAP

Все пациенты данной группы были разбиты на две подгруппы в соответствии с клиническим классом ХЗВ по классификации CEAP: в первую вошли пациенты

с клиническим классом ХЗВ С1 - С2, во вторую – с клиническим классом ХЗВ С3 – С6 по классификации СЕАР.

Оценка уровня селектинов sP, sE, sL

При оценке растворимой формы sP селектина были получены сведения о его снижении в сыворотке крови пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей в обеих группах по сравнению с контролем, в подгруппе С3 – С6 статистически значимо ($p=0,002$) (Рисунок 43).

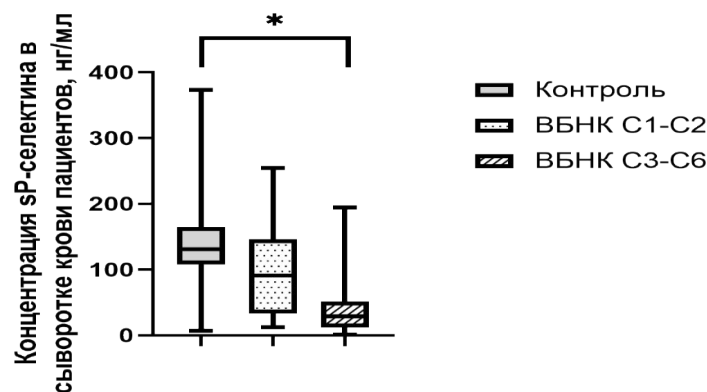


Рисунок 43 – Оценка уровня селектина sP в сыворотке крови пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей, Me [Q1;Q3], нг/мл
Примечание –*– статистически значимое отличие по сравнению с группой контроля, $p<0,05$

Растворимая форма E селектина демонстрировала тенденцию к снижению, которое оказалось статистически не значимым в обеих подгруппах пациентов ($p=0,127$) (Рисунок 44).

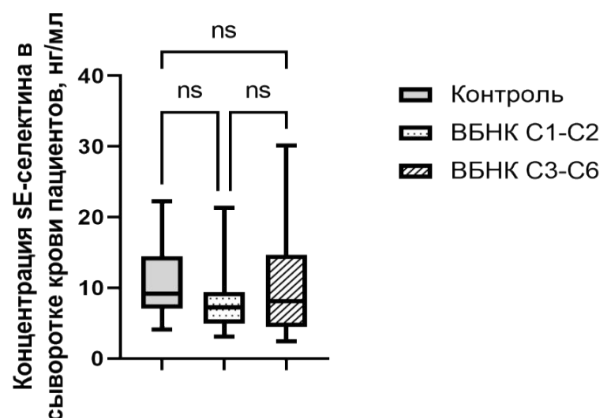


Рисунок 44 – Оценка уровня селектина sE в сыворотке крови пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей, Me [Q1;Q3], нг/мл
Примечание – ns – статистически не значимое отличие, $p>0,05$

При оценке уровня растворимой формы L-селектина мы получили снижение его уровня по сравнению со здоровыми добровольцами, при этом в подгруппе с клиническим классом ХЗВ С1-С2 оно оказалось статистически значимым ($p=0,001$) (Рисунок 45).

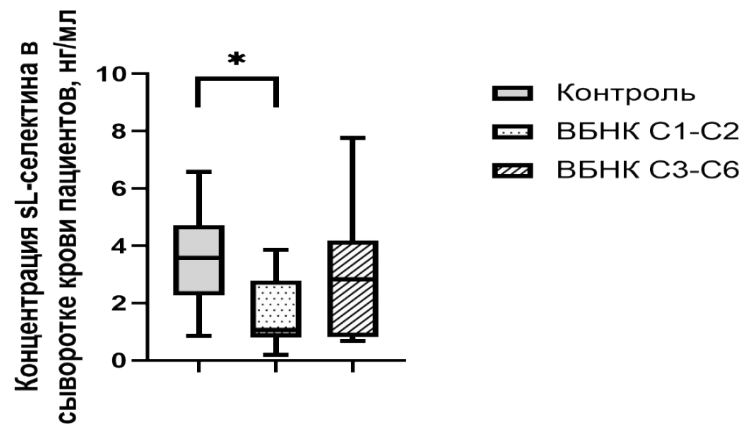


Рисунок 45 – Оценка уровня селектина sL в сыворотке крови пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей, Ме [Q1;Q3], нг/мл
Примечание – * – статистически значимое отличие от группы контроля, $p<0,05$

Оценка уровня PSGL-1

Оценка уровня универсального лиганда селектинов не показала статистически значимых изменений у пациентов с варикозной болезнью нижних конечностей обеих подгрупп как по сравнению с контролем, так и при межгрупповых сравнениях (Рисунок 46).

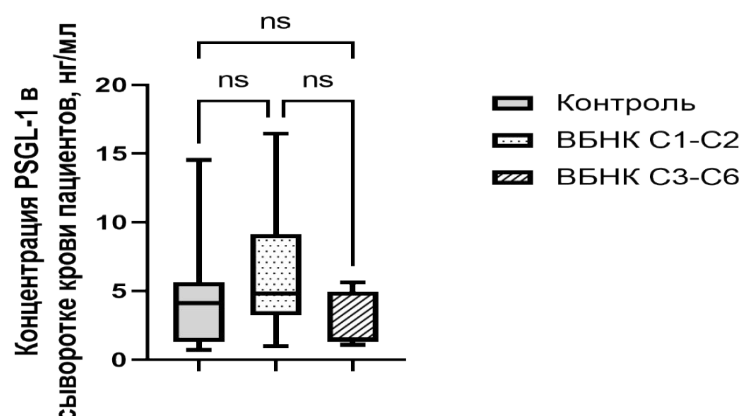


Рисунок 46 – Оценка уровня PSGL-1 в сыворотке крови пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей, Ме [Q1;Q3], нг/мл
Примечание – ns – статистически не значимое отличие, $p>0,05$

Оценка уровня индуцибельной и эндотелиальной синтазы оксида азота

При анализе уровня ферментов синтеза оксида азота было получено статистически значимое повышение уровня индуцибельной NO синтазы у пациентов с клиническим классом ХЗВ С1 – С2 ($p=0,02$) (Рисунок 47). Уровень эндотелиальной синтазы оксида азота не отличался от контрольных значений ни в одной подгруппе пациентов ($p=0,88$).

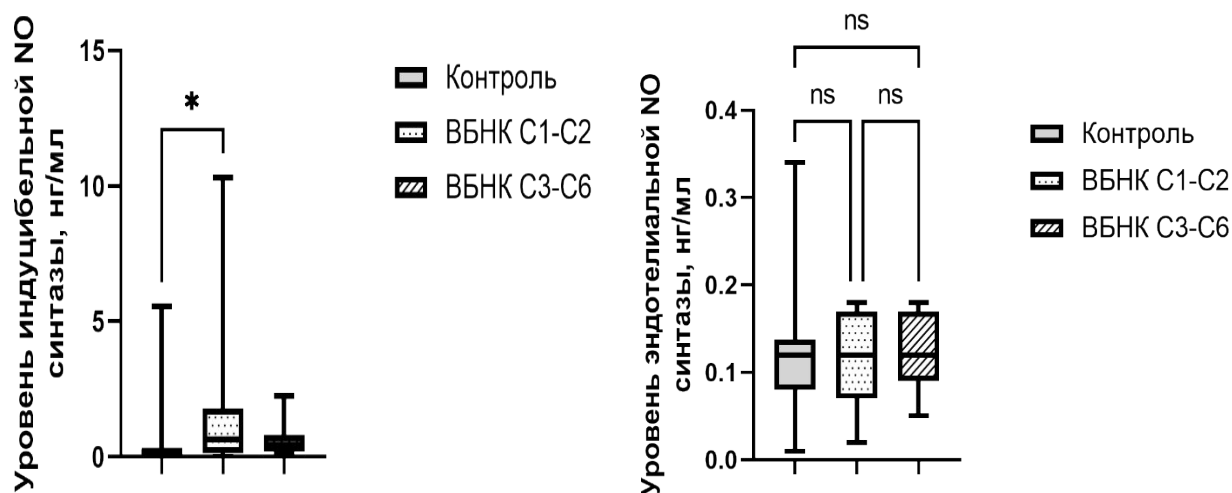


Рисунок 47 – Оценка уровня NO-синтаз в сыворотке крови пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей, Ме [Q1;Q3], нг/мл
Примечание –*– статистически значимое отличие по сравнению с группой контроля, $p<0,05$;
ns – статистически не значимое отличие, $p>0,05$

Анализ степени выраженности нитрозативного/оксидативного стресса

При анализе показателей нитрозилирующего/оксидативного стресса были выявлены следующие тенденции (Таблица 19). Статистически значимо были повышены стойкие метаболиты оксида азота в обеих подгруппах ($p=0,001$); пероксинитрит ($p=0,0001$) и (0,003) соответственно. Нитротирозин повышался в первой подгруппе в 1,6 раза ($p=0,68$), битирозин имел тенденцию к повышению в первой подгруппе в 1,3 раза ($p=0,55$), во второй снижался ($p=0,54$), но данные отличия не явились статистически значимыми.

Таблица 19 – Анализ степени выраженности нитрозативного/оксидативного стресса у пациентов с варикозным расширением вен, Ме [Q1; Q3]

Показатель	Группа	Медиана	Мин	Макс	Q1	Q3	Межквартильный размах
Метаболиты оксида азота, мкмоль/л	Группа 1	43,15	9,97	45,09	33,5	51,12	17,62
	Группа 2	89,14* (p=0,001)	19,20	144,76	76,98	99,13	22,15
	Группа 3	100,09* (p=0,001)	26,14	157,09	63,70	129,38	65,68
Нитротирозин, нг/мл	Группа 1	350,9	259,50	420,37	320,00	560,80	240,80
	Группа 2	565,00 (p=0,68)	220,90	594,10	316,30	581,50	265,2
	Группа 3	361,30 (p=0,68)	236,50	592,10	311,15	582,75	271,6
Битирозин, ед. флюоресценции/мл сыворотки	Группа 1	19,46	0,69	20,07	14,10	26,00	11,90
	Группа 2	24,10 (p=0,54)	0,50	164,20	4,60	41,80	37,2
	Группа 3	7,10 (p=0,54)	0,70	116,90	2,35	35,75	33,4
Пероксинитрит, ммоль/л	Группа 1	5,86	0,80	32,23	1,91	17,44	19,35
	Группа 2	33,61* (p<0,001)	7,09	32,07	32,18	37,73	5,55
	Группа 3	29,08* (p=0,003)	2,78	33,31	18,97	31,46	12,49
Примечание – Группа 1 – контрольная группа; Группа 2 – пациенты с клиническим классом ХЗВ С1-С2; Группа 3 – пациенты с клиническим классом ХЗВ С3-С6; *– статистически значимые отличия от контрольной группы (p≤0,05); **– статистически значимые отличия Группы 2 от Группы 3 (p≤0,05)							

Этиология и патогенез варикозного расширения вен дискуссионны на протяжении долгого времени и сегодня рассматривается далеко не единственная теория его возникновения. Среди прочих факторов ученые называют взаимосвязь варикозной болезни с генетикой, например, с полиморфизмом гена *FOXC2* (*fork head box C2*), мутации в котором связаны с нарушением развития клапанов поверхностных и глубоких вен [175]. Также варикозная болезнь связана с гиперэкспрессией гена *BCL2*, кодирующего одноимённый антиапоптотический белок, что приводит к диспропорции между индукторами и ингибиторами апоптоза. Еще одной из генетических причин может явиться подавление экспрессии генов *NELIN* и *SM22α* (*TAGLIN*), кодирующих соответствующие белки

– маркеры ранней дифференцировки гладкомышечных клеток, итогом чего является фенотипическая трансформация гладкомышечных клеток [170].

Активно изучаются молекулярные механизмы трансформации венозной стенки при данной патологии. Это и секреция фактора HIF-1 α , контролирующего процессы ремоделирования через TGF- β и VEGF, провоцируемая гипоксией; это и деградация внеклеточного матрикса, обусловленная изменением активности ферментов триптазы II (TPSB2), лизил-оксидазы (LOXL1), дисбалансом металлопротеиназ (MMP) и их ингибиторов (TIMP1 и TIMP2). Это и индукция MCP-1 (белок хемоаттрактант моноцитов 1), стимулирующего пролиферацию гладкомышечных клеток. Повреждение эндотелия венозной стенки также приводит к секреции им факторов роста (тромбоцитарного фактора роста PDGF и фактора роста фибробластов aFGF) [9].

Одним из значимых механизмов трансформации венозной стенки является снижение активности eNOS в условиях так называемого сдвигового напряжения, формирующегося в результате недостаточности клапанов. Оксид азота, образующийся при ее функционировании, является естественным ингибитором пролиферации гладкомышечных клеток, а его недостаток ведет к структурной перестройке венозной стенки, и к переключению фенотипа клеток с сократительного на секреторный [74].

Интересным представляется вопрос об индуцибельной синтазе оксида азота (II), которая при варикозной болезни, так же, как и при описанном ранее атеросклерозе, повышается по сравнению с контролем. На сегодняшний день в целом отсутствуют единые представления о её роли в развитии патологии. Ряд ученых придерживаются мнения, что повышенная экспрессия iNOS является патогенным фактором именно вследствие образования в качестве побочного продукта токсичного для клеток пероксинитрита. Так, A.M. Shah и соавторы указали, что ее повышенная активация способствуют выработке ONOO– и способствует развитию эндотелиальной дисфункции [302]. Также, I.N. Mungrue и соавторы в исследовании, выполненном на экспериментальной модели кардиомиоцитов, полученных от трансгенных мышей, получили сведения, что

сверхэкспрессия iNOS приводит к кардиомиопатии, брадиаритмии и внезапной смерти от сердечной недостаточности [128]. В противовес этому утверждению их оппоненты убеждены, что повышение активности iNOS при патологии носит защитный характер. Например, Р. Zhang с соавторами в своём исследовании получили результаты, подтверждающие, что селективное ингибирование iNOS может быть эффективным для лечения сердечной дисфункции, связанной с систолической перегрузкой [201]. Также ряд учёных придерживается мнения, что iNOS способствует регуляции артериального давления, противодействуя эффектам, вызванным сверхэкспрессией мощных вазоконстрикторов, к примеру, эндотелина-1.

Таким образом, можно предположить, что iNOS ассоциирована с повреждающими механизмами при воспалительном процессе, а ингибирование её активности можно использовать в качестве терапевтического потенциала в лечении сердечно-сосудистых заболеваний. К тому же, в отсутствие активности eNOS, iNOS может играть компенсаторную роль, выполняя роль поддержания выработки NO и обеспечивая защиту, например, миокарда от гиперсократительных реакций.

В дополнение к вышесказанному, в научной литературе имеются сведения о влиянии iNOS на развитие атеросклероза. Так, M. Lind et al. в эксперименте на морских свинках, с целью оценки эффектов ингибирования iNOS при гипергомоцистеин-индуцированной эндотелиальной дисфункции, не отмечали признаков атеросклероза в грудном отделе аорты, и сделали вывод, что повышение iNOS оказывает протективное действие, по крайней мере, на ранних стадиях данного заболевания [198].

Полученное в нашем исследовании повышение уровня iNO синтазы также может служить приспособительным механизмом к снижению выработки NO именно у пациентов с клиническим классом ХЗБ С1- С2.

3.3.4. Изучение показателей адгезивной функции эндотелия и степени выраженности нитрозативного стресса у пациентов с острым венозным тромбозом нижних конечностей в зависимости от локализации тромба

Все пациенты данной подгруппы были разделены на две группы исходя из

локализации места тромбообразования: с проксимальной локализацией тромба и дистальной локализацией тромба.

Оценка уровня селектинов sP, sE, sL

При оценке растворимых форм селектинов в сыворотке крови пациентов было отмечено, что уровень sPселектина снижался по сравнению с группой контроля статистически значимо в обеих подгруппах, в первой подгруппе в 2,6 раза ($p=0,008$), во второй практически в 3 раза ($p=0,001$) (Рисунок 48).

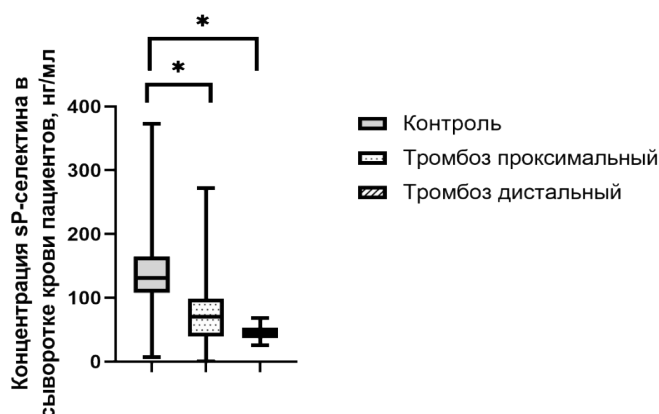


Рисунок 48 – Оценка уровня селектина sP в сыворотке крови пациентов с острым венозным тромбозом, Me [Q1;Q3], нг/мл

Примечание –*– статистически значимые отличия по сравнению с группой контроля, $p \leq 0,05$

Растворимая форма E-селектина несколько повышалась в подгруппе с дистальной локализацией тромба, но данное изменение не явилось статистически значимым ($p=0,77$) (Рисунок 49).

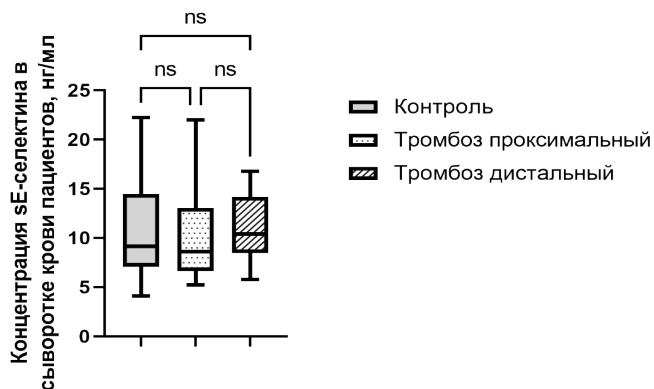


Рисунок 49 – Оценка уровня селектина sE в сыворотке крови пациентов с острым венозным тромбозом, Me [Q1;Q3], нг/мл

Примечание – ns – статистически не значимое отличие, $p > 0,05$

Уровень sL селектина в сыворотке крови пациентов с острым венозным тромбозом проксимальной локализации имел тенденцию к снижению, нежели в группе здоровых доноров ($p=1,0$), а для подгруппы с дистальной локализацией тромба это снижение оказалось статистически значимым ($p=0,029$) (Рисунок 50).

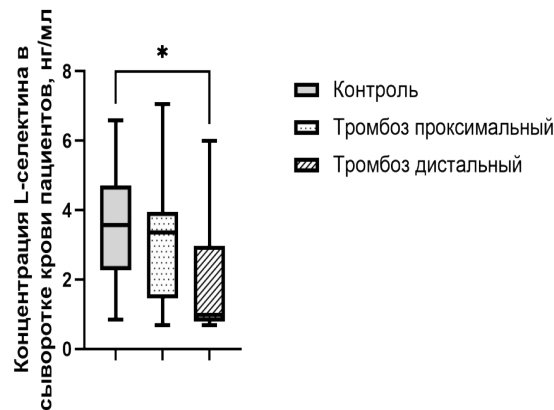


Рисунок 50 – Оценка уровня селектина sL в сыворотке крови пациентов с острым венозным тромбозом, Me [Q1;Q3], нг/мл

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

Оценка уровня PSGL-1

Гликопротеиновый лиганд в представленной группе пациентов не демонстрировал статистически значимых отличий несмотря на то, что несколько повышался по сравнению с контрольной группой ($p=0,39$) (Рисунок 51).

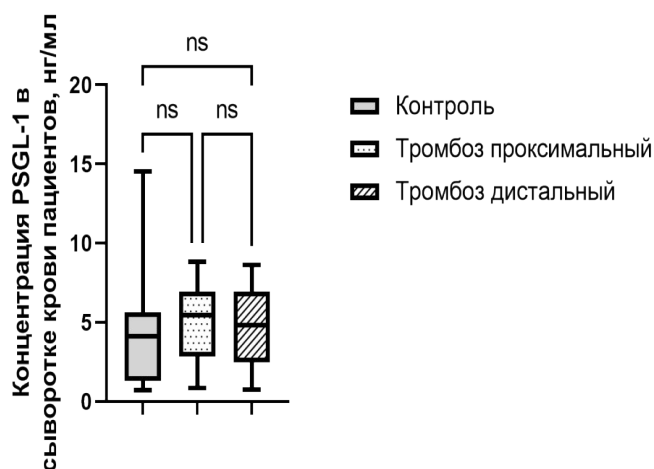


Рисунок 51 – Оценка уровня PSGL-1 в сыворотке крови пациентов с острым венозным тромбозом, Me [Q1;Q3], нг/мл

Примечание – ns – статистически не значимое отличие, $p > 0,05$

Оценка уровня индуцибельной и эндотелиальной синтаз оксида азота

При оценке уровня ферментов синтеза оксида азота было показано, что iNOS имела тенденцию к снижению в обеих подгруппах по сравнению с контролем, в большей степени в подгруппе пациентов с дистальной локализацией тромба ($p=0,121$) (Рисунок 52).

eNOS в подгруппе с проксимальной локализацией тромба демонстрировала статистически незначимую тенденцию к повышению по сравнению с контрольной группой, в подгруппе с дистальной локализацией тромба – статистически незначимую тенденцию снижения уровня ($p=0,585$).

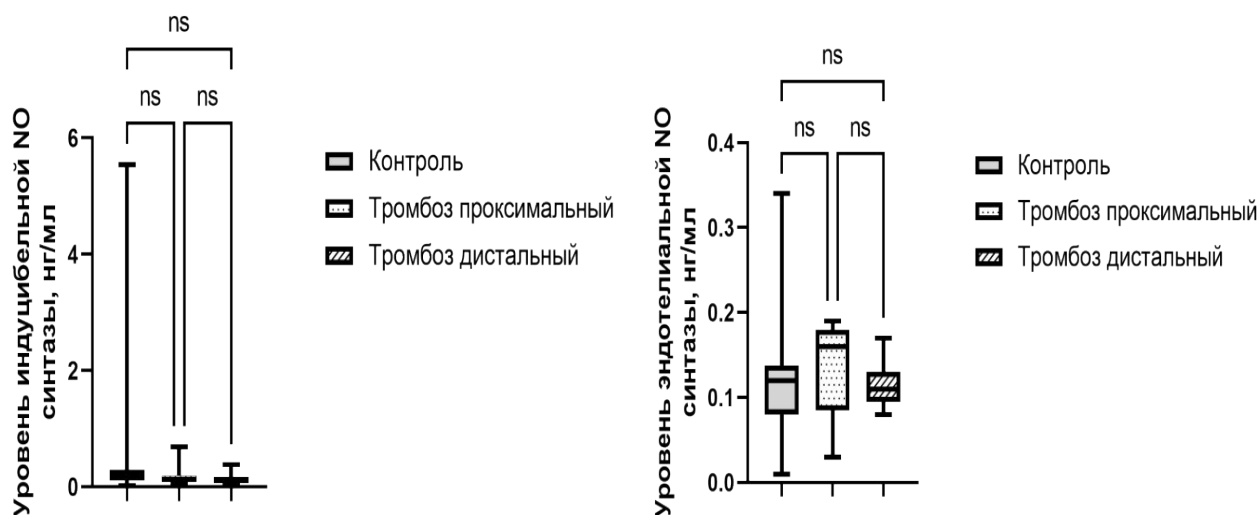


Рисунок 52 – Оценка уровня NO-синтаз в сыворотке крови пациентов с острым венозным тромбозом, Me [Q1;Q3], нг/мл

Примечание – ns – статистически не значимое отличие, $p>0,05$

Анализ степени выраженности нитрозативного/оксидативного стресса

Далее, так же, как и в других группах, был проведен анализ показателей НС (Таблица 20). Анализ выявил статистически значимое повышение стойких метаболитов оксида азота в двух подгруппах ($p=0,001$), нитротирозина в подгруппе с дистальной локализацией тромба ($p=0,015$), пероксинитрита в обеих подгруппах (соответственно 0,016 и 0,0001), битирозин не обнаружил статистически значимых отличий ($p=0,3$).

Для острого венозного тромбоза, согласно теории немецкого врача,

патологоанатома и физиолога Рудольфа Вирхова, изложенной в XIX веке, как раз характерна триада: замедление тока крови (стаз), гиперкоагуляция и повреждение сосудистой стенки (в последующем выявлено, что повреждение касается эндотелия) [338].

В настоящее время теория дополнена, также уточнены механизмы образования тромбов в артериях, описана так называемая «артериальная триада», о которой говорилось выше, характерная для артерий в условиях их стенозирования с ускорением кровотока, активацией тромбоцитов и повреждением сосудистой стенки.

Таблица 20 – Анализ степени выраженности нитрозативного/оксидативного стресса у пациентов с острым венозным тромбозом, Ме [Q1;Q3]

Показатель	Группа	Медиана	Мин	Макс	Q1	Q3	Межквартильный размах
Метаболиты оксида азота, мкмоль/л	Группа 1	43,15	9,97	45,09	33,5	51,12	17,62
	Группа 2	121,30* (p=0,001)	50,79	244,90	65,43	192,13	126,70
	Группа 3	78,91* (p=0,001)	51,56	193,68	71,21	145,50	74,29
Нитротирозин, нг/мл	Группа 1	350,9	259,50	420,37	320,00	560,80	240,80
	Группа 2	372,70 (p=1,0)	232,60	599,60	294,00	398,20	104,20
	Группа 3	292,60* (p=0,015)	183,80	405,60	191,60	373,3	181,70
Битирозин, ед. флюоресценции/мл сыворотки	Группа 1	19,46	0,69	20,07	14,10	26,00	11,90
	Группа 2	17,00 (p=0,3)	2,57	88,30	11,10	24,50	13,4
	Группа 3	8,50 (p=0,3)	2,8	89,40	3,80	19,80	16,00
Пероксинитрит	Группа 1	5,86	0,80	32,23	1,91	17,44	19,35
	Группа 2	32,07* (p=0,016)	7,09	32,07	10,95	41,94	30,99
	Группа 3	35,77* (p=0,0001)	2,78	33,31	25,13	40,55	15,42

Примечание – Группа 1 – контрольная группа;

Группа 2 – пациенты с проксимальной локализацией тромба;

Группа 3 – пациенты с дистальной локализацией тромба;

*– статистически значимые отличия от контрольной группы (p≤0,05);

**– статистически значимые отличия Группы 2 от Группы 3 (p≤0,05)

Кроме того, существует генетическая предрасположенность к данному заболеванию [35].

Эндотелий представляет собой механическую границу между находящимися в крови тромбоцитами, белками плазменной системы коагуляции, и тромбогенными агентами, находящимися под эндотелием, например, коллагеном. В связи с этим, именно эндотелию в настоящее время отводится ведущая роль среди трех компонентов классической триады при венозном тромбозе.

Он экспрессирует три группы биологически активных молекул и цитокинов, связанных с противоположными процессами: тромбообразованием и тромболизисом:

- 1) антиагрегационные: оксид азота (II)(NO), простациклин I_2 ;
- 2) антикоагуляционные: тромбомодулин, протеин S, ингибитор тканевого фактора;
- 3) фибринолитические: тканевой активатор плазминогена [129].

Венозный тромбогенез связан с повышением системной гиперкоагуляции и замедлением кровотока. Снижение скорости тока крови в венозном русле параллельно с изменённым сдвиговым напряжением приводит к биохимической активации эндотелиоцитов; кроме того, в условиях патологии эндотелий травмируется механически, вследствие чего повышается экспрессия тканевого фактора.

Тем не менее, однозначного мнения об экспрессии тканевого фактора в описанных выше условиях в настоящее время не получено, в связи с чем большинство исследователей акцентирует внимание, в первую очередь, на активации эндотелия [273]. Развивающаяся гипоксия вызывает трансформацию биохимического фенотипа эндотелиоцитов, приводя к снижению биосинтеза NO, повышенному образованию АФК и АФА, развитию нитрозилирующего стресса, в связи с этим меняется экспрессия и функционирование белковых молекул [156].

Как отмечалось выше, поражение венозной стенки – это способствующий формированию тромба фактор, при этом адгезивные белки осуществляют рекрутирующую для тромбоцитов и лейкоцитов функцию, вовлекая их в процесс

образования тромба.

В экспериментальных условиях было показано, что селектины Р и Е играют, по-видимому, решающую роль для рекрутирования указанных клеток в венозные тромбы [143]. Селектин Р проявляет прокоагулянтное действие, а также он повышает экспонирование фосфатидилсерина на поверхности моноцитов, тем самым увеличивая синтез тромбина, что усугубляет тромбогенез [27].

Таким образом, в проведенном нами клиническом исследовании были получены результаты о снижении молекул клеточной адгезии sP-, sE-, sL-селектинов, повышении и тенденции к повышению универсального лиганда PSGL-1 в сыворотке крови пациентов всех изучаемых групп пациентов с патологией сосудов нижних конечностей. По нашему мнению, уровень селектинов в сыворотке крови пациентов по сравнению со здоровыми лицами, может снижаться в связи с повреждением белков по различным механизмам. Во-первых, ранее упоминалось, что селектины в своей структуре имеют до 65 аминокислотных остатков цистеина, которые могут быть чувствительны к окислительному повреждению. Это может быть карбонилирование, в работе показано повышение альдегидных и кетонных производных белков в результате окислительного повреждения. Как правило, такое повреждение может развиваться в результате воздействия АФК при ОС. Вследствие того, что у пациентов испытываемых групп повышены и маркеры НС, причиной снижения селектинов может быть и нитрозилирование белков.

Причиной повышения уровня PSGL-1 может явиться воспаление, которое выступает в роли триггера для усиления экспрессии лиганда селектинов с целью ускорения миграции лейкоцитов в очаг воспаления, и с целью формирования внеклеточных нейтрофильных ловушек [224], а также компенсаторное его увеличение вследствие снижения молекул межклеточной адгезии.

Уровень индуцибельной синтазы оксида азота (II) повышался статистически значимо у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей с III-IV стадией хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротической этиологии по классификации А.В. Покровского-Фонтейна, и у пациентов с варикозным расширением вен с клиническим классом ХЗВ С1-С2 по

международной классификации СЕАР. Уровень эндотелиальной синтазы оксида азота (II) повышался статистически значимо у пациентов в подгруппе с артериальной тромбоэмболией.

Повышение индуцибельной NOS при артериальной патологии мы связываем с патогенезом: снижение просвета сосуда приводит к ускорению кровотока и изменению сдвигового напряжения, а изменение механической трансдукции ведет к усилению экспрессии индуцибельной NO синтазы. Для венозного тромбоза характерны гиперкоагуляция и повреждение сосудистой стенки, замедление тока крови и стаз. Это ассоциируется с развитием ОС и появлением АФК, способных повреждать структуру фермента. Кроме того, в условиях стаза отмечается недостаток субстрата для синтеза NO- аргинина, и хроническое снижение кровотока может приводить к снижению активности iNOS.

Также можно сказать, что активность iNOS в условиях так называемого сдвигового напряжения, формирующегося в результате недостаточности клапанов при венозной патологии, снижается. Это приводит к недостатку синтеза NO, в норме сдерживающего пролиферацию гладкомышечных клеток. Недостаток NO вызывает структурную перестройку венозной стенки, и смену фенотипа эндотелиоцитов с сократительного на секреторный [74]. В нашем исследовании мы отметили статистически значимое повышение активности iNOS у пациентов с клиническим классом ХЗВ С1-С2 по классификации СЕАР, что, вероятно, связано с компенсаторным механизмом на снижение выработки NO именно на начальных стадиях заболевания.

ОМБ повышалась статистически значимо в сыворотке крови пациентов всех групп, кроме острого венозного тромбоза. Главным образом при артериальной патологии повышались первичные маркеры ОС, при ВБНК – вторичные, при остром венозном тромбозе эти изменения не явились статистически значимыми.

Из показателей НС статистически значимо повышались стойкие метаболиты оксида азота и пероксинитрит – в сыворотке крови пациентов всех исследуемых групп, таким образом, именно два этих показателя могут служить маркерами НС при изучаемой нами патологии.

НТ снижался статистически значимо у пациентов в подгруппе с острым венозным тромбозом дистальной локализации по сравнению с контролем, имел тенденцию к повышению у пациентов с проксимальным венозным тромбозом.

Из всех показателей НС битирозин не продемонстрировал статистически значимых изменений; отмечалась тенденция к его повышению у пациентов с I-IIб стадией хронической ишемии по классификации А.В. Покровского-Фонтейна, клинического класса ХЗВ С1 – С2, и артериальной тромбоэмболии. В остальных случаях мы отметили тенденцию к снижению данного показателя.

Далее был проведен корреляционный анализ, результаты которого представлены ниже. С целью установления основного и второстепенных факторов НС, влияющих на селектины и их лиганд, был проведён многофакторный линейный регрессионный анализ, и однофакторный регрессионный анализ для тех факторов, которые дали статистически значимые корреляции с зависимыми переменными (у) (Таблицы 21-29).

Таблица 21 – Оценка корреляционных связей зависимости молекул адгезии в сыворотке крови пациентов с атеросклерозом с показателями синтаз NO и НС (R, p)

	Селектин Р	Селектин Е	Селектин L	PSGL-1
индуцибельная синтаза NO	0,026 (S) (p=0,889)	-0,522 (S) (p=0,003)	0,374 (S) (p=0,038)	0,395 (S) (p=0,028)
эндотелиальная синтаза NO	-0,182 (S) (p=0,327)	-0,289 (S) (p=0,115)	0,376 (S) (p=0,037)	0,337 (S) (p=0,064)
метаболиты NO	-0,067 (S) (p=0,722)	-0,290 (S) (p= 0,114)	0,492 (P) (p=0,005)	0,397 (P) (p=0,027)
нитротирозин	-0,170 (S) (p=0,359)	-0,435 (S) (p=0,014)	0,653 (S) (p=0,000)	0,618 (S) (p=0,000)
битирозин	-0,163 (S) (p=0,389)	-0,490 (S) (p=0,006)	0,003 (S) (p=0,986)	0,075 (S) (p=0,694)
пероксинитрит	-0,151(S) (p=0,472)	-0,241(S) (p=0,247)	-0,087 (S) (p=0,678)	-0,136 (S) (p=0,518)
Примечания: S- критерий Спирмена; P- критерий Пирсона				

Таблица 22 – Результаты многофакторного регрессионного анализа для пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей

Селектин Е	R	R ²	Значимость
	0,577	0,333	0,517
	Значимый фактор	Уравнение регрессии	Значимость
	<i>NOS-2</i> HT BT	$x^{-0,153}+6549,656$ $e^{-0,002}+9,692$ $x^{-0,206}+12420,570$	0,017 0,041 0,025
Селектин Р	R	R ²	Значимость
	0,532	0,283	0,648
	Значимый фактор	Уравнение регрессии	Значимость
	-	-	-
Селектин L	R	R ²	Значимость
	0,902	0,813	0,001
	Значимый фактор	Уравнение регрессии	Значимость
	NOS-2 NOS-3 <i>Метаболиты NO</i>	$x^{0,188}+2029,150$ $-45431,427x^2+219723,259x+3786,927$ $x^{0,640}+115,808$	0,003 0,000 0,000
PSGL	R	R ²	Значимость
	0,823	0,677	0,017
	Значимый фактор	Уравнение регрессии	Значимость
	NOS2 NOS3 <i>HT</i> Метаболиты NO	$x^{0,259}+7,231$ $-228,428x^2+1218,314x+16,020$ 0,042x-8,593 $X^{1,040}+0,070$	0,019 0,004 0,000 0,001

Таблица 23 – Оценка корреляционных связей зависимости молекул адгезии в сыворотке крови пациентов с артериальными тромбоэмболическими осложнениями показателями синтаз NO и HC, (r,p)

	Селектин Р	Селектин Е	Селектин L	PSGL-1
индуцибельная синтаза NO	0,332 (S) (p=0,091)	0,090 (S) (p=0,651)	0,203 (S) (p=0,342)	0,306 (S) (p=0,113)
эндотелиальная синтаза NO	0,001 (S) (p=0,995)	0,047 (S) (p=0,812)	-0,041 (S) (p=0,848)	0,192 (S) (p=0,327)
метаболиты NO	0,082 (S) (p=0,683)	-0,065 (S) (p=0,742)	0,261 (P) (p=0,218)	0,241 (P) (p=0,217)
нитротирозин	0,119 (S) (p=0,553)	-0,425 (S) (p=0,024)	0,446 (S) (p=0,029)	0,195 (S) (p=0,320)
битирозин	0,228 (S) (p=0,253)	0,294 (S) (p=0,129)	0,150 (S) (p=0,483)	0,266 (S) (p=0,171)
пероксинитрит	-0,089 (S) (p=0,710)	-0,301 (S) (p=0,184)	0,209 (S) (p=0,376)	-0,257 (S) (p=0,260)
Примечания: S- критерий Спирмена; P- критерий Пирсона				

Таблица 24 – Результаты многофакторного регрессионного анализа для пациентов с артериальными тромбоэмболическими осложнениями, (R, p)

Селектин Е	R	R ²	Значимость
	0,789	0,622	0,146
	Значимый фактор	Уравнение регрессии	Значимость
	NT	-30,753x+24513,288	0,000
Селектин Р	R	R ²	Значимость
	0,704	0,496	0,432
	Значимый фактор	Уравнение регрессии	Значимость
	-	-	-
Селектин L	R	R ²	Значимость
	0,801	0,642	0,168
	Значимый фактор	Уравнение регрессии	Значимость
	HT	$x^{0,787}+22,644$	0,017
PSGL	R	R ²	Значимость
	0,652	0,425	0,516
	Значимый фактор	Уравнение регрессии	Значимость
	-	-	-

Таблица 25 – Оценка корреляционных связей зависимости молекул адгезии в сыворотке крови пациентов с варикозным расширением вен с показателями синтаз NO и HC, (R, p)

	Селектин Р	Селектин Е	Селектин L	PSGL-1
индуцибельная синтаза NO	0,198(S) (p=0,293)	-0,162(S) (p=0,391)	0,145(S) (p=0,461)	0,039(S) (p=0,838)
эндотелиальная синтаза NO	0,234(S) (p=0,213)	-0,405(S) (p=0,026)	0,162(S) (p=0,412)	-0,138(S) (p=0,469)
метаболиты NO	-0,124(S) (p=0,513)	-0,042(S) (p=0,827)	0,099(S) (p=0,616)	-0,153(S) (p=0,418)
нитротирозин	0,611(S) (p=0,000)	-0,402(S) (p=0,028)	0,471(S) (p=0,011)	-0,111 (S) (p=0,560)
битирозин	0,288(S) (p=0,123)	-0,241(S) (p=0,199)	0,178(S) (p=0,365)	0,015(S) (p=0,938)
пероксинитрит	0,477(S) (p=0,016)	-0,120(S) (p=0,566)	0,312(S) (p=0,129)	0,205(S) (p=0,325)

Примечания: S- критерий Спирмена; P- критерий Пирсона

Таблица 26 – Результаты многофакторного регрессионного анализа для пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей

Селектин Е	R	R ²	Значимость
	0,760	0,577	0,038
	Значимый фактор	Уравнение регрессии	Значимость
	<i>NOS3</i> NT	<i>-58393,713x+15987,544</i> -15,871x+16139,254	0,017 0,042
Селектин Р	R	R ²	Значимость
	0,797	0,636	0,015
	Значимый фактор	Уравнение регрессии	Значимость
	NT	339,020x-66693,874	0,000
Селектин L	R	R ²	Значимость
	0,585	0,343	0,402
	Значимый фактор	Уравнение регрессии	Значимость
	NT	$e^{0,003}+6,009$	0,003
PSGL	R	R ²	Значимость
	0,584	0,341	0,407
	Значимый фактор	Уравнение регрессии	Значимость
	-	-	-

Таблица 27 – Оценка корреляционных связей зависимости молекул адгезии в сыворотке крови пациентов с острым венозным тромбозом с возрастом и показателями синтаз NO и HC, (R, p)

	Селектин Р	Селектин Е	Селектин L	PSGL-1
индуцибельная синтаза NO	-0,097(S) (p=0,611)	-0,101(S) (p=0,594)	0,078(S) (p=0,689)	0,170(S) (p=0,369)
эндотелиальная синтаза NO	-0,176(S) (p=0,353)	0,410(P) (p=0,024)	0,135(P) (p=0,486)	0,134(P) (p=0,480)
метаболиты NO	0,115(S) (p=0,545)	0,138(P) (p=0,468)	0,386(P) (p=0,039)	0,122(P) (p=0,521)
нитротирозин	0,030(S) (p=0,873)	-0,315(S) (p=0,090)	0,329(S) (p=0,082)	-0,185(S) (p=0,327)
битирозин	0,052(S) (p=0,784)	0,104(S) (p=0,584)	0,137(S) (p=0,480)	0,020(S) (p=0,915)
пероксинитрит	0,080(S) (p=0,698)	-0,205(P) (p=0,315)	0,086(P) (p=0,675)	0,108(P) (p=0,598)
Примечания: S- критерий Спирмена; P- критерий Пирсона				

Таблица 28 – Результаты многофакторного регрессионного анализа для пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей

Селектин Е	R	R ²	Значимость
	0,621	0,385	0,196
	Значимый фактор	Уравнение регрессии	Значимость
	NOS-3	$37268,689x+5778,511$	0,024
Селектин Р	R	R ²	Значимость
	0,585	0,343	0,288
	Значимый фактор	Уравнение регрессии	Значимость
	-	-	-
Селектин L	R	R ²	Значимость
	0,722	0,	0,196
	Значимый фактор	Уравнение регрессии	Значимость
	Метаболиты NO	$11,635x+1419,784$	0,039
PSGL	R	R ²	Значимость
	0,457	0,209	0,689
	Значимый фактор	Уравнение регрессии	Значимость
	-	-	-

Таблица 29 – Ведущий фактор по данным многофакторного регрессионного анализа

Ведущий фактор	Атеросклероз	Артериальный тромбоз	Варикозное расширение вен	Острый венозный тромбоз
Селектин Р	-	-	HT	-
Селектин Е	NOS-2 HT BT	HT	NOS3 HT	NOS3
Селектин L	NOS2 NOS3 Метаболиты NO	HT	HT	Метаболиты NO
PSGL-1	NO-2 NO-3 HT Метаболиты NO	-	-	-

В процессе проведения 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 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 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 E ведущими явились нитротирозин и синтазы оксида азота, для селектина L нитротирозин и метаболиты оксида азота, для селектина P 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.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Материалы данного раздела опубликованы в статьях:

- 1) Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Захаров А.С., Мжаванадзе Н.Д., Никифоров А.А. Различные концентрации пероксинитрита вызывают уникальный клеточный ответ эндотелиоцитов *in vitro*. Молекулярная медицина. 2024. Т.22, № 4. С. 51-57. DOI:10.29296/24999490-2024-04-08;
- 2) Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Абаленихина Ю.В., Никифорова Л.В. Количественная оценка селектина Е при экспериментальном влиянии нитрозоглутатиона. Бутлеровские сообщения. 2025. Т.82. №4. С.88-95. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/25-82-4-88;
- 3) Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Абаленихина Ю.В., Мжаванадзе Н.Д., Никифоров А.А., Фомина Д.И. Влияние донатора оксида азота S-нитрозоглутатиона на относительное количество Р-селектина *in vitro*. Молекулярная медицина. 2025. №3. С. 101-107. DOI:10.29296/24999490-2025-03-1.

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. Экспериментальные серии описаны в главе Материалы и методы.

4.1. Оценка принадлежности полученных эндотелиальных клеток к линии HUVEC

Принадлежность полученных в лаборатории клеток (Рисунок 53) к эндотелиальным подтверждали методом иммуноцитохимического анализа с применением антител к маркерным белкам эндотелиоцитов: молекуле клеточной адгезии CD31 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)*) (Рисунок 54), и фактору фон Виллебранда (*vWF, von Willebrand factor*) (Рисунок 55). В качестве отрицательного контроля использовали линию человеческих фибробластов, не экспрессирующих указанные белки.

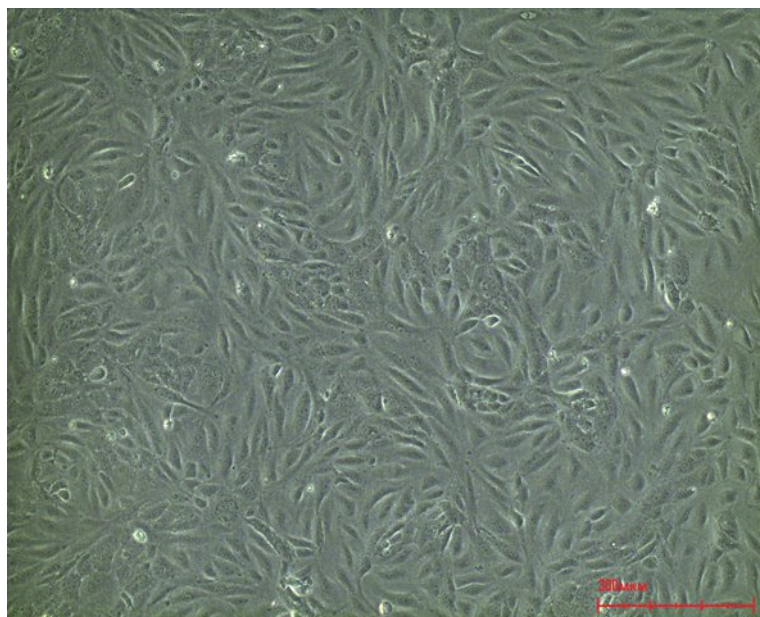


Рисунок 53 – Первичная линия эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) *in vitro*, полученная в лаборатории клеточных технологий ЦНИЛ РязГМУ. Ув.×200

Выделенные клетки имеют полигональную форму с круглым ядром в центре, в культуре выглядят, как «булыжная мостовая». Ядра клеток HUVEC имеют одиночное или двойное ядрышко с мелкими гранулами хроматина.

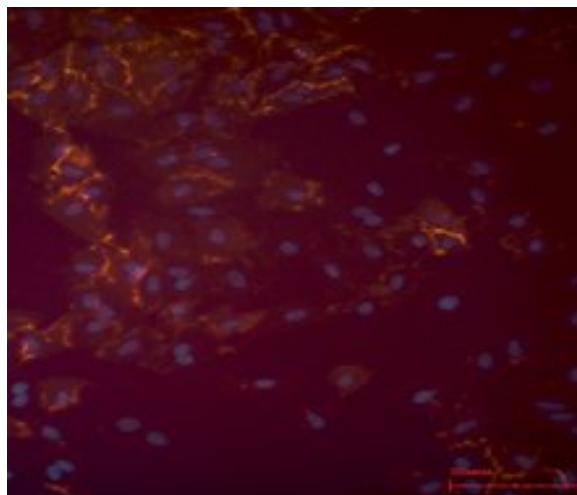


Рисунок 54 – Иммуноцитохимическая визуализация CD31 (*PECAM*) на мембране культуры первичных эндотелиоцитов HUVEC. Ядра окрашены DAPI. Ув.×400

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.

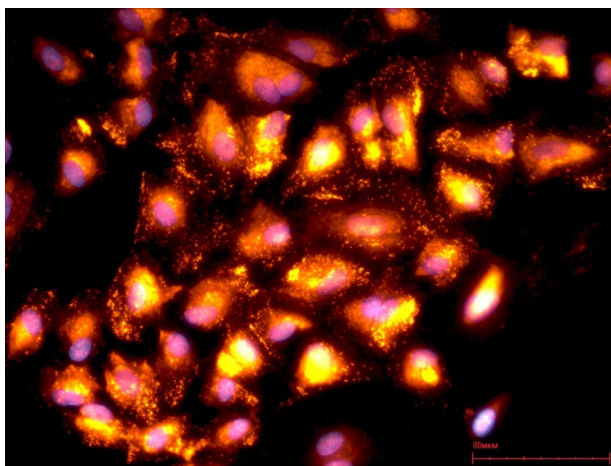


Рисунок 55 – Иммуноцитохимическая визуализация фактора фон Виллебранда (*vWF*) в цитоплазме культуры первичных эндотелиоцитов HUVEC. Ядра окрашены DAPI. Ув.×400

Иммуноцитохимическая реакция на *vWF* проявлялась диффузным окрашиванием цитоплазмы и отложением гранул в виде грубых пятен и «зёрен», что также подтвердило принадлежность клеток к эндотелиальным.

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

Получение исходного раствора пероксинитрита

В эксперименте использовали раствор пероксинитрита, синтезированный в ходе реакции нитрита натрия и пероксида водорода. С этой целью к смеси 1 мл 3% перекиси водорода и 34 мкл концентрированной серной кислоты добавляли 1 мл 1 М нитрита натрия, а затем мгновенно – 1,5 мл 2М раствора гидроксида натрия. Серная кислота создаёт кислую среду, благоприятную для формирования пероксинитрита, а гидроксид натрия – щелочную среду, в которой уже синтезированный пероксинитрит наиболее стабилен [37, 76]. Конечную концентрацию пероксинитрита в растворе определяли спектрофотометрическим методом (спектрофотометр «СФ-26», Россия) при длинах волн 240–320 нм ($E_{302} = 1670 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$) после растворения 20 мл раствора пероксинитрита в смеси 1 мл дистиллированной воды и 10 мкл гидроксида натрия (Рисунок 56).

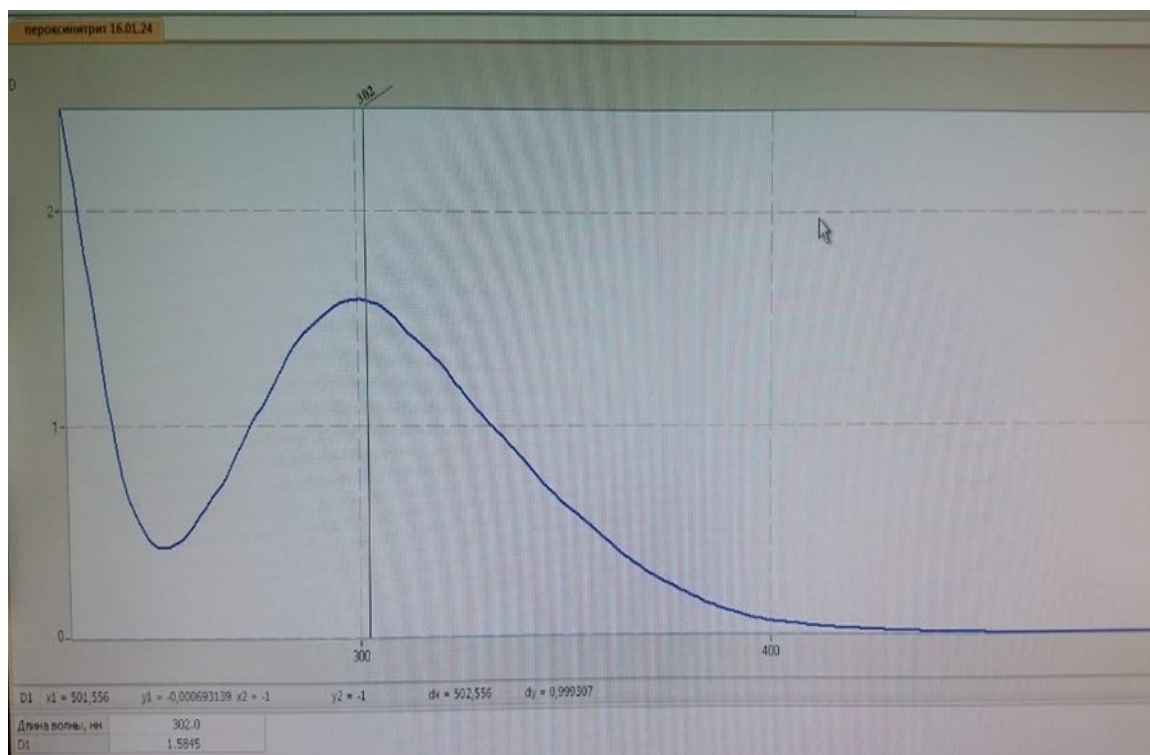


Рисунок 56 – Пик пероксинитрита с концентрацией 48 мМ, полученный на спектрофотометре

С целью количественной оценки непрореагировавших соединений в растворе пероксинитрита определяли примеси пероксида водорода и нитрита натрия [289]. Для этого в образце раствора предварительно разлагали пероксинитрит добавлением разбавленной серной кислоты до создания кислой среды. Далее нитрат восстанавливали в нитрит добавлением хлорида ванадия (III). Содержание нитрита определяли фотоколориметрически при длинах волн 545–630 нм после инкубации с реактивом Грисса. Из полученной концентрации нитрит-ионов вычитали концентрацию пероксинитрита для исключения нитрита, получившегося из нитрата после изомеризации пероксинитрита. Концентрацию непрореагировавшего пероксида водорода определяли йодометрическим титрованием после изомеризации пероксинитрита в нитрат подкислением раствора. 0,5 мл образца раствора пероксинитрита разбавляли в 10 раз и добавляли свежеприготовленный 0,1 М раствор йодида калия. Колбу выдерживали в тёмном месте в течение 10 минут. Далее содержимое колбы оттитровывали 10%-ным раствором тиосульфата натрия до бледно-жёлтой окраски, добавляли раствор крахмала и продолжали титровать до его обесцвечивания. Был синтезирован

пероксинитрит с концентрацией 48 мМ, спектр для которого представлен на рисунке.

В эксперимент был отобран раствор, количество примесей в котором составило 1,05 мМ NaNO_2 и 0,48 мМ H_2O_2 (1,5% и 0,69% от количества пероксинитрита соответственно). С целью наиболее подробного изучения влияния микромолярных концентраций пероксинитрита на эндотелиоциты был приготовлен ряд рабочих растворов с концентрациями пероксинитрита: 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 250 мкМ, 500 мкМ, которые и использовали в эксперименте.

4.2.1. Оценка метаболической активности эндотелиоцитов (HUVEC) при моделировании нитрозативного стресса

На первом этапе исследования мы провели МТТ-тест с целью оценки метаболической активности клеток. В целом МТТ-тест может применяться с разными целями, например: 1) определение цитотоксичности того или иного вещества, 2) с целью оценки метаболической активности клеток; 3) с целью установления безопасности действия потенциального лекарственного препарата; 4) с целью изучения влияния различных факторов среды (рН, температуры, концентрации витаминов) на рост клеток. Под действием различных факторов и веществ может меняться метаболическая активность клеток, а также их жизнеспособность, вследствие чего данный тест входит в число ключевых, часто применяемых в лаборатории. Метаболическая активность оценивается по активности митохондриальных ферментов - митохондриальных оксидоредуктаз, вследствие чего эти понятия являются взаимозаменяемыми.

При оценке метаболической активности эндотелиоцитов при их совместной инкубации с растворами пероксинитрита в концентрациях 10-500 мкМ путем проведения МТТ-теста было отмечено снижение оптической плотности растворов, что свидетельствует о снижении активности митохондриальных оксидоредуктаз. Данное наблюдение показывает, что метаболическая активность HUVEC снижалась статистически значимо при высоких концентрациях пероксинитрита:

100, 250, 500 мкМ при инкубации в течение 30 минут, 100-250 мкМ при инкубации в течение 1 часа; и также снижалась при инкубации в течение 2-х часов при концентрациях пероксинитрита 100 и 500 мкМ, но последние отличия не явились статистически значимыми (Рисунок 57).

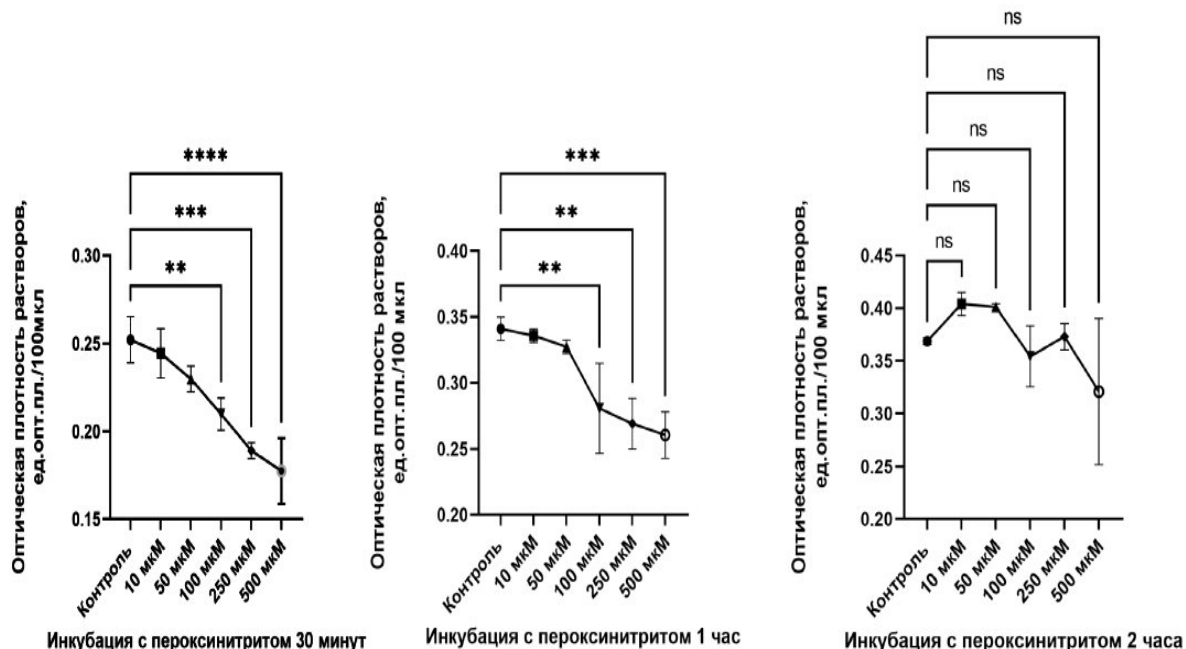


Рисунок 57 – Оптическая плотность растворов при проведении МТТ теста, ед.опт.пл., ($M \pm SD$, $n=3$)

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

4.2.2. Оценка выраженности нитрозативного стресса при его экспериментальном моделировании по маркерам: стабильным метаболитам оксида азота, битиروزину, пероксинитриту

Оценка стабильных метаболитов оксида азота в лизатах HUVEC

Концентрация стабильных метаболитов оксида азота - нитритов и нитратов в лизатах эндотелиоцитов повышалась: при инкубации в течение 30 минут во всех исследуемых концентрациях статистически не значимо, при инкубации в течение 1 и 2-х часов статистически значимо во всех исследуемых концентрациях (Рисунок 58).

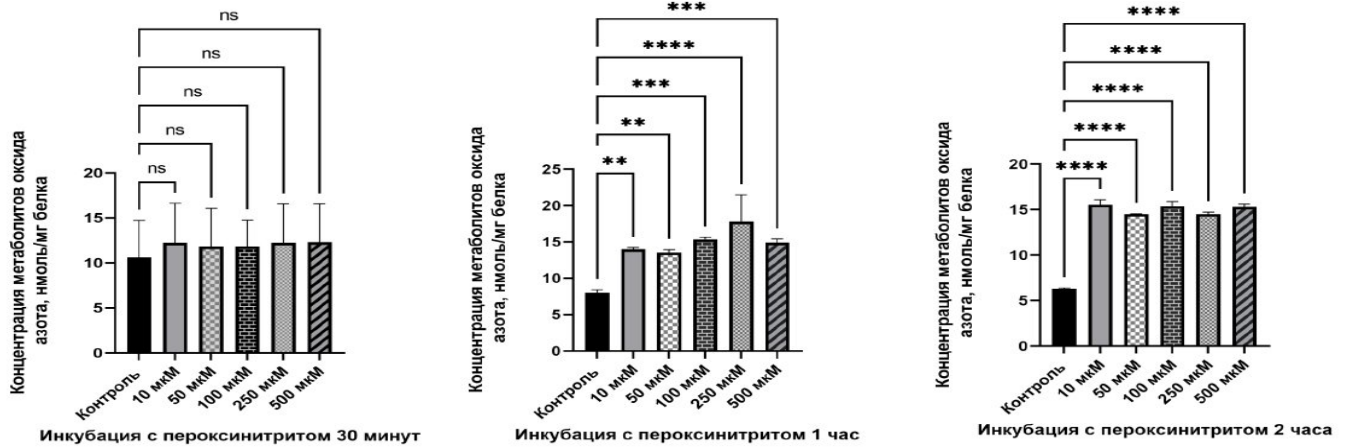


Рисунок 58 – Оценка изменения концентрации стабильных метаболитов NO (II) в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации, ($M \pm SD$, $n=3$), нмоль/мг белка

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

Оценка битирозина в лизатах HUVEC

При оценке битирозина было отмечено, что при инкубации клеток HUVEC с растворами пероксинитрита в течение 30 минут он повышался статистически значимо при всех концентрациях пероксинитрита (Рисунок 59).

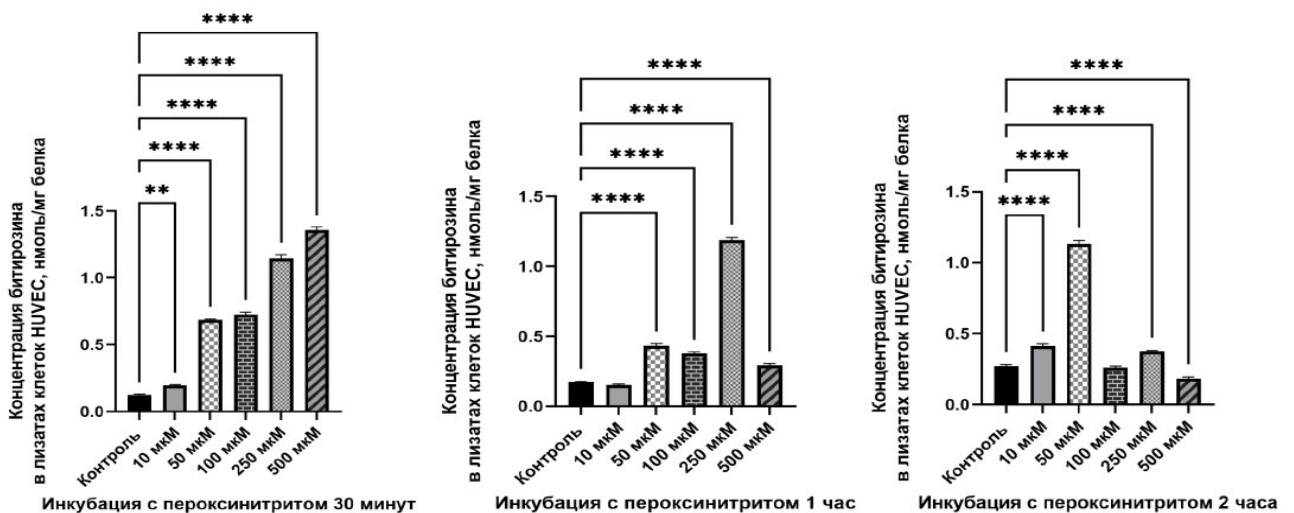


Рисунок 59 – Оценка изменения концентрации битирозиновых сшивок в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации, ($M \pm SD$, $n=3$), нмоль/мг белка

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

Более длительная экспозиция продемонстрировала разнонаправленное изменение концентрации битирозиновых сшивок. При этом высокие концентрации при часовой инкубации повышали битирозин, а при двухчасовой инкубации концентрация 500 мкМ вызвала снижение битирозина.

Таким образом, на данном этапе исследования были получены 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 подтверждается 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-синтаз в лизатах эндотелиоцитов в тех же экспериментальных условиях.

4.2.3. Оценка относительного количества Р- и Е-селектинов в лизатах эндотелиоцитов методом вестерн-блот

Экспозиция HUVEC с пероксинитритом в изучаемых концентрациях продемонстрировала различные результаты в разные временные сроки. 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.

Концентрация 10 мкМ вызвала небольшое повышение относительного количества исследуемого белка, но оно не имело статистической значимости (Рисунок 60).

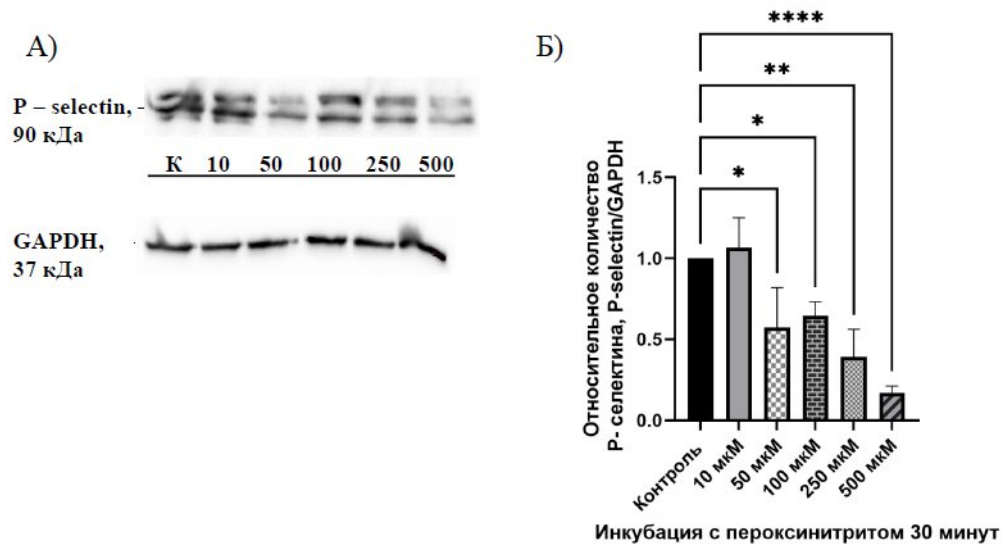


Рисунок 60 – Относительное количество Р-селектина в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации в течение 30 минут, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание – * – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; – ** $\leq 0,01$; **** – $p \leq 0,0001$; А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведённого методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab.

Более длительная экспозиция с пероксинитритом продемонстрировала повышение относительного количества Р-селектина во всех концентрациях, статистически значимо в минимальной концентрации 10 мкМ (Рисунок 61).

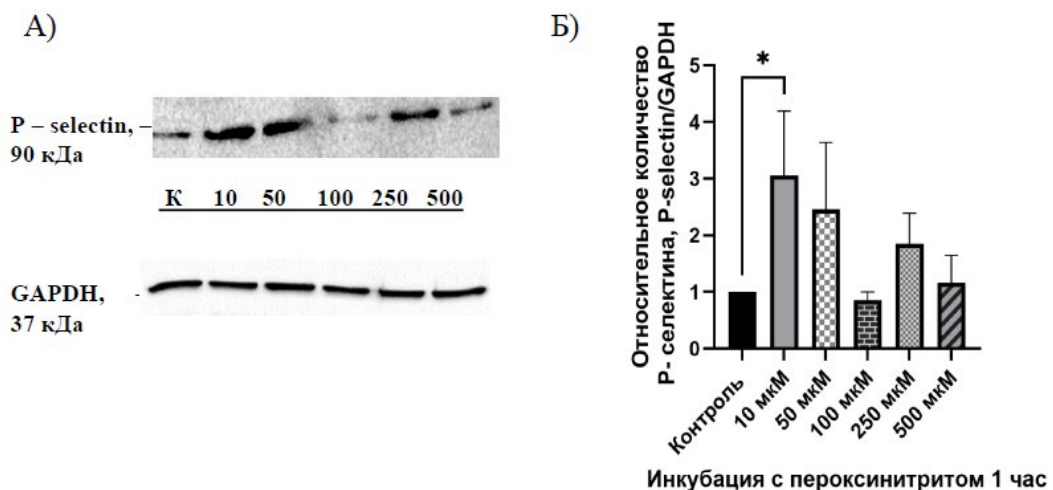


Рисунок 61 – Относительное количество Р-селектина в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации в течение 1 часа, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание – * – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$ А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведённого методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab)

Часовая инкубация с пероксинитритом вызвала повышение относительного количества Р-селектина практически во всех исследуемых концентрациях, за исключением 100 мкМ.

При этом низкая концентрация в 10 мкМ продемонстрировала статистически значимые отличия – повышение на 130 %.

Двухчасовая экспозиция с растворами пероксинитрита также привела к повышению относительного количества Р-селектина, но данные изменения не явились статистически значимыми (Рисунок 62).

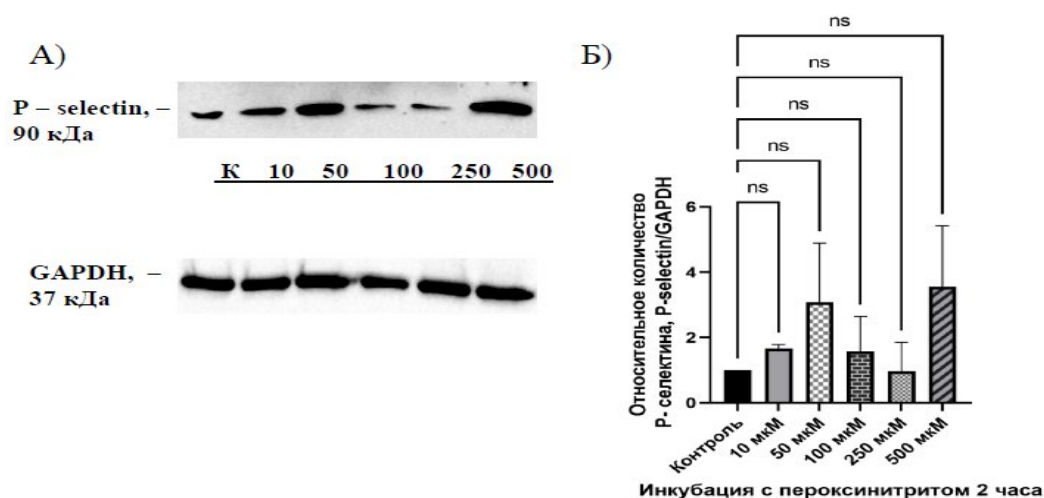


Рисунок 62 – Относительное количество Р-селектина в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации в течение 2-х часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание – * – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ns – $p > 0,05$; А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведённого методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

Необходимо отметить, что в эндотелиоцитах постоянно присутствует некоторое количество растворимой формы селектина Р, не связанного с мембраной. Мы предположили, что кратковременное, 30-минутное воздействие, пероксинитрита могло вызвать окислительное повреждение белка, вследствие чего его относительное количество снижалось. Воздействие в течение 1 часа стимулировало активацию белка, хранящегося в тельцах Вейбеля Палладе, приводя к повышению его относительного количества в результате того, что пероксинитрит может действовать не только как токсический агент, но и как сигнальная молекула [1, 101, 102]. Дальнейшая экспозиция с пероксинитритом приводила также к

окислительному повреждению белка.

При проведении анализа вестерн-блот с целью определения относительного количества Е-селектина мы получили следующие результаты. 30 минутная совместная с пероксинитритом экспозиция выявила разнонаправленные изменения относительного количества Е-селектина. 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% ($p \leq 0,01$) (Рисунок 63).

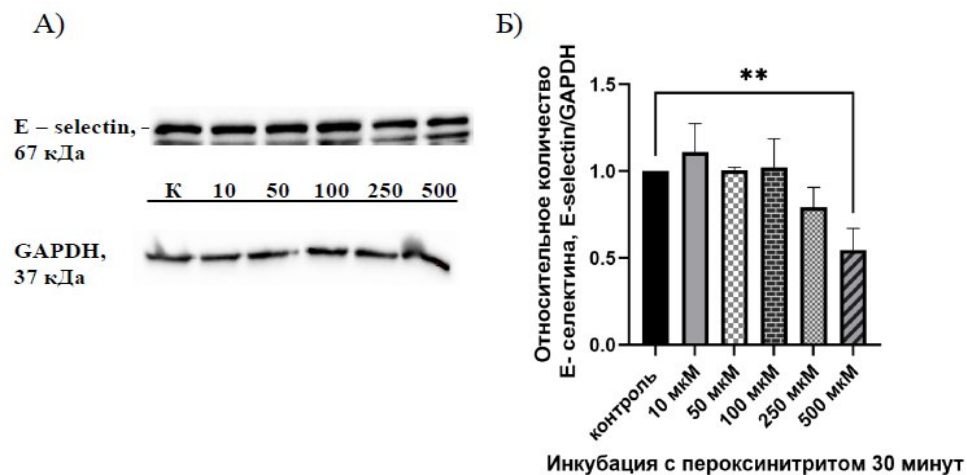


Рисунок 63– Относительное количество Е-селектина в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации в течение 30 минут, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведенного методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

В последующем, 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% ($p \leq 0,001$), оно явилось статистически значимым как при часовой, так и двухчасовой экспозиции. Концентрация 500 мкМ продемонстрировала снижение по сравнению с контролем, но оно не явилось статистически значимым (Рисунок 64).

При двухчасовой инкубации повышение относительного количества Е-селектина составило 600% ($\leq 0,0001$) (Рисунок 65).

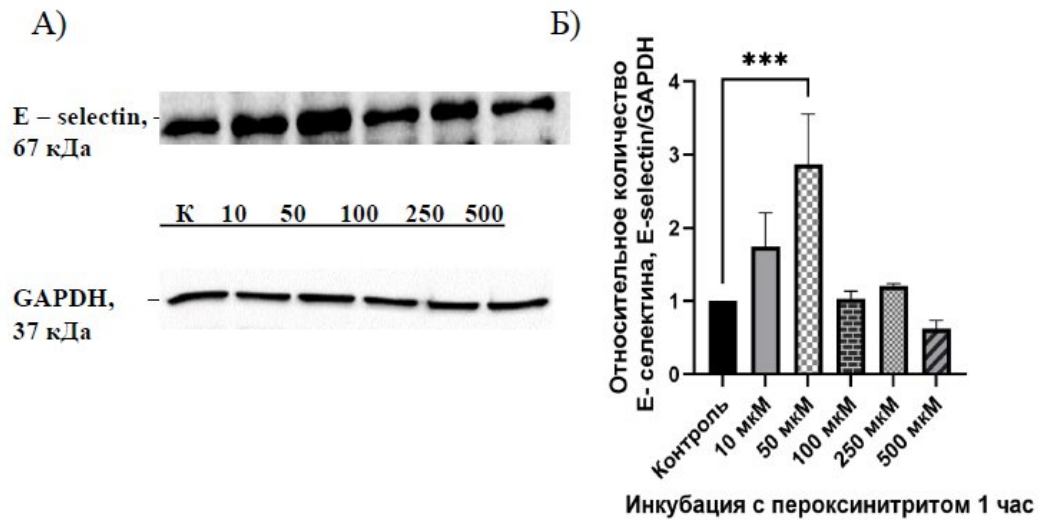


Рисунок 64 – Относительное количество Е-селектина в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации в течение 1 часа, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; *** – $p \leq 0,001$; А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведённого методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

Двухчасовая инкубация клеток HUVEC с пероксинитритом также вызвала разнонаправленные изменения относительного количества селектина Е, статистически значимо повысила его при концентрации пероксинитрита 50 мкМ.

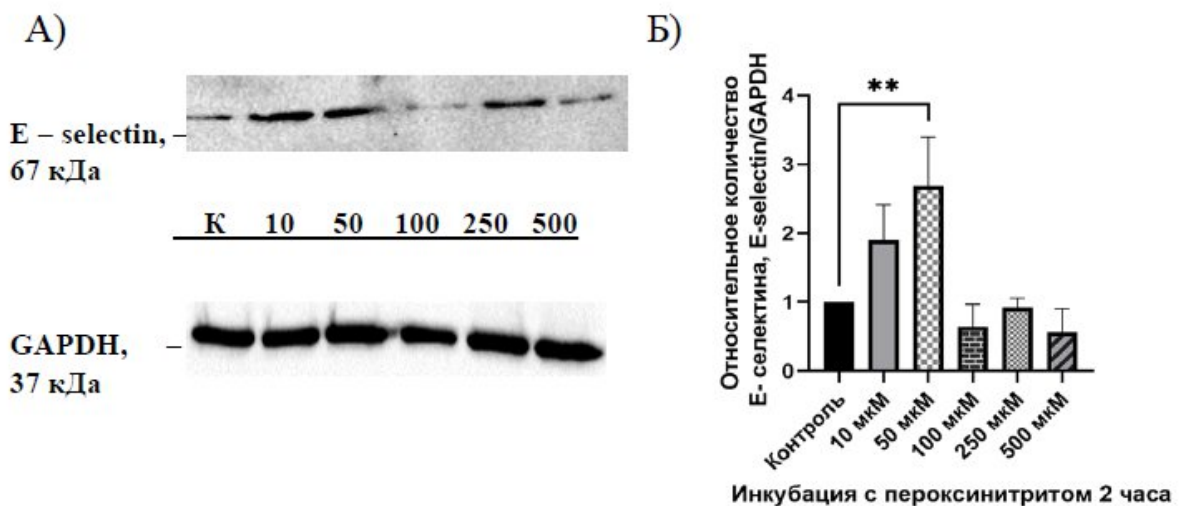


Рисунок 65 – Относительное количество Е-селектина в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации в течение 2-х часов, ($M \pm SD$, $n=3$) нет бенда

Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведённого методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

Таким образом, кратковременная инкубация с пероксинитритом в течение 30 минут снижает относительное количество Р-селектина в концентрациях 50-500 мкМ, и Е-селектина в концентрации 500 мкМ статистически значимо. Совместная экспозиция HUVEC с пероксинитритом в течение 60 минут повышает относительное количество Р-селектина в низкой концентрации 10 мкМ и Е-селектина в низкой концентрации 50 мкМ статистически значимо. Двухчасовая совместная инкубация HUVEC с пероксинитритом не выявила статистически значимых изменений относительного количества Р-селектина, но выявила статистически значимое повышение относительного количества Е селектина в концентрации 50 мкМ. Следовательно, можно сделать вывод о влиянии пероксинитрита на изменение относительного количества молекул клеточной адгезии-селектинов Р и Е.

4.2.4. Оценка относительного количества индуцибельной и эндотелиальной синтазы оксида азота (II) в лизатах эндотелиоцитов методом вестерн-блот

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 66).

При удлинении времени совместной экспозиции первичной клеточной линии HUVEC растворами пероксинитрита в различных концентрациях до 1 часа получены сведения о снижении относительного количества индуцибельной синтазы оксида азота (II) (Рисунок 67).

Концентрации пероксинитрита в 100 и 250 мкмоль вызвали снижение относительного количества фермента на 69 ($p \leq 0,01$) и 49 % ($p \leq 0,05$) соответственно.

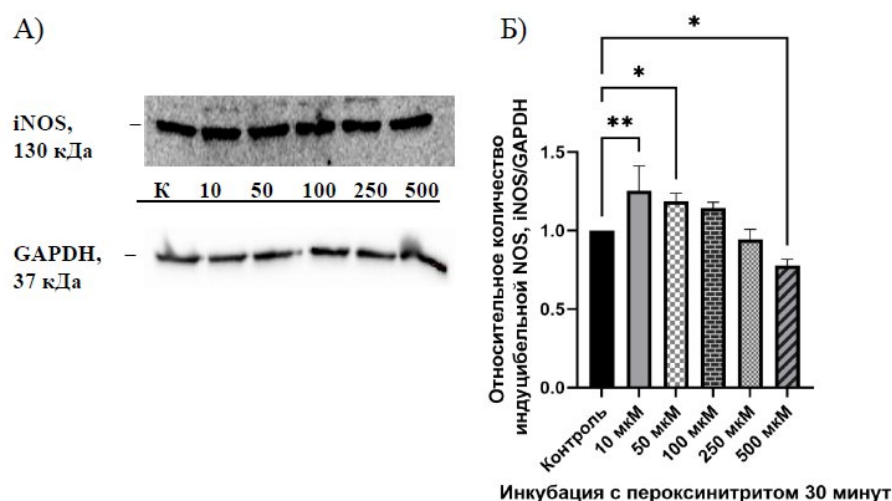


Рисунок 66 – Изменение относительного количества iNOS в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации в течение 30 минут, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведенного методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

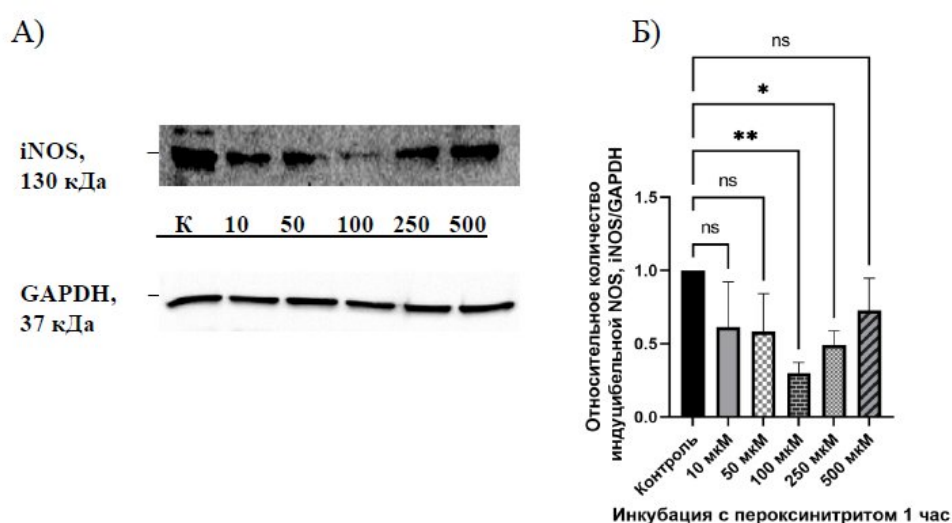


Рисунок 67 – Изменение относительного количества iNOS в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации в течение 1 часа, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; ns – $p > 0,05$; А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведенного методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab.

Последующее увеличение экспозиции до 2-х часов показало статистически значимое повышение белка на 51% ($p \leq 0,05$) при концентрации пероксинитрита 100 мкМ (Рисунок 68).

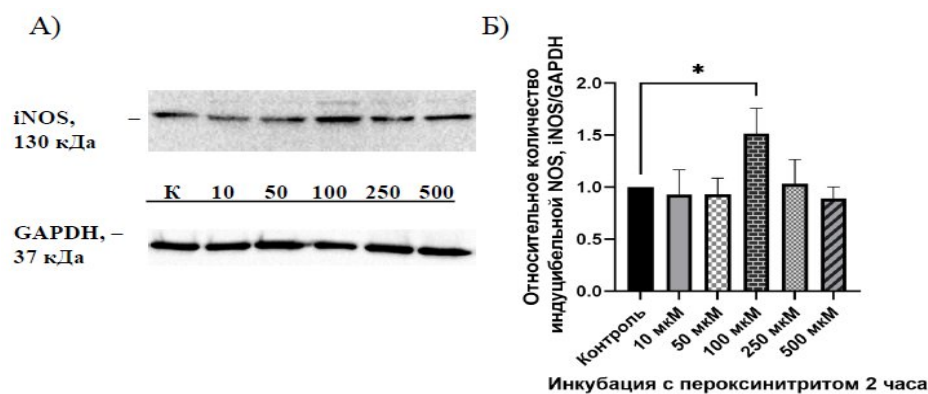


Рисунок 68 – Изменение относительного количества iNOS в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации в течение 2 часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$;
 А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведенного методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

Далее при инкубации клеток HUVEC с пероксинитритом были получены следующие сведения: относительное количество 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 69).

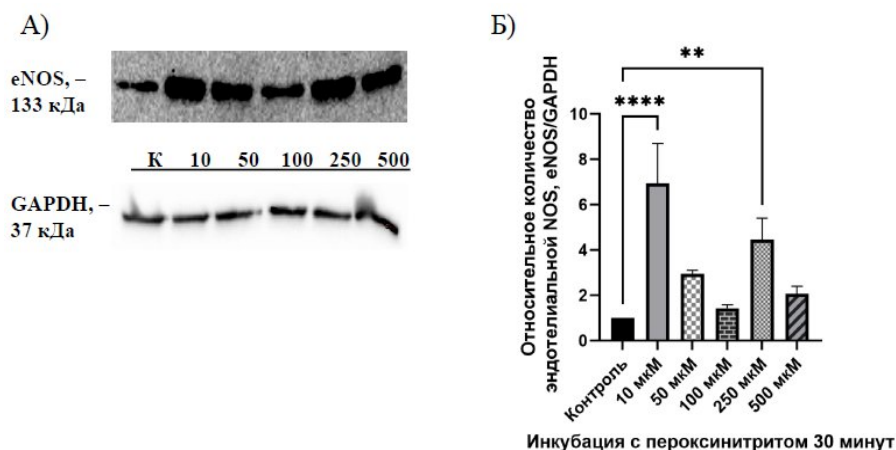


Рисунок 69 – Изменение относительного количества eNOS в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации в течение 30 минут, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$;
 ** – $p \leq 0,01$; **** – $p \leq 0,0001$; А) – показатели детекции Е-селектина и GAPD, проведенного методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

При часовой экспозиции относительное количество эндотелиальной NO-синтазы снижалось в лизатах клеток по отношению к контролю, статистически значимо в концентрации 250 мкМ: на 36% ($p \leq 0,01$) (Рисунок 70).

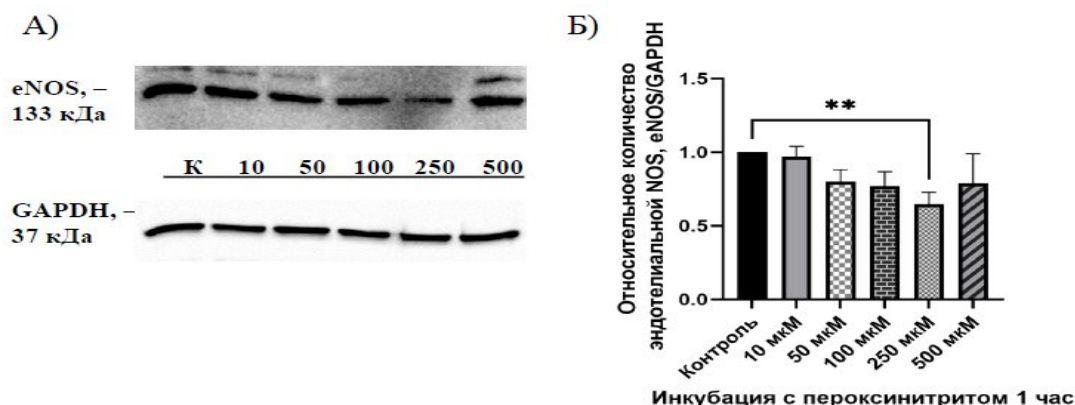


Рисунок 70 – Изменение относительного количества eNOS в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации в течение 1 часа, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH проведенного методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

Увеличение экспозиции до 2-х часов относительное количество эндотелиальной NO синтазы обнаруживало тенденцию к повышению, что не явилось статистически значимым (Рисунок 71).

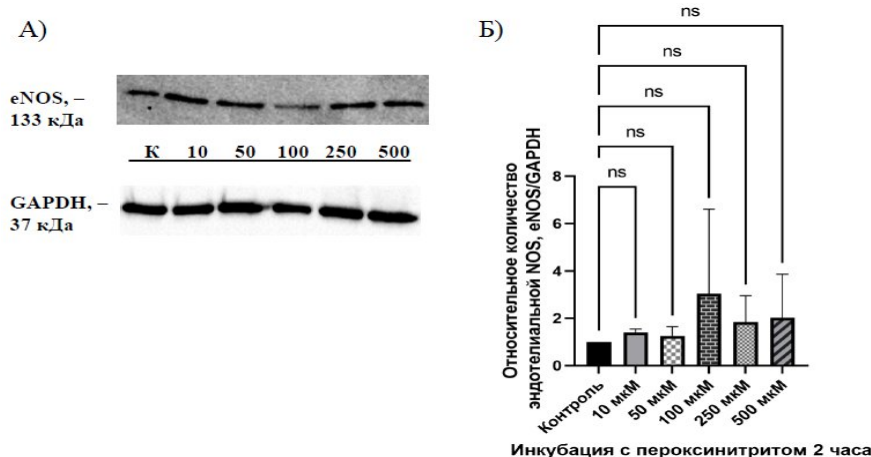


Рисунок 71 – Изменение относительного количества eNOS в лизатах клеток HUVEC под действием пероксинитрита при их совместной инкубации в течение 2 часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ^{ns} – $p > 0,05$; А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведенного методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

Таким образом, 30-минутная совместная инкубация HUVEC с растворами пероксинитрита привела к разнонаправленному влиянию на уровень iNOS. Низкие концентрации 10 и 50 мкМ повышали ее уровень, высокие 500 мкМ снижали по сравнению с контролем. Часовая совместная инкубация не выявила статистически значимых отличий, двухчасовая повысила уровень iNOS при концентрации 100 мкМ.

При 30-минутной инкубации уровень eNOS повышался под действием 10 и 250 мкМ пероксинитрита, часовая инкубация статистически значимо снижала уровень eNOS в концентрации 250 мкМ. Следовательно, можно сделать вывод о влиянии пероксинитрита на изменение относительного количества индуцибельной и эндотелиальной NO-синтаз.

4.2.5. Оценка абсолютного количества sP- и sE-селектинов в кондиционной среде методом ИФА

Следующим этапом представленного исследования явилось определение растворимой формы селектинов в кондиционной среде или клеточном супернатанте. С этой целью анализировалась питательная среда, в которой культивировались клетки.

Было показано, что экспозиция клеток с пероксинитритом в концентрации 500 мкМ в течение одного часа привела к статистически значимому повышению sP-селектина в кондиционной среде по сравнению с контролем ($p \leq 0,0001$). Остальные концентрации и сроки экспозиции не привели к статистически значимым изменениям абсолютного количества растворимой формы sP селектина (Рисунок 72).

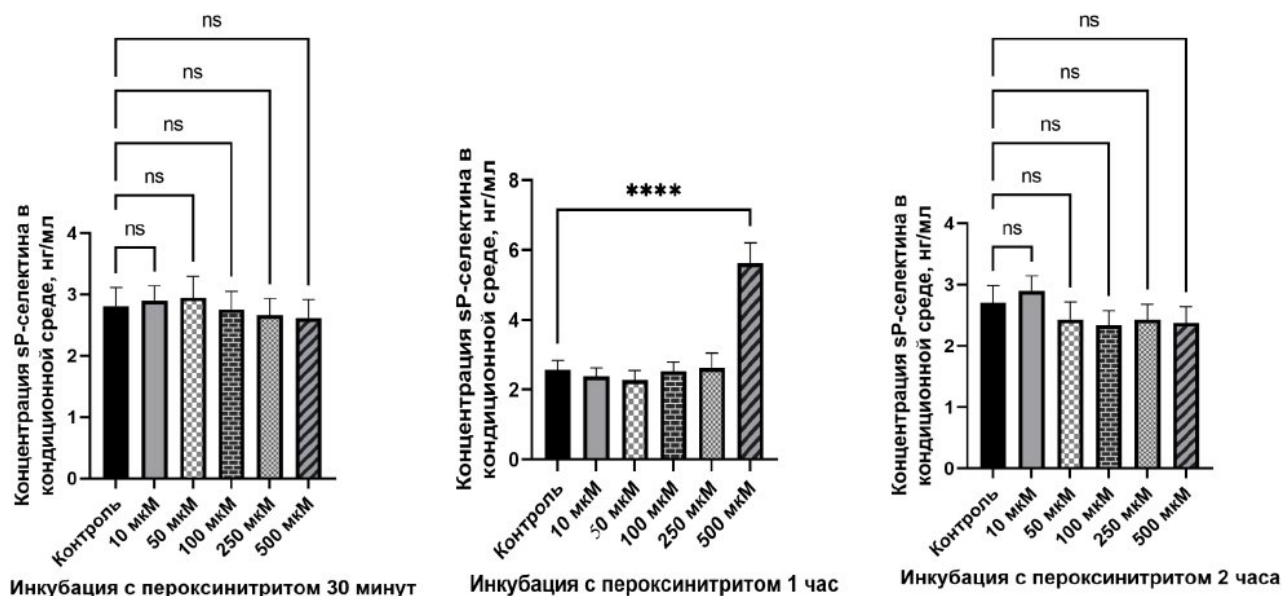


Рисунок 72 – Абсолютное количество sP-селектина в кондиционной среде, ($M \pm SD$, $n=3$), нг/мл

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

Растворимая форма E-селектина продемонстрировала чувствительность по отношению к пероксинитриту и показала статистически значимое снижение при низких концентрациях агента и статистически значимое повышение в высоких концентрациях (Рисунок 73). При этом более продолжительная инкубация, 2 часа, привела к повышению абсолютного количества E-селектина, дозозависимо и статистически значимо в концентрациях 100-500 мкМ.

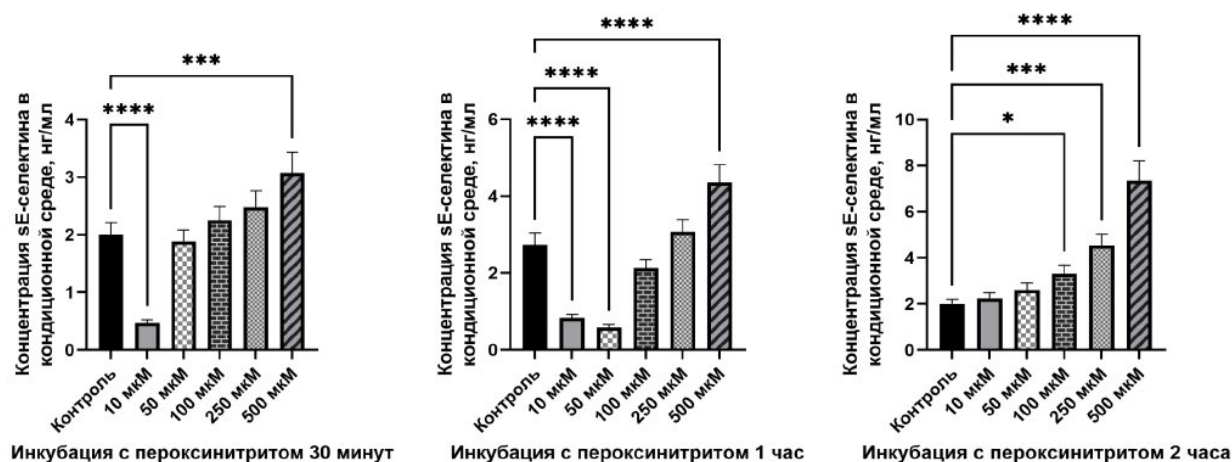


Рисунок 73 – Абсолютное количество sE-селектина в кондиционной среде, ($M \pm SD$, $n=3$), нг/мл

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

Как уже отмечалось выше, пероксинитрит представляет собой одну из весьма активных и реакционноспособных АФА, образующихся в организме человека, что подтверждается фактом его существования в условиях физиологических значений рН в течение нескольких миллисекунд [289]. В течение этого непродолжительного времени возможны его превращения в другие АФК и АФА [301]: в радикал диоксида азота (оксид азота (IV)) и гидроксильного радикала; далее диоксид азота может реагировать с оксидом азота с образованием в триоксида диазота (оксид азота (III)); в свою очередь, нитрит-анион возникает в реакции оксида азота и гидроксильного радикала; а также в карбоксил-анион-радикал и радикал диоксида азота (в результате взаимодействия пероксинитрита с углекислым газом).

Кроме указанных путей превращения, он может вступать и в другие реакции: перекисное окисление липидов мембран, может диффундировать сквозь плазматическую мембрану в виде пероксинитритной кислоты ONOOH и в последующем модифицировать интрацеллюлярные протеины: окислением боковых цепей аминокислотных остатков цистеина, метионина и тирозина; нитрозилированием аминокислотных остатков триптофана; окислением атомов металлов в молекулах металло- и гемпротеинов.

Можно отметить, что при 30 минутной – 1-часовой совместной инкубации пероксинитрит для эндотелиоцитов *in vitro* может выступать в роли сигнальной молекулы, подавляя митохондриальную активность, влияя как на относительное количество белков селектинов Р- и Е- в лизатах клеток, так и на протеолитический шеддинг внеклеточных доменов указанных белков. Двухчасовая инкубация продемонстрировала меньшее количество статистически значимых отличий.

Подводя итог результатам совместного культивирования эндотелиоцитов с пероксинитритом, можно представить изменения в клетке следующим образом (Рисунок 74). При 30-минутной инкубации повышается уровень обеих NO-синтаз, растет количество продуцируемого ими NO, начинается нарастание метаболитов NO и битирозина. При этом пероксинитрит оказывает свое токсическое действие, окисляя боковые остатки аминокислот, усиливается нитрозилирование, карбонилирование белков и отмечается снижение двух селектинов Р и Е. При

дальнейшей часовой инкубации снижается уровень обеих NO-синтаз, уровень метаболитов NO выходит на максимум, битирозин остается повышенным.



Рисунок 74 – Влияние пероксинитрита на относительное количество селектинов в лизатах клеток HUVEC и концентрацию растворимых форм в кондиционной среде

Концентрация Р-селектина увеличивается в результате высвобождения белка из телец Вейбеля Палладе, как результат сигнальной роли пероксинитрита. Концентрация Е-селектина повышается под действием низких концентраций пероксинитрита (50 мкмоль), вероятно, вследствие его интернализации в компартменты ранних эндосом везикулотубулярной формы. Такое явление описано для Е селектина [137]. Результатом процесса может явиться и снижение протеолитического шеддинга для селектина Е. Высокие же концентрации пероксинитрита повышают протеолиз, тем самым увеличивая концентрацию растворимых форм в кондиционной среде.

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

4.3.1. Оценка метаболической активности эндотелиоцитов (HUVEC) при их инкубации с донатором оксида азота (II) S-нитрозоглутатионом

S-нитрозоглутатион (GSNO, SNOG) является S-нитрозотиолом, образующимся эндогенно, постоянно присутствующим в организме человека, и являющимся естественным донатором оксида азота. Вследствие этого его коммерческие формы довольно часто используется в экспериментальных условиях [125, 293].

GSNO признан внутриклеточным мессенджером в опосредовании биохимических сигнальных путей; но, в зависимости от концентрации, может оказывать двойственное влияние на клетки: как положительное, так и отрицательное [60]. По данным наших коллег, он может выступать в роли индуктора НС и апоптоза [61]. В этой связи мы выбрали его в качестве донора оксида азота в нашем эксперименте.

Первым этапом нашего исследования явилось изучение метаболической активности клеток HUVEC при их инкубации с растворами S-нитрозоглутатиона в различных концентрациях.

Были выявлены следующие тенденции (Рисунок 75).

Активность митохондриальных оксидоредуктаз эндотелиоцитов несколько повышалась в течение первых трех часов экспозиции с GSNO в концентрации 10 мкМ, но данное отличие статистической значимости не имело.

А экспозиция в течение 24-х и 72-х часов дала статистически 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% ($p<0,0001$).

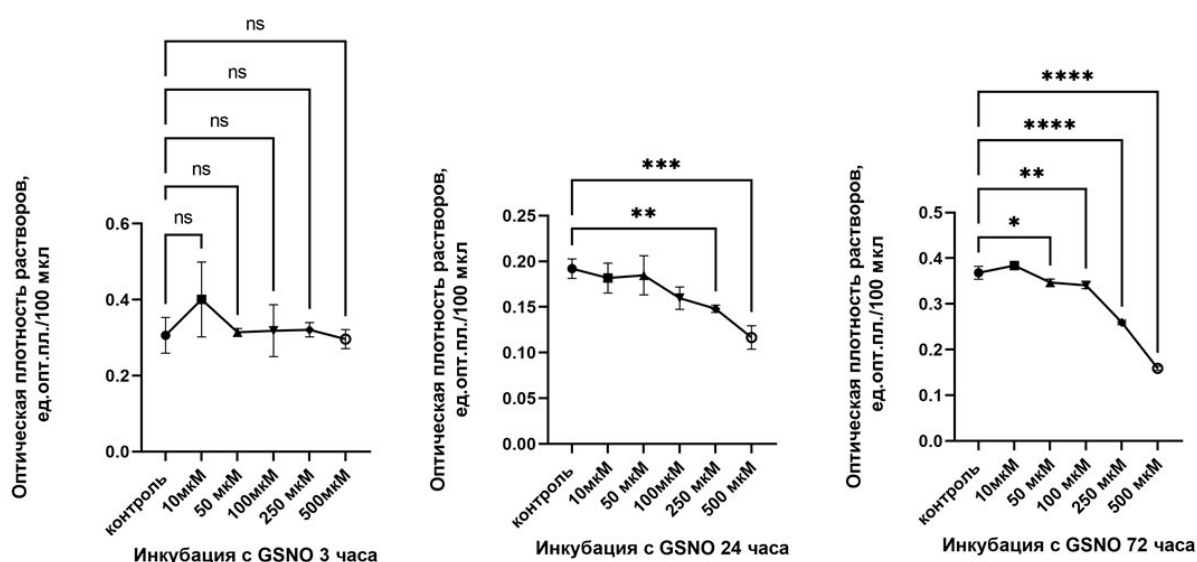


Рисунок 75 – Оценка метаболической активности клеток HUVEC под действием нитрозоглутатиона при их совместной инкубации, ($M \pm SD$, $n=3$), ед.опт.пл.

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

4.3.2. Оценка выраженности нитрозативного стресса по маркерам: стабильным метаболитам оксида азота, битирозину, пероксинитриту

Оценка стабильных метаболитов оксида азота в лизатах HUVEC

Стабильные метаболиты оксида азота являются косвенным признаком дисфункции эндотелия (Рисунок 76).

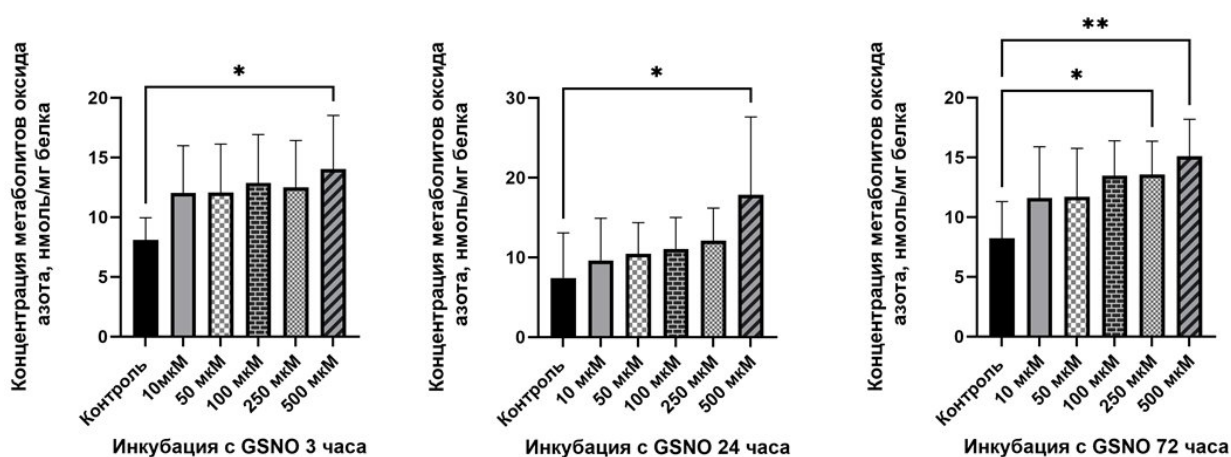


Рисунок 76 – Оценка абсолютного количества суммы стабильных метаболитов NO ($NO_2^- + NO_3^- = NO_x$) в лизатах HUVEC под действием нитрозоглутатиона при их совместной инкубации, ($M \pm SD$, $n=3$), мкмоль/л

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

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. Статистической значимостью обладали изменения при экспозиции с S-нитрозоглутатионом в максимальной концентрации, а также при инкубации в течение трех суток: в концентрации 500 мкМ на 63,4% ($p=0,024$), 24 часа в концентрации 500 мкМ на 88,8 % ($p=0,038$), 72 часа в концентрации 100-500 мкМ на 70% ($p=0,014$); 70 % ($p=0,016$) и 90% ($p=0,0011$) соответственно.

Оценка битирозина в лизатах HUVEC

При определении битирозина было зафиксировано повышение уровня продукта действия оксида азота (II) на белки – битирозина практически во всех временных точках и концентрациях статистически значимо ($p=0,0001$) (Рисунок 77).

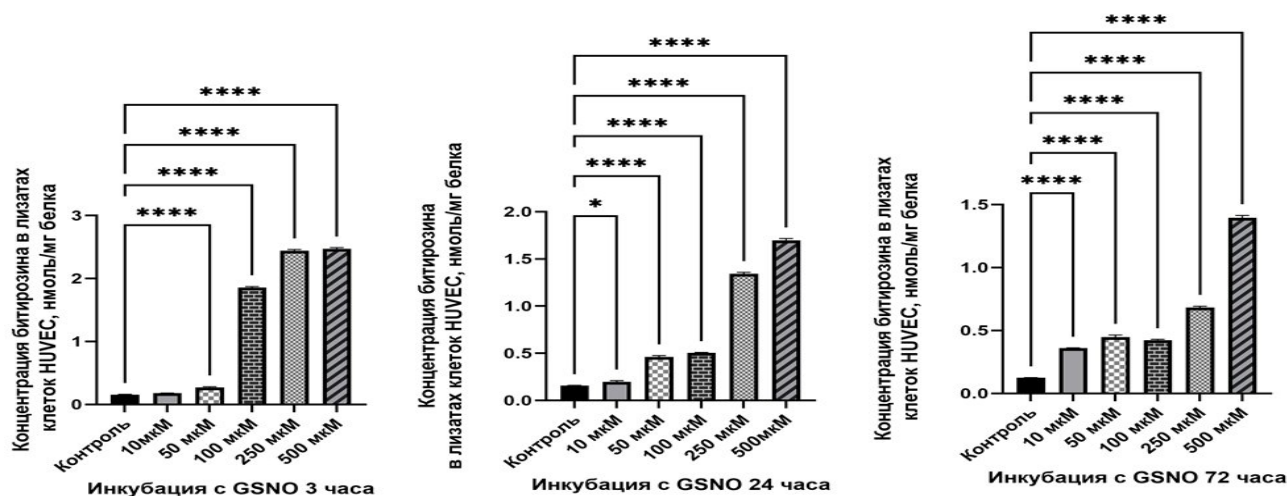


Рисунок 77 – Изменение уровня битирозина в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом, ($M \pm SD$, $n=3$), нмоль/мг белка

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

Максимальные значения битирозина зарегистрированы при максимальных концентрациях S-глутатиона: 3 часа 250 мкМ и 500 мкМ более, чем в 14 раз ($p=0,0001$); 24 часа: 250 мкМ и 500 мкМ в 8 и 10 раз соответственно ($p=0,0001$); 72 часа: 500 мкМ в 11 раз ($p=0,0001$).

Оценка пероксинитрита в лизатах HUVEC

Концентрация побочного продукта метаболизма оксида азота - пероксинитрита, цитотоксичного окислителя, образующегося из оксида азота (NO) и супероксида, продемонстрировала разнонаправленные изменения (Рисунок 78).

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 % ($p=0,0001$).

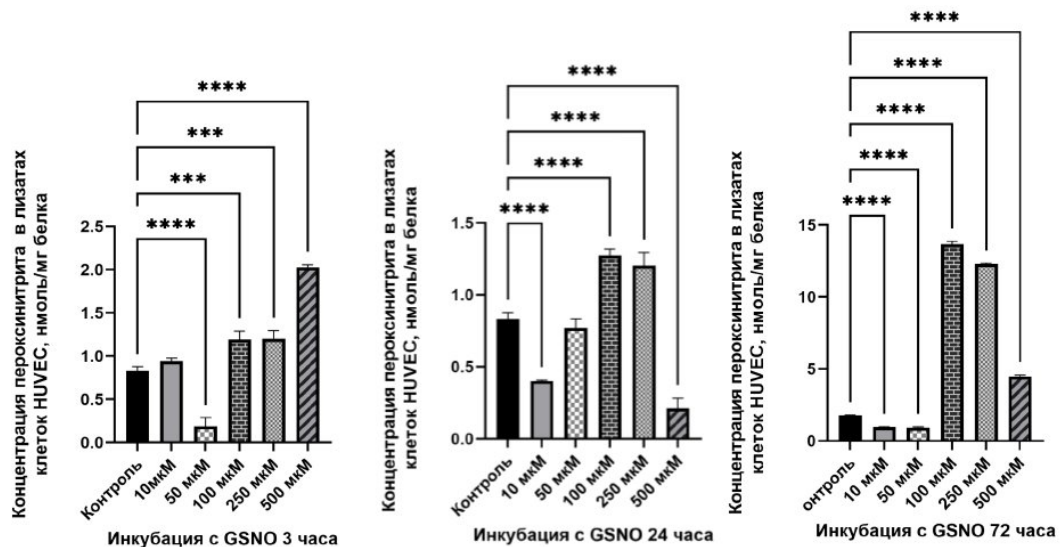


Рисунок 78 – Изменение пероксинитрита в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом, ($M \pm SD$, $n=3$), нмоль/мг белка

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

**** – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,0001$

4.3.3. Оценка относительного количества селектинов Р и Е в лизатах эндотелиоцитов методом вестерн-блот

Оценка относительного содержания селектина Р в лизатах клеток HUVEC под действием S-нитрозоглутатиона

Далее было проведено определение относительного количества Р-селектина методом вестерн-блот.

Три часа совместной экспозиции HUVEC с S-нитрозоглутатионом привело к статистически значимому увеличению: в концентрации GSNO 50 мкМ на 45 % ($p=0,0197$); и к статистически значимому снижению: в концентрации 500 мкМ ($p=0,0092$) (Рисунок 79).

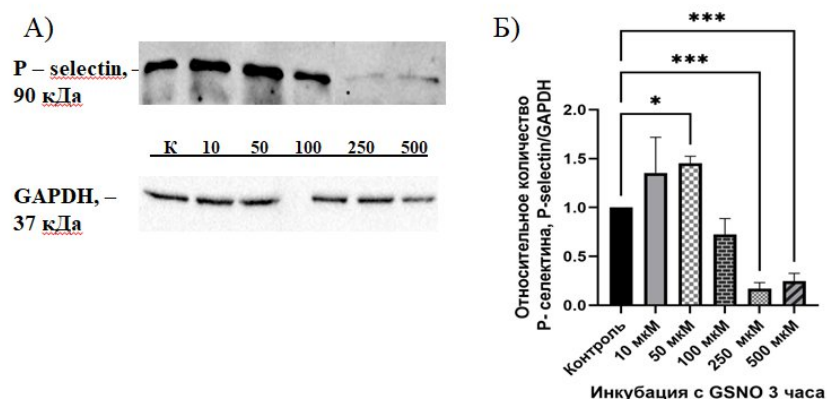


Рисунок 79 – Оценка относительного количества селектина Р в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом в течение 3 часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; *** – $p \leq 0,001$. А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведённого методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

В последующем мы провели совместную двадцатичетырёхчасовую 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 80).

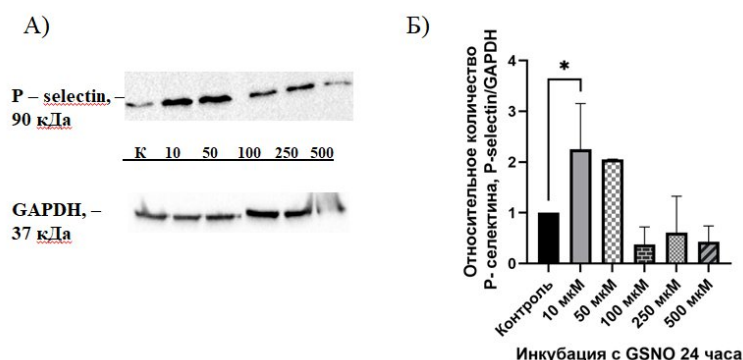


Рисунок 80 – Оценка относительного количества селектина Р в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом в течение 24 часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$). А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведённого методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

При инкубации GSNO с культурой HUVEC в течение 72 -х часов наблюдалось статистически значимое повышение относительного количества белка при концентрации S-нитрозоглутатиона 10 мкМ, 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 ($p<0,0001$) (Рисунок 81).

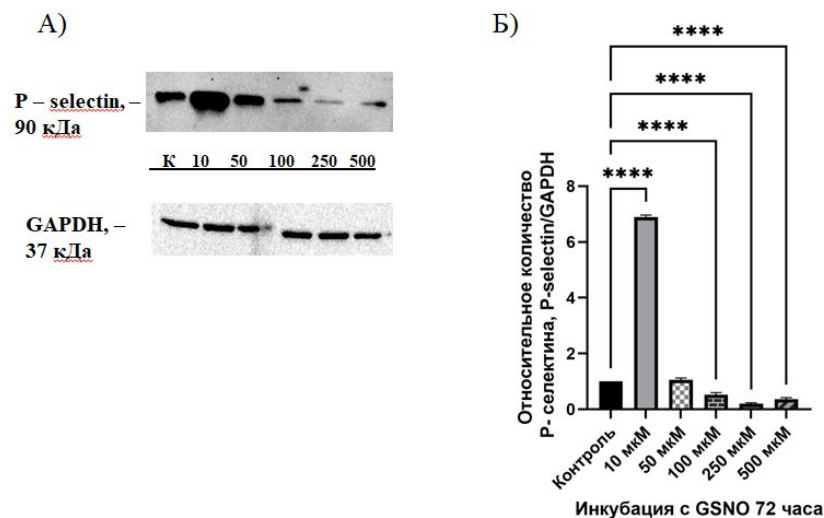


Рисунок 81 – Оценка относительного количества селектина Р в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом в течение 72 часов, ($M\pm SD$, $n=3$)

Примечание – * – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p\leq 0,05$; **** – $p\leq 0,0001$). А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведённого методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab)

Результаты определения относительного количества селектина Е

В ходе исследования установлено, что при кратковременной инкубации с нитрозоглутатионом, в течение 3-х часов относительное количество селектина Е в лизатах HUVEC во всех изучаемых концентрациях было ниже контроля, в концентрациях 10, 100, 250 мкМ статистически значимое: 10 мкМ снижение на 41% ($p=0,0008$), 100 мкМ – на 41% ($p=0,0064$), 250 мкМ – на 26 % ($p=0,017$) (Рисунок 82).

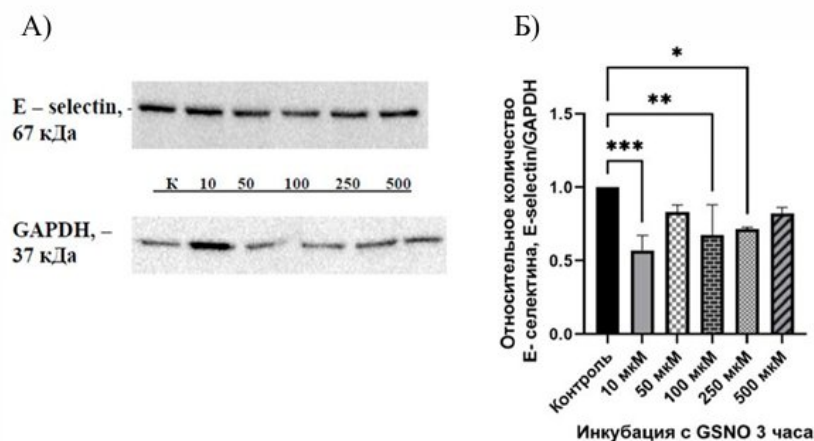


Рисунок 82– Изменение относительного количества Е-селектина в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом в течение 3 часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$; А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведённого методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

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 ($p=0,001$) (Рисунок 83).

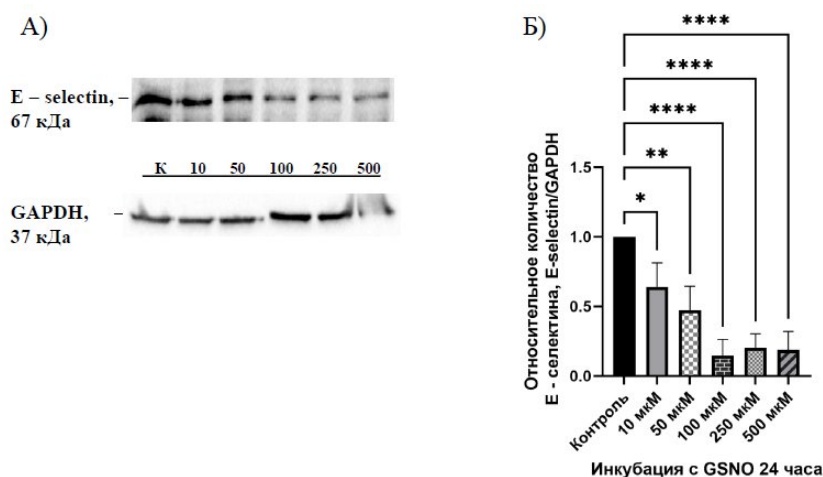


Рисунок 83 – Изменение относительного количества Е-селектина в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом в течение 24 часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; **** – $p \leq 0,0001$; А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведённого методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

Инкубация же клеток HUVEC с нитрозоглутатионом в течение трех суток не сопровождалась статистически значимыми изменениями относительного количества Е-селектина (Рисунок 84).

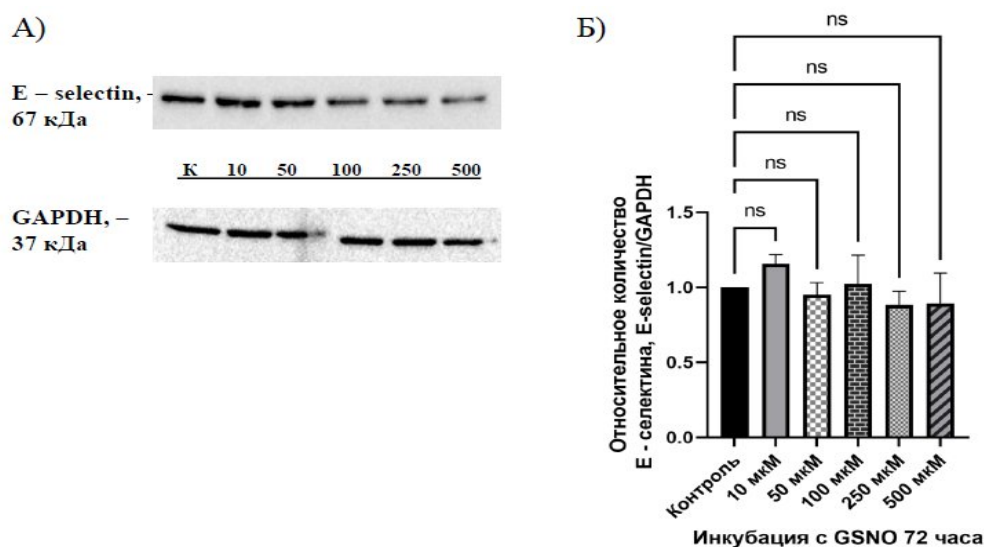


Рисунок 84 – Изменение относительного количества Е-селектина в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом в течение 72 часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

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

А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведенного методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

4.3.4. Оценка относительного количества индуцибельной и эндотелиальной синтазы оксида азота (II) в лизатах эндотелиоцитов методом вестерн-блот

Определение относительного количества индуцибельной NO-синтазы в экспериментальных условиях культивирования совместно с растворами нитрозоглутатиона привело к получению следующих сведений. Трехчасовая экспозиция HUVEC с НГ привела к статистически значимому повышению относительного количества iNOS в концентрациях 250 и 500 мкМ на 26% ($p \leq 0,05$) и 120 % ($p \leq 0,0001$) соответственно (Рисунок 85).

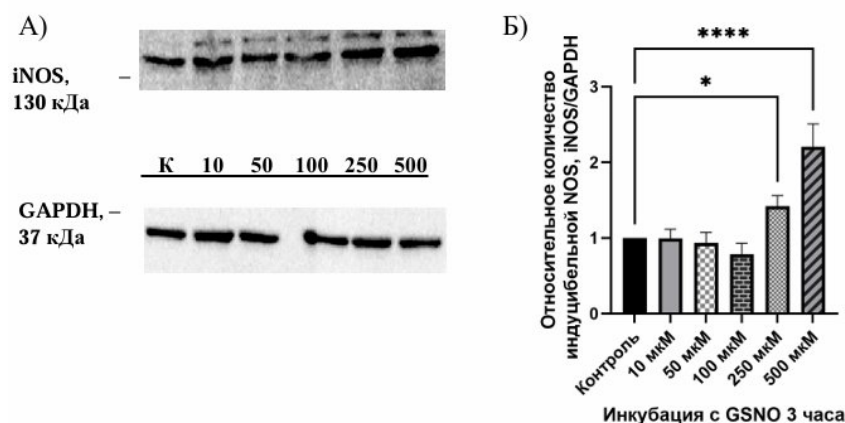


Рисунок 85 – Изменение относительного количества iNOS в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом в течение 3-х часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание – * – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; **** – $p \leq 0,0001$; А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведенного методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

Более длительные экспозиции демонстрировали ту же тенденцию: низкие концентрации повышали относительное содержание фермента по отношению к контролю. При 24-х часовой инкубации относительное количество iNOS статистически значимо повысилось в концентрации 10 мкМ на 80 % ($p \leq 0,05$) (Рисунок 86).

Высокие концентрации привели к снижению изучаемого показателя по сравнению с контролем.

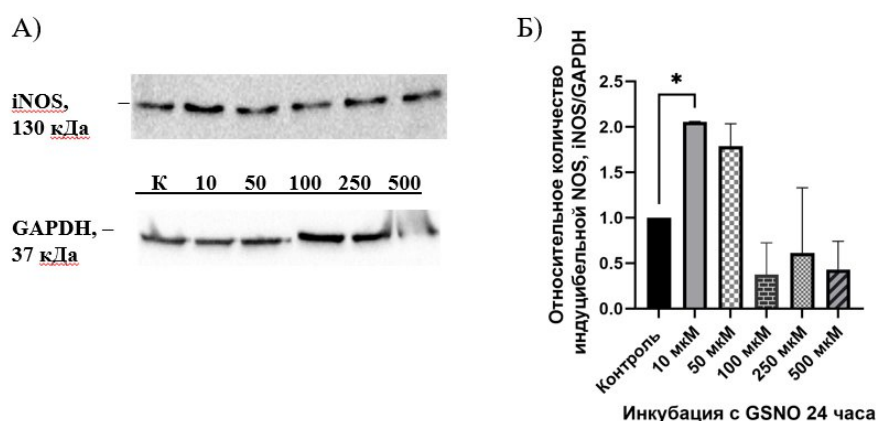


Рисунок 86 – Изменение относительного количества iNOS в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом в течение 24-х часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание – * – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$. А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведенного методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

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

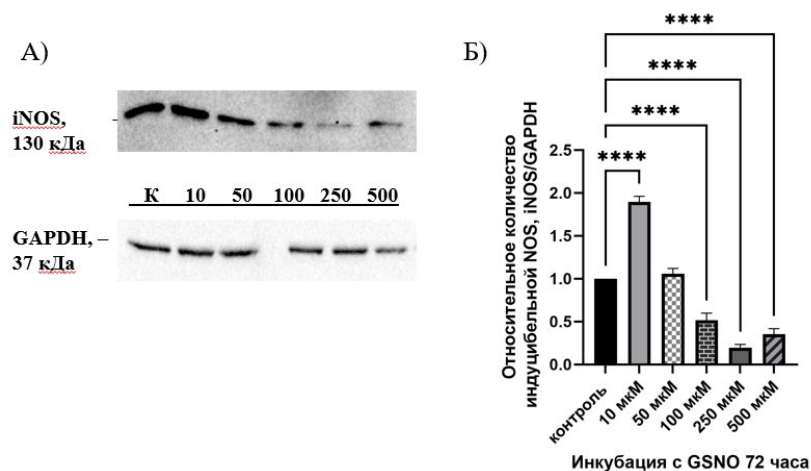


Рисунок 87 – Изменение относительного количества iNOS в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом в течение 72-х часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание – * – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; **** – $p \leq 0,0001$; А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведенного методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведенного с помощью программного обеспечения ImageLab

При 3-х часовом воздействии высокие концентрации S-нитрозоглутатиона повышали относительное количество индуцибельной NO-синтазы, при более продолжительном низкие – повышали, высокие снижали. Динамика изменения относительного количества iNOS при 24-х и 72-х часовой инкубации может быть объяснена следующим образом. Низкие концентрации нитрозоглутатиона оказывают на клетку цитопротекторный эффект через транскрипционный фактор Nrf2 [61]. Nrf2 способен влиять на активность индуцибельной NO-синтазы по нескольким механизмам. Во-первых, он может стимулировать экспрессию фермента диметиларгининдиметиламиногидролазы, которая расщепляет асимметричный диметиларгинин, непосредственный ингибитор iNOS. Во-вторых, он может стимулировать факторы антиоксидатной защиты, что могло отразиться на эффекте защиты NO-синтазы от окисления. И третий механизм, связан с непосредственным влиянием Nrf-2 на экспрессию гена индуцибельной NO-синтазы. В высоких концентрациях, GSNO оказывает цитотоксический эффект, в

результате чего iNO-синтаза способна подвергаться S-нитрозилированию, например, в сайте Cys331.

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

Трехчасовая экспозиция с GSNO во всех концентрациях привела к статистически значимому снижению относительного количества eNOS в лизатах клеток HUVEC (Рисунок 88).

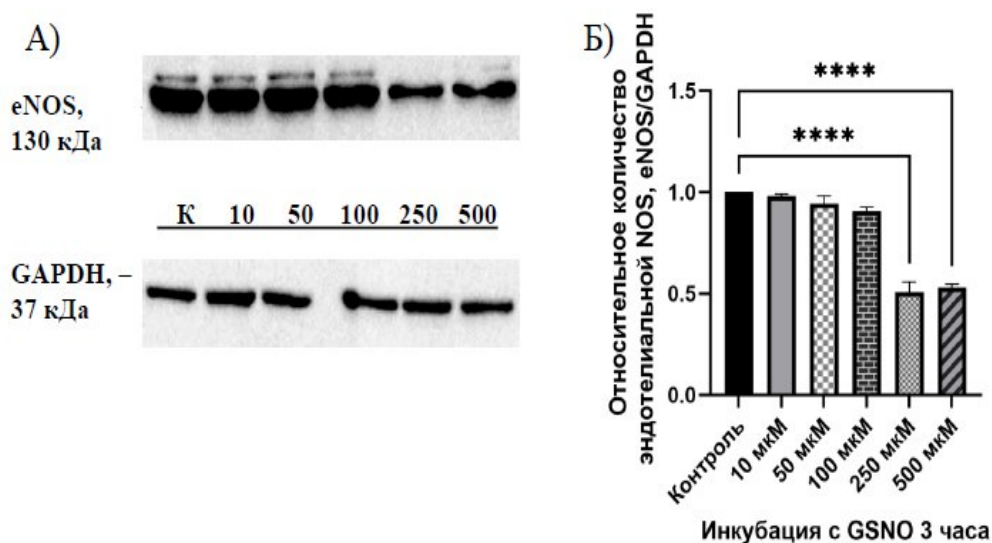


Рисунок 88 – Изменение относительного количества eNOS в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом в течение 3-х часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание – * – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$; **** – $p \leq 0,0001$; А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведенного методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

Было отмечено 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 ($p \leq 0,0001$) (Рисунок 89).

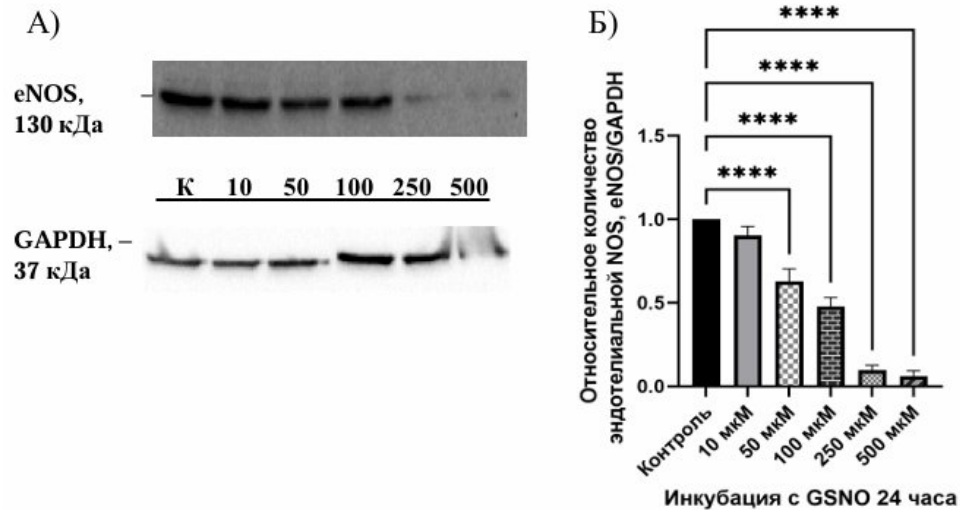


Рисунок 89 – Изменение относительного количества eNOS в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом в течение 24-х часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ****– $p \leq 0,0001$; А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведённого методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

Экспозиция же HUVEC с нитрозоглутатионом в концентрациях 10-500 мкМ в течение 72-х часов не привела к статистически значимым изменениям относительного количества изучаемого фермента (Рисунок 90).

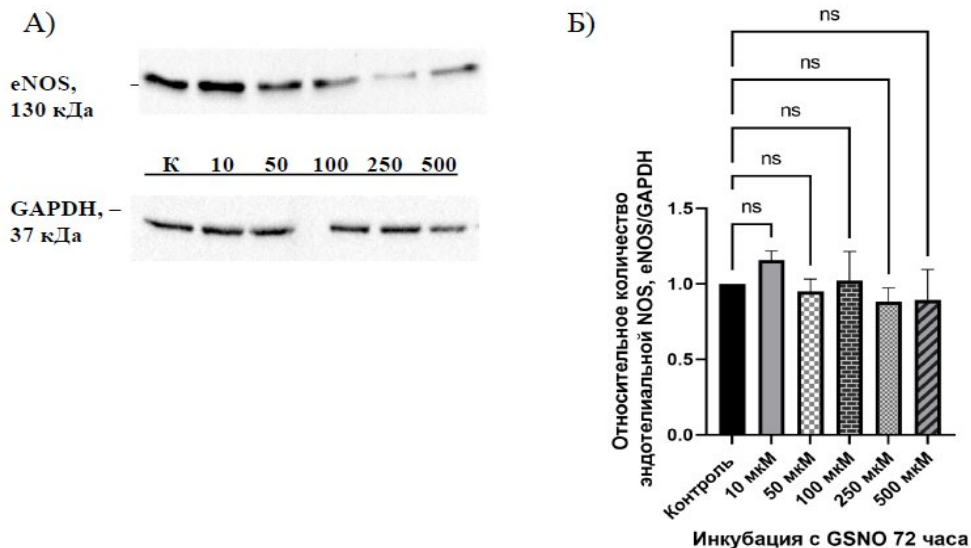


Рисунок 90 – Изменение относительного количества eNOS в лизатах клеток HUVEC при их совместной инкубации с S-нитрозоглутатионом в течение 72-х часов, ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ^{ns} – $p > 0,05$; А) – показатели детекции Е-селектина и GAPDH, проведённого методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+; Б) – показатели денситометрического анализа, произведённого с помощью программного обеспечения ImageLab

Инкубация HUVEC с S-нитрозоглутатионом в низких концентрациях повышает относительное содержание Р-селектина во все сроки совместной экспозиции, в высоких – снижает по сравнению с контролем.

Относительное количество селектина Е в лизатах клеток снижается при 3-х и 24-часовой инкубации, не меняется статистически значимо при 72-х часовой инкубации.

Инкубация HUVEC с GSNO приводит к повышению уровня индуцибельной NO – синтазы при минимальных концентрациях 10 и 50 мкМ, снижению уровня эндотелиальной NO-синтазы при 3-х и 24-х часовой совместной инкубации.

Динамика изменения относительного количества eNOS может объясняться следующим образом. Например, для pNOS было показано снижение под воздействием высоких концентраций S-нитроглутатиона в результате снижения активности фосфорилирующей её протеинкиназы В. В норме она активируется под воздействием данного фермента по Ser 1412. Эндотелиальная NOS также является конститутивной формой, также киназа Akt фосфорилирует eNOs, переводя её в активное состояние, поэтому и механизм влияния S-нитроглутатиона может быть аналогичным.

4.3.5. Оценка абсолютного количества sP- и sE-селектинов в кондиционной среде методом ИФА

Также мы определили абсолютное количество sP-селектина в кондиционной среде (Рисунок 91).

Было отмечено, что инкубация HUVEC с S-нитрозоглутатионом в течение 24-х и 72-х часов не продемонстрировала статистически значимых изменений, а при 3-х часовой инкубации было зафиксировано снижение sP-селектина при концентрации 50 мкМ на 57,8 % ($p=0,0002$), при концентрации 250 мкМ - повышение sP-селектина на 65,6 % ($p\leq 0,0001$).

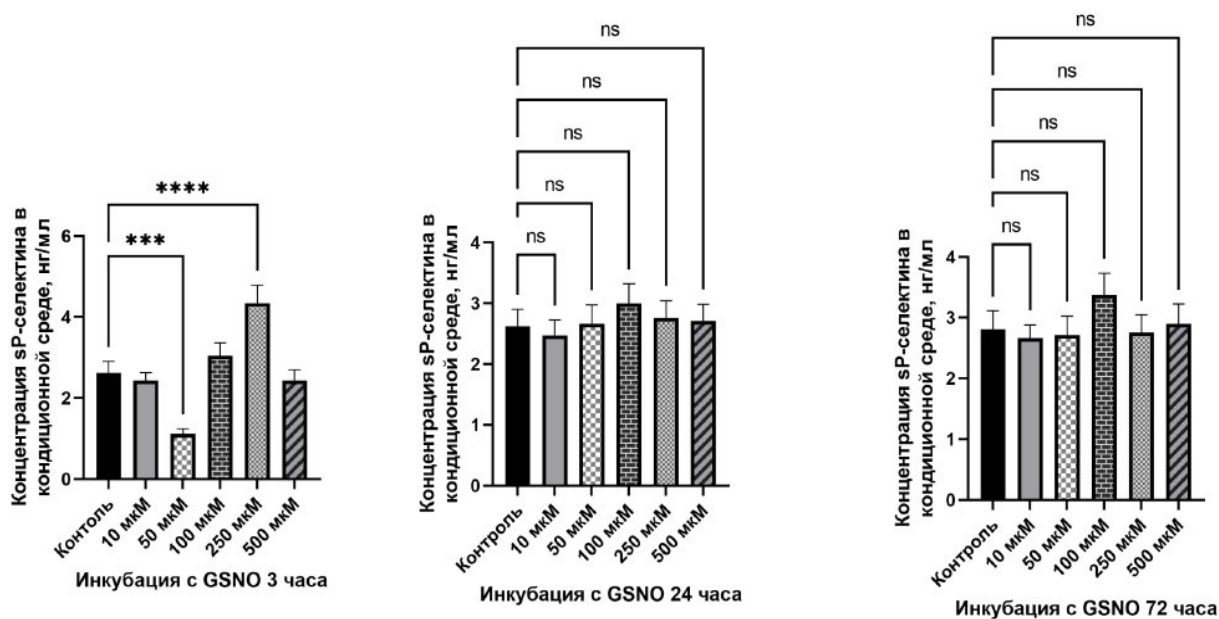


Рисунок 91 – Изменение абсолютного количества sP-селектина в кондиционной среде при совместной инкубации клеток HUVEC с S-нитрозоглутатионом, ($M \pm SD$, $n=3$), нг/мл

Примечание – * – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; *** – $p \leq 0,001$; **** – $p \leq 0,0001$; ns – $p > 0,05$

Растворимый фрагмент sE селектина показал несколько иную тенденцию (Рисунок 92).

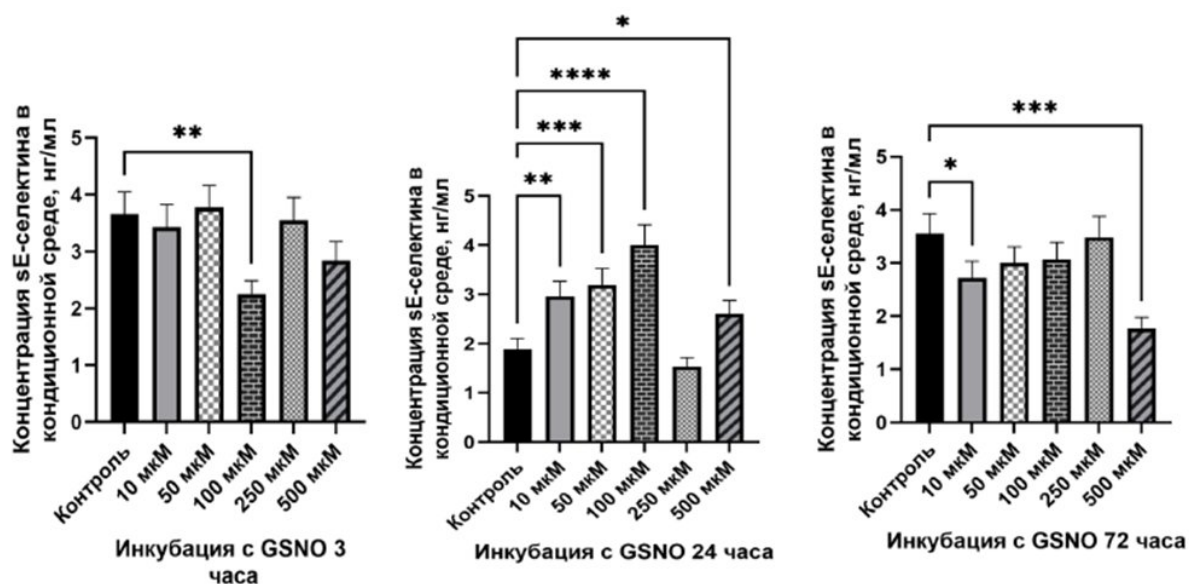


Рисунок 92 – Изменение абсолютного количества sE-селектина в кондиционной среде при совместной инкубации клеток HUVEC с S-нитрозоглутатионом, ($M \pm SD$, $n=3$), нг/мл

Примечание – * – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; *** – $p \leq 0,001$; **** – $p \leq 0,0001$; ns – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p > 0,05$

Инкубация с GSNO в течение трех и 72-х часов демонстрировала снижение sE фрагмента в кондиционной стере, статистически значимо в концентрации 100 мкМ при 3 часах, и 10, 500 мкМ при 72 часах. Инкубация же длительностью 24 часа повышала относительное количество sEселектина в кондиционной среде в концентрациях 50 мкМ на 69% ($p=0,0001$), в концентрации 100мкМ на 112% ($p=0,0001$) и концентрации 500 мкМ на 38% ($p=0,01$).

Вполне вероятно, это связано с выделением в кондиционную среду формы E-селектина, лишенной трансмембранного домена. То есть, растворимая форма может быть продуктом синтеза с участием специфической мРНК, лишённой последовательности, кодирующей трансмембранный домен белка, как это показано для P- и L- селектинов.

В ходе исследования мы отметили повышение продукции клетками идентификаторов нитрозилирующего стресса - токсичного продукта пероксинитрита при экспозиции с высокими концентрациями нитрозоглутатиона, и повышение битирозина. В научной литературе имеются разнородные данные о влиянии окислительного/нитрозильного стресса на экспрессию E-селектина.

Например, J. Zhang и соавторы (2023) сообщили о том, что ОС способен вызвать повышение экспрессии E-селектина, вероятно, через снижение экспрессии транскрипционного фактора ERG (кодируется геном *ETS-related gene*), регулирующего эмбриогенез, пролиферацию и дифференцировку клеток, ангиогенез, апоптоз и воспаление, что в итоге ведёт к протромботическому состоянию [261]. Показано, что данный транскрипционный фактор способен непосредственно взаимодействовать с участком – 127 промотора гена E-селектина, последствием чего является снижение активности гена E-селектина в эндотелиальных клетках.

L. Rouleau с соавторами (2010), изучали другой фактор транскрипции – KLF2 (Крюппель-подобный фактор 2, Krüppel-likefactor 2), имеющий в своем составе фрагменты структурного мотива супервторичной структуры «цинковый палец». Было показано, что он играет ключевую роль в обеспечении противовоспалительной функции в эндотелиоцитах, а его сверхэкспрессия ведет к

значительному снижению уровня мРНК и белка Е-селектина в эндотелиальных клетках аорты человека НАЕС (Human Aortic Endothelial Cells) [295].

Также М. Chen с соавторами показали, что фактор транскрипции E2F-1, играющий главенствующую роль в регуляции клеточного цикла и действии опухолевых супрессоров, и в преобразовании белков мелких опухолевых ДНК-содержащих вирусов, подавляет экспрессию Е-селектина в НАЕС и препятствует адгезии моноцитов U937 – модели моноцитарных клеток, к НАЕС [150].

Резюме. Таким образом, при культивировании клеток с GSNO различной концентрации было установлено достоверное повышение в лизатах HUVEC концентрации стойких метаболитов NO во все сроки экспозиции в высоких концентрациях, количество битирозина во все сроки экспозиции практически во всех концентрациях, что подтверждает развитие ОС/НС. Концентрация пероксинитрита меняется разнонаправленно: низкие концентрации GSNO снижают его, высокие – повышают, что может подтвердить его сигнальную роль в отношении синтаз оксида азота, чью активность он ингибирует в низких концентрациях.

Трехчасовое воздействие нитрозоглутатиона на эндотелиоциты в низкой концентрации 10 мкМ приводит к статистически значимому повышению относительного количества Р-селектина; при высоких концентрациях - 100-500 мкМ отмечается статистически значимое снижение относительного количества Р-селектина. Относительное количество Е-селектина в лизатах клеток HUVEC статистически значимо снижается по сравнению с контролем, под действием S-нитрозоглутатиона при их совместной инкубации в течение трех и двадцати четырех часов во всех экспериментальных концентрациях.

Относительное количество iNOS меняется разнонаправленно: повышается под воздействием высоких концентраций GSNO (250-500 мкМ) при 3-х часовой экспозиции и в низких концентрациях (10 мкМ) при 24-72-х часовой экспозиции, снижается под воздействием GSNO в концентрациях 100-500 мкМ при 72-х часовой совместной инкубации. Относительное количество eNOS снижается при 250-500 мкМ концентрации GSNO в течение 3-х часов, во всех концентрациях в течение

24-х часов, 72-х часовая инкубация не оказывает влияния.

Абсолютное количество sP в кондиционной среде меняется разнонаправленно при 3-часовой инкубации: снижается при воздействии НГ в концентрации 50 мкМ и повышается в концентрации 250 мкМ по сравнению с контролем. Инкубация длительностью в 24 и 72 часа не влияет на абсолютное количество sP селектина.

Абсолютное количество растворимой формы sE-селектина в клеточном супернатанте выше, чем в контрольной группе при совместной инкубации HUVEC и S-нитрозоглутатиона длительностью сутки в концентрациях 10, 100, 500 мкМ.

Все полученные данные можно представить в виде схемы (Рисунок 93).

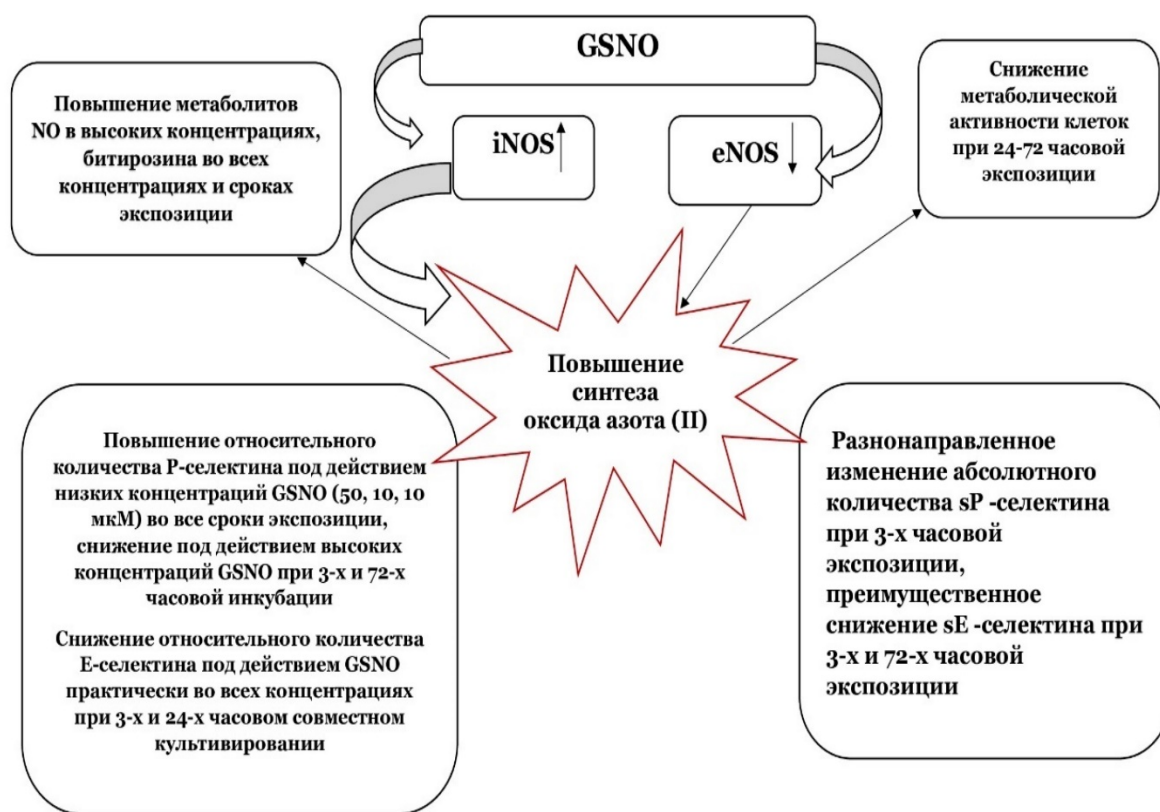


Рисунок 93 – Влияние S-нитрозоглутатиона на относительное и абсолютное количество Р- и Е-селектина

При инкубации первичной линии HUVEC с S-нитрозоглутатионом отмечается повышение уровня индуцибельной синтазы оксида азота, что ведет к развитию НС/ОС, о чём свидетельствует повышение стойких метаболитов NO и битирозина, а также снижение митохондриальной активности клеток.

Под воздействием iNOS повышается синтез оксида азота, который влияет на относительное и абсолютное количество Р- и Е-селектина.

Все полученные нами результаты позволяют подтвердить мнение о влиянии оксида азота (II) на функциональный ответ эндотелия путем изменения относительного количества молекул межклеточной адгезии Е- и Р-селектина, как в лизатах эндотелиоцитов, так и растворимого фрагмента в кондиционной среде.

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

Как уже было описано выше, как селектин L, так и универсальный для всех селектинов гликопротеиновый лиганд вырабатываются разными типами лейкоцитов периферической крови. На следующем этапе исследования лейкоциты периферической крови делили на две фракции, руководствуясь основными функциями, выполняемыми каждой из лейкоцитарных фракций.

Нейтрофилы, или полиморфноядерные лейкоциты периферической крови человека являются первой линией защиты «хозяина» от инфекции, травмы, используя различные стратегии для осуществления этой важной функции. К таким стратегиям можно отнести фагоцитоз, дегрануляцию, продукцию АФК, хемокинов и цитокинов, а также высвобождение внеклеточных нейтрофильных ловушек (ВНЛ), (англ.: Neutrophil extracellular traps, NET) с целью усиления антимикробных свойств [209, 321]. С этих позиций нейтрофилы используются в терапевтических стратегиях [291].

Высвобождение NET происходит в результате активации комплекса НАДФН-оксидазы, инициируемой биохимическим сигнальным путём протеинкиназы C (PKC)-Raf/MEK/ERK [247]. Современная наука располагает данными, что PSGL-1 обладает способностью активировать путь ERK [314], тем самым способствуя образованию NET [224]. Кроме того, этот комплекс запускает активацию ферментов, таких как миелопероксидаза (англ.: myeloperoxidase, MPO),

нейтрофильная эластаза (англ.: neutrophil elastase, NE) и протеин-аргининдезаминаза типа 4 (англ.: protein-argininedeiminase, PAD4) [242, 248, 249, 266].

При инкубации фракции ПМЯЛ с пероксинитритом было отмечено снижение селектина L в гомогенатах лейкоцитов по сравнению с контрольной группой (Таблица 30).

Таблица 30 – Уровень селектина L и PSGL-1 в гомогенатах полиморфноядерных лейкоцитов при их совместной экспозиции с пероксинитритом в течение 1 часа, ($M \pm SD$, $n=3$), нг/мл

Длительность инкубации 1 час		Контроль	50 мкМ	100 мкМ	250 мкМ
	Селектин L, нг/мл	1,28 $\pm$ 0,08	0,66 $\pm$ 0,016****	0,57 $\pm$ 0,007****	0,85 $\pm$ 0,3****
	PSGL-1, нг/мл	0,98 $\pm$ 0,09	1,28 $\pm$ 0,12*	1,01 $\pm$ 0,009	1,45 $\pm$ 0,14**
Примечание – * – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$; **** – $p \leq 0,0001$					

Инкубация же ПМЯЛ с нитрозоглутатионом продемонстрировала повышение по сравнению с контролем практически во всех концентрациях и во всех временных интервалах (Таблица 31).

При таких же экспозициях и концентрациях тестируемых веществ уровень PSGL-1 повышался по сравнению с контролем при инкубации с пероксинитритом, и снижался практически во всех концентрациях при воздействии нитрозоглутатиона. При этом снижение концентрации PSGL-1 при низкой концентрации 50 мкМ было наиболее выражено.

Таблица 31 – Уровень селектина L и PSGL-1 в гомогенатах полиморфноядерных лейкоцитов при их совместной экспозиции с нитрозоглутатионом в течение 24 и 72 часов, ($M \pm SD$, $n=3$), нг/мл

Длительность инкубации 24 часа		Контроль	50 мкМ	100 мкМ	250 мкМ
	Селектин L, нг/мл	0,82 $\pm$ 0,03	0,57 $\pm$ 0,008*	0,87 $\pm$ 0,03	1,32 $\pm$ 0,079****
	PSGL-1, нг/мл	1,50 $\pm$ 0,12	0,34 $\pm$ 0,008***	1,62 $\pm$ 0,12	1,53 $\pm$ 0,12
Длительность инкубации 72 часа	Селектин L, г/мл	0,9 $\pm$ 0,038	5,79 $\pm$ 0,5****	1,62 $\pm$ 0,11	5,62 $\pm$ 0,5****
	PSGL-1, нг/мл	1,65 $\pm$ 0,13	0,34 $\pm$ 0,008****	1,45 $\pm$ 0,11	1,15 $\pm$ 0,09***
Примечание – * – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$; **** – $p \leq 0,0001$					

То есть, в применимых экспериментальных условиях мы отметили разнонаправленный ответ полиморфноядерных лейкоцитов на влияние пероксинитрита и нитрозоглутатиона на изменение уровня селектина L и PSGL-1 в гомогенатах лейкоцитов.

Моноциты кроме своей основной функции – фагоцитоза, обладают способностью превращаться в специфичные для конкретной ситуации макрофаги, способные выполнять функции, выходящие за рамки борьбы с инфекцией, например, вырабатывают Грелин, уменьшая разрастание сосудов. И способны функционировать как клеточный реостат, регулируя уровень лептина, и реваскуляризацию сосудов [85].

При аналогичных экспериментальных условиях в моноядерных лейкоцитах пероксинитрит вызвал разнонаправленные изменения: низкие его концентрации повышали уровень селектина L, а высокие по сравнению с контролем снижали. GSNO повышал абсолютное количество L-селектина во всех концентрациях (Таблица 32).

Таблица 32 – Уровень селектина L и PSGL-1 в гомогенатах моноядерных лейкоцитов при их совместной экспозиции с пероксинитритом в течение 1 часа, ($M \pm SD$, $n=3$), нг/мл

Длительность инкубации 1 час		Контроль	50 мкМ	100 мкМ	250 мкМ
	Селектин L, нг/мл	0,77 $\pm$ 0,07	1,66 $\pm$ 0,16****	0,75 $\pm$ 0,07	0,31 $\pm$ 0,3***
	PSGL-1, нг/мл	0,96 $\pm$ 0,091	0,7 $\pm$ 0,03***	1,38 $\pm$ 0,12**	1,07 $\pm$ 0,1
Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$; **** – $p \leq 0,0001$					

Для PSGL-1 обнаружилась несколько отличная от селектина L тенденция. Пероксинитрит в низких концентрациях, напротив, снижал уровень PSGL-1, в высоких повышал по сравнению с контролем. Инкубация с нитрозоглутатионом снижала уровень лиганда во всех концентрациях и во все сроки экспозиции (Таблица 33).

Таблица 33 – Уровень селектинаL и PSGL-1 в гомогенатах моноядерных лейкоцитов при их совместной экспозиции с нитрозоглутатионом в течение 24-х и 72-х часов, ($M \pm SD$, $n=3$), нг/мл

Длительность инкубации 24 часа		Контроль	50 мкМ	100 мкМ	250 мкМ
	Селектин L, нг/мл	0,84±0,03	6,66±0,63****	2,12±0,19**	6,3±0,6****
Длительность инкубации 72 часа	PSGL-1, нг/мл	1,2±0,11	0,84±0,08**	1,03±0,09	0,75±0,07***
	Селектин L, г/мл	0,89±0,038	5,3±0,5****	1,2±0,11	5,2±0,49****
	PSGL-1, нг/мл	1,5±0,14	0,74±0,07***	1,1±0,09**	0,55±0,05****
Примечание –*– статистически значимые отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$; **** – $p \leq 0,0001$					

Как уже отмечлось ранее, и селектин L, и PSGL-1 экспрессируются разными типами лейкоцитов и участвуют в различных стадиях трансмиграции лейкоцитов через эндотелий в очаги поражения. Как нейтрофилы, так и моноядерные лейкоциты способны захватываться L-селектином, путём связывания с активированным PSGL-1 [281, 282]. При этом, L-селектин усиливает воспалительные реакции путем связывания в основном с PSGL-1 и другими лигандами, также экспрессирующимися на циркулирующих нейтрофилах, что приводит к кластеризации лейкоцитов и так называемому, вторичному связыванию, или вторичному захвату [193, 194, 251]. Также, L-селектин взаимодействует и с E-селектином, вызывая медленное вращение, остановку и фиксацию, адгезию перекатывающихся лейкоцитов с последующим диапедезом.

Отмечено, что L селектин вызывает активацию сигнальных каскадов. Во-первых, связывание E-селектина с sLex на лейкоцитарном L-селектине вызывает активацию инфламмосомы и высвобождение миелоид-связанного белка 8/14 (MRP8/14, известного как SA100A8/9 или кальпротектин), который связывает толл-подобный рецептор 4 (TLR4). Во-вторых, происходят конформационные изменения в интегрине-2 LFA-1 (анг.: *Lymphocyte function-associated antigen*), и увеличивается их сродство с низкого до среднего состояния [165]. Это изменение опосредует медленное вращение в результате повышенной аффинности связывания LFA-1 к ICAM-1. То есть, LFA-1 в своей конформации связывается с

ICAM-1, экспрессируемым эндотелиальными клетками, что приводит к прочной остановке [299].

После прочной остановки лейкоциты выходят из сосудов в воспаленную ткань посредством процесса диапедеза, то есть клетки мигрируют сквозь эндотелий в воспаленную ткань. Таким образом, помимо своего участия во врожденных реакциях иммунитета, L-селектин действует как медиатор перемещения лейкоцитов между кровью и тканями/лимфой [84]. В венах с высоким эндотелием в лимфатических узлах экспрессируются гликопротеины, которые проходят постраницационные модификации-сульфатирование, и связываются с L-селектином на циркулирующих лейкоцитах, обеспечивая перенос лимфоцитов из крови в лимфатические узлы [231]. Этот перенос жизненно важен для реализации реакций иммунитета, поскольку позволяет циркулирующим лимфоцитам достигать антигенпрезентирующих клеток в лимфатической ткани.

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-нитроглутатиона – 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.

Можно предположить, что пероксинитрит в представленном исследовании выступил в двойной роли: оказал токсическое влияние на L-селектин, и сигнальную роль для PSGL-1. Полученные в данном эксперименте данные некоторым образом согласуются с данными литературы, которые демонстрировали как стимулирующее, так и ингибирующее действие данного агента на экзоцитоз внутриклеточных гранул нейтрофилов: в низких и умеренных концентрациях он вызывал активацию ступенчатого экзоцитоза нейтрофильных гранул, в то время как при повышенных концентрациях пероксинитрита, свыше 300 мкМ, отмечалось подавление экзоцитоза нейтрофильных гранул [51]. При этом механизмы

регуляции пероксинитритом экзоцитоза нейтрофильных гранул зависели от стадии воспаления и заключались в модификации структуры актиновых элементов цитоскелета клеток.

Говоря про эксперимент с добавлением донатора NO S-нитрозоглутатиона, можно предположить следующую схему развития событий. Известно, что NO, проникая внутрь лейкоцита, запускает каскад биохимических реакций, приводящий к снижению адгезии лейкоцитов к сосудистой стенке. Одним из механизмов такого действия может явиться как раз снижение PSGL-1 в гомогенатах лейкоцитов, которое мы получили в эксперименте. Кроме того, если брать во внимание результаты многофакторного регрессионного анализа, полученного в клиническом исследовании, именно синтазы оксида азота, нитротирозин и метаболиты NO являются ведущими факторами, влияющими на уровень универсального лиганда селектинов PSGL-1.

Резюме. 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интеграция результатов научных исследований в разных областях биомедицины позволяет создавать комплексные модели различных клеточных процессов. Современные аналитические методы дают возможность идентифицировать отдельные биомолекулы, что помогает выявлять биомаркеры патологии и состояния здоровья.

Все поверхности клеток в природе покрыты гликанами, являющимися компонентами гликоконъюгатов – гликопротеинов и гликолипидов. Эти сложные углевод-белковые комплексы представлены структурой, используемой для узнавания, клеточной адгезии и сигнализации. Рецепторы, взаимодействующие с этими структурно разнообразными лигандами, известны как углевод связывающие белки или лектины, термин, происходящий от латинского "legere", что означает читать или выбирать [120]. Лектины присутствовали в природе, начиная с более ранних ступеней филогенеза – микробов, растений, животных [304]. А в 1980-х годах прошлого столетия были открыты селектины – белки клеточной адгезии тогда же началось их активное изучение.

Являясь членами семейства кальций-зависимых углевод-связывающих белков, лектинов С-типа, селектины содержат ион кальция в лиганд-связывающем кармане и распознают изомерные формы тетрасахаридов sLeX и sLeA. Три представителя семейства: Р-селектин, Е-селектин и L-селектин, играют различные, взаимодополняющие роли в процессах воспаления, кроветворения и гемостаза, и в биологии эндотелиальных, гемопоэтических и опухолевых клеток.

Изучение свойств и функционирования селектинов является перспективным направлением в понимании как физиологических процессов: функционировании гемостатического каскада, протекания воспалительного, иммунного ответа и в заживлении ран, так и патологических: атерогенеза, тромбоза, ишемии и реперфузии, а также в понимании механизмов регуляции и, что немаловажно, в коррекции последних.

Наиболее перспективными направлениями в этой области в настоящее время

является обоснование терапевтического воздействия на селектины и прогресс в его продвижении. Показано, что взаимодействия селектинов с их физиологическими лигандами могут явиться точкой приложения для терапевтических вмешательств. Ингибируя такие взаимодействия, разрабатывая и применяя специфические антагонисты селектинов, можно добиться эффекта в лечении ряда заболеваний [331].

Параллельно с исследованием селектинов в настоящее время одним из изучаемых процессов в биохимии является нитрозилирующий стресс. Изменения в функционировании системы оксида азота ассоциировано с рядом заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых. Увеличение синтеза оксида азота провоцирует развитие патологии, также как и снижение [67]. В нормальных концентрациях оксид азота оказывает вазодилатирующий эффект и цитопротекторное действие, активируя адаптивные реакции, особенно в меняющихся условиях. Также его «заслугой» является способность ингибировать адгезию и агрегацию тромбоцитов, адгезию лейкоцитов, апоптоз, избыточную пролиферацию гладкомышечных клеток сосудистой стенки.

Избыточный синтез оксида азота нивелирует его положительные, перечисленные выше, эффекты, ингибирует активность клеточных ферментов, повреждает ДНК, нарушая рост и дифференцировку клеток, повышает проницаемость сосудистой стенки [62].

Известно, что свободные радикалы способны менять активность NO-синтаз, вызывая активацию индуцибельной и снижая активность конститутивных форм и дисбаланс их синтеза [52, 53]. Особую негативную роль при нитрозилирующем стрессе отводится токсичному продукту взаимодействия оксида азота с активными формами кислорода – пероксинитриту [57]. Пероксинитрит является мощным прооксидантом, угнетая активность ферментов и негативно влияя на метаболизм клетки. Так, подавление активности эндотелиальной NO-синтазы в клетках эндотелия может приводить к снижению синтеза оксида азота, снижению восприимчивости к нему тканей-мишеней и снижению эндотелий специфической вазодилатации [66]. Снижение активности гуанилатциклазы в гладких миоцитах сосудистой стенки приводит к снижению цГМФ, гипертрофии миокарда,

аутофагии, апоптозу и некрозу кардиомиоцитов, вазоконстрикции и увеличению жёсткости сосудов, снижению почечного кровотока, задержке натрия и жидкости в организме [31].

Патология периферических сосудов нижних конечностей занимает важное место в структуре общей заболеваемости. По некоторым оценкам, от неё страдает большое количество населения, по данным разных авторов, до 200-230 млн человек только с заболеваниями периферических артерий в мире имеется на сегодняшний день. И эта заболеваемость неуклонно прогрессирует год от года. Заболевания периферических сосудов могут неуклонно приводить к инвалидности и снижению качества жизни пациентов, а также к летальному исходу. Заболевания вен нижних конечностей, например, варикозное расширение, прогрессивно «молодеет», вследствие чего очень важны своевременная диагностика и раннее начало поддерживающего лечения.

Всё вышеизложенное явилось стимулом для планирования научного исследования, направленного на изучение уровня растворимой формы белков клеточной адгезии селектинов sP-, sE-, sL и их гликопротеинового лиганда PSGL-1, индуцибельной и эндотелиальной синтаз NO у пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей в зависимости от выраженности нитрозилирующего стресса и в эксперименте при моделировании условий НС и изменения синтеза NO.

На первом этапе исследования были определены и проанализированы уровни трёх селектинов, общего и универсального для них лиганда PSGL-1, индуцибельной и эндотелиальной синтаз оксида азота (II), а также показатели нитрозилирующего/окислительного стресса – стойкие конечные метаболиты оксида азота (II), нитротирозин, битирозин, пероксинитрит в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов: периферическим атеросклерозом нижних конечностей, артериальным тромбозом, варикозным расширением вен нижних конечностей и острым венозным тромбозом.

При проведении межгруппового анализа мы отметили, что уровень трех селектинов во всех изучаемых нами группах был ниже, чем в группе здоровых

доноров. Селектин sP при всех исследуемых патологиях был статистически значимо ниже, чем в контрольной группе. Максимальное снижение демонстрировал sP- селектин у пациентов с атеросклерозом. Значения селектина sE также демонстрировали тенденцию к снижению, но оно не явилось статистически значимым. Для селектина sL отмечалось статистически значимое снижение уровня у пациентов с атеросклерозом, варикозным расширением вен нижних конечностей и сотрым венозным тромбозом.

Сопоставление научной информации, полученной в разных исследованиях, демонстрирует наличие данных о повышении селектинов в сыворотке крови пациентов с различной патологией, тем не менее, информация об их снижении в сыворотке крови при отдельных заболеваниях также присутствует [33, 57, 144]. Повышение уровня селектинов, как правило, ассоциированы с острой фазой воспаления, и действием провоспалительных цитокинов, главным образом, ФНО- α . Также отмечено, что их уровень чаще повышается на ранних стадиях заболевания и ранних стадиях возникновения органной патологии. При этом, применение терапевтических вмешательств, направленных на подавление действия провоспалительных цитокинов, может привести к снижению уровня селектинов ниже нормальных значений по сравнению с контролем [26, 59].

Уровень гликопротеинового лиганда PSGL-1 демонстрировал повышение по сравнению с контролем во всех группах пациентов, статистически значимыми отличия были в группе пациентов с атеросклерозом. Кроме того, уровень PSGL-1 статистически значимо повышался у пациентов с атеросклерозом по сравнению с пациентами с варикозным расширением вен. Такое повышение может явиться следствием компенсаторной реакции на снижение концентрации селектинов.

iNO – синтаза не показала статистически значимых изменений при сравнении групп пациентов с контролем, тем не менее, её уровень повышался у пациентов с атеросклерозом, артериальным тромбозом, варикозным расширением вен. У пациентов с острым венозным тромбозом он был ниже, нежели в контрольной группе. Статистически значимые отличия были выявлены между группами пациентов атеросклероз – варикозная болезнь нижних конечностей и атеросклероз

– венозный тромбоз. Уровень эндотелиальной NO – синтазы повышался также у пациентов с атеросклерозом, артериальным тромбозом и варикозным расширением вен и несколько снижался у пациентов с острым венозным тромбозом, что вполне согласуется с данными литературы об отрицательном влиянии на неё продуктов нитрозилирующего стресса, в частности, показано, что пероксинитрит способен угнетать активность эндотелиальной NO синтазы через Rho киназы [269]. Как следствие окисления тетрагидробиоптерина под действием пероксинитрита отмечается диссоциация димера NOS, который не только не способен синтезировать NO, но и переходит на путь синтеза супероксид аниона [176].

Следующий показатель 3-нитротирозин повышался по сравнению с контролем, но не статистически значимо. Тем не менее, мы отметили его статистически значимое отличие между пациентами с артериальным и венозным тромбозом, в первом случае он был выше. Образование нитротирозина происходит как в сосудах и тканях миокарда здоровых людей, так и у пациентов с сердечно - сосудистыми заболеваниями. 3-НТ признан маркером НС, его сывороточный уровень повышается в ответ на действие пероксинитрита, и ассоциирован с сердечно-сосудистыми, онкологическими заболеваниями и с патологией почек.

На сегодняшний день имеются сведения о его негативном влиянии на ряд ферментов, такие, как Ca^{2+} -АТФазу, супероксиддисмутазу (СОД), тирозингидроксилазу и альдолазу А [134].

Также в научной литературе имеются сведения о повышении НТ в сыворотке крови после непродолжительного воздействия токсических факторов, в том числе, наркотических, и провоспалительных факторов [141, 166, 301, 342].

Стойкие конечные метаболиты оксида азота повышались статистически значимо по сравнению с контролем в сыворотке крови всех групп пациентов, максимальное повышение отмечалось у пациентов с артериальным и венозным тромбозом. Вследствие того, что они могут снова превращаться в оксид азота, их повышение может рассматриваться, как компенсаторный механизм на снижение оксида азота.

Следующий маркер НС – битирозин снижался в сыворотке крови пациентов

всех групп, но данные отличия не явились статистически значимыми. 3-НТ способен превращаться в битирозин под воздействием пероксинитрита [117].

Содержание пероксинитрита в сыворотке крови пациентов в нашем исследовании повышалось по сравнению с контрольными значениями, повышение у пациентов с артериальным тромбозом, варикозным расширением вен и острым венозным тромбозом явились статистически значимыми. Повышение пероксинитрита у пациентов с атеросклерозом не явилось таковым, и уровень битирозина у них также был ниже, чем в других группах пациентов.

При оценке суммарного содержания продуктов окислительной модификации белков было зафиксировано их статистически значимое повышение в сыворотке крови трех групп пациентов – с атеросклерозом, артериальным тромбозом и варикозным расширением вен. В группе пациентов с острым венозным тромбозом повышение не явилось статистически значимым. Отмечено, что метаболиты NO могут играть роль триггеров при модификации белков в условиях окислительного и карбонильного стресса, а также связанных с ними патологий [40]. В связи с этим, снижение селектинов в сыворотке крови пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей может объясняться и фактом окислительной модификации белковых молекул с их последующей деградацией.

При проведении более углубленного, детального внутригруппового анализа наблюдали следующие тенденции. В группе с атеросклерозом было отмечено статистически значимое снижение sP-селектина в обеих подгруппах пациентов, как с I-IIб, так III-IV стадиями хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротической этиологии по классификации А.В. Покровского-Фонтейна. sE и sL снижались статистически значимо во второй подгруппе. Индуцибельная NO-синтаза и PSGL-1 демонстрировали статистически значимый подъем уровня также у пациентов с III-IV стадиями хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротической этиологии. Из показателей HC/OC метаболиты NO повышались статистически значимо в обеих подгруппах, но максимальным было повышение у пациентов с I-IIб стадиями. Нитротирозин и пероксинитрит повышались в обеих группах, битирозин в группе пациентов с I-IIб стадией

заболевания. Но данные повышения не явились статистически значимыми. То есть, в целом можно отметить наибольшую выраженность НС у пациентов 2 подгруппы, с более тяжелыми стадиями хронической ишемии.

В группе пациентов с артериальными тромбоэмболическими осложнениями снижение уровня sP селектина явилось статистически значимым для подгрупп как с артериальным тромбозом, так и с артериальной тромбоэмболией. Мы отметили статистически значимое повышение уровня эндотелиальной синтазы оксида азота и PSGL-1 в подгруппе с тромбоэмболией. Кроме того, было зафиксировано повышение пероксинитрита и стойких метаболитов оксида азота в обеих подгруппах. 3-НТ имел тенденцию к повышению в обеих подгруппах, битирозин снижался у пациентов с артериальным тромбозом и повышался у пациентов с артериальной тромбоэмболией, но это не явилось статистически значимым.

При анализе данных, полученных в группе с варикозным расширением вен, мы отметили статистически значимое снижение уровня sP-селектина у пациентов у пациентов с клиническим классом ХЗВ С3-С6 и sL-селектина у пациентов у пациентов с клиническим классом ХЗВ С1-С2 по классификации СЕАР, повышение уровня iNO синтазы у пациентов с у пациентов с клиническим классом ХЗВ С1-С2, метаболитов оксида азота в обеих подгруппах пациентов.

Нитротирозин и битирозин повышался у пациентов с у пациентов с клиническим классом ХЗВ С1-С2 в большей степени, нежели у пациентов 2 подгруппы, но данные изменения не явились статистически значимыми. То есть при варикозном расширении вен мы отметили наиболее выраженные изменения показателей НС у пациентов с клиническим классом ХЗВ С1-С2.

Анализ данных пациентов с острым венозным тромбозом продемонстрировал статистически значимое снижение уровней sP в обеих подгруппах и sL селектина статистически значимо в подгруппе с дистальным тромбозом по сравнению с контролем и проксимальным тромбозом. Кроме того, в подгруппе с дистальным тромбозом статистически значимо снижались метаболиты NO, в отличие от всех других групп, но повышался 3-нитротирозин. Уровень пероксинитрита статистически значимо повышался в обеих подгруппах пациентов.

Итогом клинического блока исследований явился многофакторный регрессионный анализ, по результатам которого был выявлен ряд факторов, оказывающих влияние на уровень селектинов и их лиганд при разной патологии: это нитротирозин, iNOS, eNOS и стойкие метаболиты оксида азота. НТ выступил в качестве ведущего фактора при всех патологиях, кроме острого венозного тромбоза и для всех изучаемых нами селектинов и PSGL-1.

Так, ведущими факторами для селектина Р явился *нитротирозин* (ВБНК);

-для селектина Е: *iNOS*, нитротирозин, битирозин (атеросклероз), *нитротирозин* (артериальный тромбоз); *eNOS*, нитротирозин (ВБНК); eNOS (острый венозный тромбоз);

-для селектина L: *метаболиты NO*, iNOS, eNOS (атеросклероз); *нитротирозин* (артериальный тромбоз); *нитротирозин* (ВБНК), *метаболиты NO* (острый венозный тромбоз);

-для PSGL-1: *нитротирозин*, iNOS, eNOS, метаболиты NO (атеросклероз).

Таким образом, на первом этапе исследования мы получили положительный ответ на вопрос о наличии чувствительности белков клеточной адгезии селектинов sP, sE, sL и их универсального лиганда PSGL-1 к нитрозативному/оксидативному стрессу у пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, поскольку было продемонстрировано количественное изменение указанных белков параллельно с нарастанием продуктов нитрозилирующего и окислительного стресса.

Необходимо отметить, что такой показатель, как нитротирозин практически не продемонстрировал статистически значимых изменений. Они были найдены лишь при сравнении группы здоровых доноров и группы пациентов с патологией в целом, и было отмечено статистически значимое его повышение у пациентов с артериальным тромбозом по сравнению с пациентами с острым венозным тромбозом, и снижение у пациентов с дистальной локализацией тромба по сравнению с контролем, тем не менее, именно он явился одним из ведущих факторов, который оказал влияние на уровень селектинов. Другой показатель НС/ОС-битирозин не выявил статистически значимых отличий при сравнении

показателей здоровых доноров и пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей. Он имел тенденцию к повышению у пациентов с артериальной патологией и тенденцию к снижению у пациентов с венозной по сравнению с контролем, но данные отличия не явились статистически значимыми.

На следующем этапе мы провели эксперимент на первичной культуре человеческих эндотелиальных клеток HUVEC и фракционированных лейкоцитах *in vitro*, изучая влияние интермедиатов оксида азота (II): токсического агента пероксинитрита и эндогенного донатора NO S-нитрозоглутатиона на метаболическую активность клеток, относительное количество белков E и P селектинов, индуцибельной и эндотелиальной NO синтаз, а также показатели HС, аналогичные исследованным у пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей: стойкие метаболиты оксида азота, пероксинитрит, битирозин.

При инкубации эндотелиоцитов с пероксинитритом было отмечено, что параллельно со снижением метаболической активности клеток и нарастанием маркеров нитрозилирующего стресса – конечных метаболитов оксида азота, битирозина, пероксинитрита в лизатах клеток, наблюдалось изменение относительного количества изучаемых белков селектинов Р и Е и обеих синтаз оксида азота (II). Метаболическая активность эндотелиоцитов снижалась статистически значимо при малых сроках в 30-60 минут, и менялась разнонаправленно при 120-минутной инкубации. Метаболиты оксида азота демонстрировали нарастающий эффект, при 60-120 минутной инкубации были повышены в лизатах клеток при инкубации во всех концентрациях. При увеличении сроков экспозиции клеток с пероксинитритом также демонстрировал нарастание битирозина. И сам пероксинитрит нарастал в лизатах клеток при инкубации 60-120 минут.

При этом малые концентрации (10 мкМ) и непродолжительное воздействие пероксинитрита вызывало статистически значимое снижение относительного количества селектина Р; увеличении экспозиции до 60 минут привело к статистически значимому подъему его относительного количества под действием низких концентраций пероксинитрита (10 мкМ), еще более продолжительная

инкубация не дала статистически значимых изменений. Динамика изменения относительного количества Е селектина повторяла тенденцию Р-селектина. Кратковременная инкубация привела к статистически значимому снижению относительного количества белка, но при более высокой концентрации пероксинитрита (500 мкМ). Более продолжительные временные экспозиции привели к повышению относительного количества Е-селектина в концентрациях 10 и 50 мкМ соответственно.

Можно предположить, что кратковременное воздействие пероксинитрита оказывает цитотоксический эффект, повреждая структуру селектинов, вследствие чего его относительное количество в клеточных лизатах снижается. Дальнейшее воздействие, в течение 1 часа, в случае Р-селектина можно объяснить активацией и мобилизацией белка из гранул Вейбеля-Палладе, в последующие два часа снова начинает снижаться вследствие его способности к окислению цистеиновых групп белка.

При этом растворимые фрагменты селектинов также демонстрировали количественные изменения. Уровень sР-селектина повышался в кондиционной среде при инкубации в течение 60 минут при максимальной концентрации пероксинитрита в 500 мкМ. Для sЕ-селектина низкие концентрации при сроках 30-60 минут вызвали снижение уровня растворимого фрагмента в кондиционной среде, высокие - дозозависимое повышение в концентрациях пероксинитрита от 100 до 500 мкМ.

Обе изучаемые NO-синтазы продемонстрировали практически однонаправленную тенденцию: обнаружили повышение относительного количества при низких концентрациях пероксинитрита и непродолжительной инкубации, и при 120 минутной инкубации. Средняя продолжительность вызвала снижение относительного количества NO-синтаз.

Пероксинитрит, как было отмечено ранее, представляет собой одну из весьма активных и реакционноспособных АФА, образующихся в организме человека, время его существования в условиях физиологических значений рН организме исчисляется несколькими миллисекундами [289]. За это время, как уже

упоминалось ранее, он успевает превратиться в другие АФК и АФА [174]: в радикал диоксида азота (оксид азота (IV)) и гидроксильный радикал; далее диоксид азота может реагировать с оксидом азота с образованием триоксида диазота (оксид азота (III)); в свою очередь, нитрит-анион возникает в реакции оксида азота и гидроксильного радикала; а также в карбоксил-анион-радикал и радикал диоксида азота (в результате взаимодействия пероксинитрита с углекислым газом). Также часть пероксинитрита способна изомеризоваться в нитрат, и, кроме указанных путей превращения, он может вступать и в другие реакции: ПОЛ мембран, диффундировать сквозь плазматическую мембрану в виде пероксинитритной кислоты ONOOH , и в последующем модифицировать внутриклеточные белки: окислением боковых цепей аминокислотных остатков цистеина, метионина и тирозина; нитрозилированием аминокислотных остатков триптофана; окислением атомов металлов в молекулах металло- и гемпротеинов. Все перечисленные биохимические модификации прямо или опосредованно влияют на транскрипционные факторы и внутриклеточные сигнальные каскады, регулирующие клеточный метаболизм. На сегодняшний день известно достаточное количество транскрипционных факторов, действуя на которые АФА и АФК, меняется биохимическая сигнализация. Среди таких факторов большое значение принадлежит Nrf-1, Nrf-2, PGC-1 α , NF- κ B.

Nrf-1 (*Nuclear respiratory factor 1*) и Nrf-2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) – транскрипционные факторы, регулирующие энергетический обмен клетки непосредственно в митохондриях [108]. Также они способны влиять и на антиоксидантную систему [256]. Они способны регулировать транскрипцию генов цитозольных ферментов после транслокации в ядро, а митохондриальных генов – посредством влияния на митохондриальные факторы транскрипции mtTFA, mtTFB1, mtTFB2 (*mitochondrial transcription factor A, B1, B2*). Известно, что Nrf-1 регулирует активность дыхательной цепи и энергетический обмен, усиливая синтез белков цитохром С-оксидазы; белков протеасомных субъединиц C1, D1 и D7, обеспечивающих внутриклеточную деградацию белка, компонентов антиоксидантной системы: супероксиддисмутаза 1 типа, каталазы, гемоксигеназы

1 типа. Nrf-2 участвует в регуляции синтеза других антиоксидантных митохондриальных ферментов: глутатион-S-трансферазы, глутаматцистеинлигазы и сульфоредаксона, тиоредоксинредуктазы-1, NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы-1 и гемоксигеназы-1, являющихся компонентами антиоксидантной системы цитоплазмы клетки и ЭПС.

В неактивном состоянии Nrf-2 связан с белком Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), белка, ингибирующего транскрипционный фактор Nrf-2 [297].

В клетке он связан с актиновыми микрофиламентами, после транслокации в ядро регулирует клеточный цикл, предотвращая развитие М-фазы деления и оставляя клетки в синтетической S-фазе [99], то есть ограничивает клеточную пролиферацию и миграцию, а также поддерживает стабильность клеточных контактов. АФК и АФА участвуют в предварительном окислении или нитрозилировании по Cys-151 Keap1, вследствие чего происходит его деградация протеасомным протеолизом, и высвобождение Nrf2.

Еще один регулирующий белок, PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha*), воздействие которого обусловлено связыванием с ядерным рецептором PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*) и активацией через него множества транскрипционных факторов, в том числе Nrf-1 и Nrf-2. Несмотря на активацию фактора Nrf-2 и разрушение Keap1 со снижением его антипролиферативной функции, PGC-1 α считается белком, ограничивающим клеточную пролиферацию и миграцию [108, 206].

Высокие количества PGC-1 α приводят к увеличению синтеза белка межклеточных контактов Е-кадгерина, уменьшению NO-зависимой миграции эндотелиоцитов, он подавляет активность транскрипционного фактора NF-kB [276].

NF-kB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)— обладает антиапоптотическими и провоспалительными свойствами. В неактивном состоянии он связан с собственным ингибитором I κ B. Однако, фосфорилирование I κ B киназой IKK вызывает его протеасомную деградацию и приводит к высвобождению NF-kB [243]. Сама же IKK может активироваться

фосфорилированием различными киназами, например, Akt. После димеризации NF- κ B транслоцируется в ядро, где влияет на работу других транскрипционных факторов, например, активирует Nrf-1,2 и ингибирует совместно с Akt белок PGC-1 α , активирует синтез антиапоптотических белков, медиаторов воспаления, стимулирует пролиферацию и миграцию клеток [344].

Таким образом, достаточное количество транскрипционных факторов, под действием пероксинитрита могут обуславливать изменение митохондриальной активности, пролиферативной и миграционной способности клеток и влиять на синтез тех или иных белков через реализацию различных биохимических путей.

На следующем этапе изучалось действие S-нитрозоглутатиона на те же показатели: метаболическую активность HUVEC, относительное количество селектинов P и E в лизатах клеток, абсолютное количество sP-, sE- селектинов в кондиционной среде, относительное количество индуцибельной и эндотелиальной NO синтаз и показатели нитрозилирующего стресса.

Отмечалось снижение метаболической активности эндотелиоцитов при 24- и 72-часовой инкубации статистически значимо. Достоверно нарастало количество всех изучаемых показателей HC. Метаболиты оксида азота повышались как при 3-часовой, так и при 24- и 72-часовой экспозиции с GNOS, особенно в высоких концентрациях.

Битирозин статистически значимо повышался при всех сроках инкубации почти во всех концентрациях. Перксинитрит демонстрировал статистически значимое нарастание во всех временных экспозициях, особенно в концентрациях от 100 до 500 мкМ. Все вышеизложенные изменения свидетельствуют о развитии нитрозилирующего стресса, что согласуется с данными литературы [61].

S-нитрозоглутатион повлиял на относительное количество изучаемых нами белков следующим образом. Статистически значимые отличия были отмечены при инкубации 3 часа: 50 мкМ повышала, 24 часа - 10 мкМ повышала и 72 часа 10 мкМ повышала относительное количество P-селектина. Инкубация 3 и 72 часа в высоких концентрациях статистически значимо снижала относительное количество P-селектина.

Инкубация с НГ в течение 3 часов статистически значимо снизила относительное количество Е-селектина, инкубация 24 часа снизила его во всех концентрациях, но данное снижение не явилось статистически значимым. Инкубация с НГ 72 часа не повлияла на относительное количество Е-селектина.

Инкубация HUVEC с НГ по-разному повлияла на относительное количество синтаз оксида азота в клетках. Уровень индуцибельной NO-синтазы повысился статистически значимо при совместной инкубации в течение 3 часов в концентрации 250 и 500 мкМ, 24 часов - в концентрации 10 мкМ и 72 часов - в концентрации 10 мкМ.

Уровень эндотелиальной синтазы NO снизился статистически значимо при инкубации с НГ 3 часа в концентрациях 10, 100, 250 мкМ, при инкубации 24 часа – во всех концентрациях, 72-часовая инкубация не вызвала статистически значимых изменений.

При этом в кондиционной среде концентрации 50 и 250 мкМ вызвали статистически значимое повышение растворимой формы Р селектина, 24-часовая инкубация снизила его во всех концентрациях. 72-часовая инкубация не повлияла на уровень sP селектина. Уровень растворимой формы sE селектина снижался в концентрациях 100 мкМ при 3 часах инкубации и 10, 500 мкМ при 72 –часовой инкубации.

Таким образом, экспозиция человеческих эндотелиальных клеток с S-нитрозоглутатионом в различных концентрациях меняет метаболизм HUVEC: повышается синтез NO, развивается нитрозилирующий стресс, о чем свидетельствует повышение его маркеров. Относительное количество молекулы Е-селектина также меняется: низкие концентрации донатора приводят к его повышению относительно контроля, высокие – к снижению.

По данным литературы известно, что S-нитрозоглутатион, являясь эндогенной молекулой-носителем NO, может оказывать свое влияние на метаболизм клетки различными способами. Во-первых, может повышать S-нитрозилирование белков по остаткам цистеина, нарушая их функции [238]. Также он может диссоциировать вне клетки; а образовавшийся NO способен попасть в

клетку с участием поверхностной протеиндисульфид-изомеразы, локализующейся на цитоплазматической мембране [350]. Наконец, диссоциировавшая от GSNO нитрозогруппа может транспортироваться с образованием нитрозоцистеина и также попасть в клетку, реализуя в ней изменения биохимического сигналинга [61].

Высокие концентрации S-нитрозоглутатиона (от 100 до 500 мкМ) вызывают снижение относительного количества Р-селектина при всех временных экспозициях, что может свидетельствовать о влиянии оксида азота на Р-селектин.

Необходимо отметить, что в экспериментальном исследовании было установлено, что отдельные концентрации изучаемых агентов приводили к изменению относительного и абсолютного количества селектинов как в лизатах эндотелиоцитов, так и в кондиционной среде. Так, при 30-минутном воздействии пероксинитрита в концентрации 500 мкМ снижалось относительное количество Е селектина в лизатах, и повышалось абсолютное количество в кондиционной среде. При часовом воздействии пероксинитрита в концентрации 50 мкМ повышалось относительное количество Е-селектина, но снижалось абсолютное.

Трехчасовая инкубация HUVEC с GSNO в концентрации 50 мкМ привела к повышению относительного количества Р-селектина в лизатах клеток и снижению абсолютного его количества в кондиционной среде; при 24-х часовой экспозиции в концентрациях 10, 50, 500 мкМ снизила относительное, но повысила абсолютное количество селектина Е. Именно данные концентрации агента можно считать наиболее значимыми во влиянии на селектины.

Таким образом, обобщая результаты исследования, можно отметить, что система оксида азота влияет на белки межклеточной адгезии селектины Р, Е, L и их универсальный лиганд PSGL-1. Интермедиаты метаболома оксида азота повышают и снижают изучаемые белки 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 P, E, 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДНФГ – альдегиддинитрофенилгидразоны

АФА – активные формы азота

АФК – активные формы кислорода

БТ – битирозин

ВБНК – варикозная болезнь нижних конечностей

ВНЛ – внеклеточные нейтрофильные ловушки

ГБВ – глубокая бедренная вена

ЗББВ – задняя большеберцовая вена

ИЛ-1 β – интерлейкин-1 β

КДНФГ – кетондинитрофенилгидразоны

МБВ – малоберцовые вены

МПВ – малая подкожная вена

МЯЛ – моноядерные лейкоциты

НГ – нитрозоглутатион

НС – нитрозативный, нитрозилирующий, нитрозильный стресс

НТ – нитротирозин

ОБВ – общая бедренная вена

ОКС – острый коронарный синдром

ПБВ – поверхностная бедренная вена

ПМЯЛ – полиморфноядерные лейкоциты

ПОБ – перекисное окисление белков

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СД – сахарный диабет

СПС – сафенопоплитеальное соустье

СФС – сафенофemorальное соустье

ТМБ – тетраметилбензидина гидрохлорид

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФНО- α – фактор некроза опухоли- α

ХВН – хроническая венозная недостаточность

ХЗВ – хронические заболевания вен

ХИНК – хроническая ишемия нижних конечностей, проявляющаяся перемежающейся хромотой

ХИУПК – хроническая ишемия, угрожающая потерей конечностей

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ЭГ – эндотелиальный гликокаликс

ЭД – эндотелиальная дисфункция

ЭК – эндотелиальные клетки

ADAMTS-13 – (англ.: a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13), протеаза, расщепляющая фактор фон Виллебранда

aFGF – (англ.: acidic fibroblast growth factor), фактор роста фибробластов

Akt – (англ.: Protein kinase B (PKB)), семейство из трёх серин/треонин-специфичных протеинкиназ

AP-1 – (англ.: Activator protein 1), активаторный белок, транскрипционный фактор, регулирующий экспрессию генов, контролирует дифференциацию, пролиферацию и апоптоз клеток

ATF-2 – (англ.: Activating transcription factor 2), активирующий фактор транскрипции 2

BCL2 – (англ.: Apoptosis regulator Bcl-2), внутриклеточный регулятор апоптоза

BSA (англ.: Bovine serum albumin, бычий сывороточный альбумин

CAMs – (англ.: cell adhesion molecules), молекулы клеточной адгезии

CCL2 – воспалительный хемокин, (моноцитарный хемоаттрактантный белок-1, MCP-1), хемокин (C-C мотив) лиганд 2

CCL5 – воспалительный хемокин, (RANTES), хемокин (C-C мотив) лиганд 5

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

CXCR2 – (англ.: Interleukin 8 receptor, beta, a chemokine receptor), хемокиновый рецептор интерлейкина 8

DPBS – (англ.: Dulbecco's phosphate-buffered saline), фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко

ECGM – (англ.: Endothelial Cell Growth medium), среда для выращивания эндотелиальных клеток

EGF – (англ.: epidermal growth factor) – эпидермальный фактор роста

ELAM – (англ.: Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1), молекула эндотелиально-лейкоцитарной адгезии 1

ERG – (англ.: ETS-related gene), протоонкоген, член семейства ETS-факторов транскрипции

ERK – (англ.: extracellular signal-regulated kinases), внеклеточные сигнал-регулируемые киназы

ERM – (англ.: ezrin, radixin, moesin), белки эзрин, радиксин, моезин

ETS – (англ.: erythroblast transformation-specific), одно из крупнейших семейств транскрипционных факторов, участвующих в клеточной дифференцировке, контроле клеточного цикла, миграции и пролиферации клеток, апоптозе

FGF – (англ.: fibroblast growth factor) фактор роста фибробластов

Flot – (англ.: flotillin 2), флотилин-2

FOXO1 – (англ.: Fork head box protein O1), фактор транскрипции, который играет важную роль в регуляции глюконеогенеза и гликогенолиза посредством передачи сигналов инсулина

GALNT4 – (англ.: N-acetyl galactosaminyl transferase 4), ген, кодирующий одноименный белок

GLUT (ГЛЮТ) – (англ.: Glucosetransporter), транспортер глюкозы

GPCR – (англ.: G protein-coupled receptors), рецептор, сопряжённый с G – белком

GSNO – S-нитрозоглутатион

HIF-1 α – (англ.: Hypoxia-inducible factor 1-alpha), фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа

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

ICAM-1 – (англ.: Inter-Cellular Adhesion Molecule 1), молекула клеточной адгезии 1

IGF –1 (англ.: insulin-like growth factor 1), инсулиноподобный фактор роста

IKK–киназы (англ.: IκB-киназа), комплекс ферментов, участвующий в клеточном ответе на воспаление

IL 1β – (англ.: interleukin), интерлейкин 1β

ITAM – (англ.: immunoreceptor tyrosine-based activation motif), мотив активации иммунорецептора, консервативен и состоит из 4-х аминокислот

JNK – (англ.: c-Jun N-terminal kinases), c-Jun N-концевые киназы

Keap1 – (англ.: Kelch-like ECH-associated protein 1), ингибитор транскрипционного фактора Nrf-2

LECAM2 – (англ.: leukocyte-endothelial cell adhesion molecule), лейкоцитарно-эндотелиальная молекула клеточной адгезии

LFA - 1 – (англ.: Lymphocyte function-associated antigen 1), интегрин αLβ2

LOXL1 – (англ.: Lysyl oxidase homolog 1), лизилоксидаза

MIP-1α и MIP-1β – (англ.: macrophage inflammatory proteins), макрофагальные воспалительные белки

MRP8/14 – (англ.: Myeloid-related protein), миелоид-связанные белки, регулируют воспаление в сосудах; служат маркером острого коронарного синдрома

mtTFA, mtTFB1, mtTFB2 – (англ.: mitochondrial transcription factor A, B1, B2), митохондриальные факторы транскрипции

МАРКр38 – (англ.: mitogen-activated protein kinase), митоген-активируемая протеинкиназа

ММР – (англ.: matrix metalloproteinases), матриксные протеиназы

МСР-1 – (англ.: Monocyte chemoattractant protein-1), белок хемоаттрактант моноцитов 1

NELIN – (англ.: nexilin-like protein), ген, кодирующий одноимённый белок

NET – (англ.: neutrophil extracellular traps, внеклеточные ловушки нейтрофилов

NFAT – (англ.: Nuclear factor of activated T-cells), ядерный фактор активации Т-клеток

NF-κB – (англ.: Nuclear factor kappa B), ядерный транскрипционный фактор «каппа-би»

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

Nrf-1 – (англ.: Nuclear respiratory factor 1) и Nrf-2 (англ.: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) – транскрипционные факторы, ответственные за регуляцию энергетического метаболизма в митохондриях

NT – (англ.: nitrotyrosine) нитротирозин

PAR-1 – (англ.: protease-activated receptors), протеазо-активируемый рецептор 1, участвует в регуляции тромботического ответа

PDGF – (англ.: Platelet-derived growth factor) — тромбоцитарный фактор роста

PFKFB3 – (англ.: phosphofructo-2-kinase/ fructose-2,6-bisphosphatase 3), фосфофрукто-2-киназа/фруктозо-2,6-бисфосфатаза-3

PGC-1 α – (англ.: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α)

PI3K – (англ.: phosphatidylinositol-3 kinase), фосфатидил-инозитол-3-киназа

PKC – (англ.: protein kinase C), протеинкиназа C

PPAR- γ – (англ.: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 alpha), рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом

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

RAS-RAF-MEK-ERK – сигнальный путь митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), биохимический путь, регулирующий клеточный цикл, пролиферацию и миграцию клетки

RUNX1 – (англ.: Runt-related transcription factor), фактор транскрипции, регулирующий дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток в зрелые клетки крови, также известный как белок острого миелоидного лейкоза 1

SYK Tyrosine-protein kinase – (англ.: spleen tyrosine kinase), тирозинкиназа селезенки

TAGLIN – (англ.: transgelin, SM22 α), ген, кодирующий актин-связывающий белок (трансгелин), который экспрессируется в клетках мезенхимного происхождения

TGF- β – (англ.: Transforming growth factor beta, TGF-beta), трансформирующий фактор роста β

TIMP1, TIMP2 – (англ.: tissue inhibitors of metalloproteinases), ингибитор тканевых

металлопротеиназ

TLR4 – (англ.: Toll-likereceptor 4), ключевой активатор врожденного иммунного ответа

TNF- α – (англ.: tumor necrosis factor), фактор некроза опухоли альфа

TPSB2 – (англ.: Tryptase beta-2), фермент триптаза, продукт гена TPSB2

UCP2 – (англ.: uncoupling protein 2, разобщающий белок 2

VEGF – (англ.: vascular endothelial growth factor), фактор роста эндотелия сосудов

VNTR – (англ.: variable number of tandem repeats), участок в геноме, где короткая нуклеотидная последовательность организована как тандемный повтор

vWF – (англ.: Von Willebrand factor, фактор фон Виллебранда)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаленихина, Ю.В. Пероксинитрит: токсический агент и сигнальная молекула (обзор) / Ю.В. Абаленихина, О.В. Космачевская, А.Ф. Топунов. – Текст (визуальный): непосредственный // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56, № 6. – С. 523-535.
2. Алуханян, О.А. Показатели антиоксидантной системы крови в дифференциальной диагностике облитерирующего атеросклероза и облитерирующего тромбангиита нижних конечностей / О.А. Алуханян, Ю.Г. Абрамов, С.П. Корочанская. – Текст: непосредственный // Ангиология и сосудистая терапия. – 2007. – Т. 13, № 1. – С. 25-30.
3. Апоптоз в сосудистой патологии: настоящее и будущее / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Э.А.Климентова [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2020. – Т. 28, № 3. – С. 79-87.
4. Арапова, А.И. Лизосомальный цистеиновый протеолиз мышечных тканей в условиях изменения синтеза оксида азота: дис. ... канд. мед. наук : специальность 03.01.04 – Биохимия / А.И. Арапова. – Рязань, 2017. – 191 с. – Текст (визуальный): непосредственный.
5. Аршинов, А.В. Значение инфекции и воспаления в развитии атеросклероза. История проблемы, механизмы прогрессирования / А.В. Аршинов, Ю.А. Гончарова, И.Г. Маслова. – Текст (визуальный): непосредственный // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2015. – Т.1, № 61. – С. 7-12.
6. Атеросклероз: гипотезы и теории / Э.А. Юрьева, В.С. Сухоруков, Е.С. Воздвиженская, Н.Н. Новикова. – Текст (визуальный): непосредственный // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2014. – Т. 59, № 3. – С. 6-16.
7. Биомаркеры апоптоза и пролиферации клеток в диагностике прогрессирования атеросклероза в различных сосудистых бассейнах / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Э.А. Климентова [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Российский медико-биологический вестник им. академика

И.П. Павлова. – 2022. – Т. 30, № 2. – С. 243-252. DOI: 10.17816/PAVLOVJ88938.

8. Бурлев, В.А. Прогностическое значение содержания L-селектина в крови при оценке эффективности программы ЭКО/ИКСИ у больных с трубным фактором бесплодия / В.А. Бурлев, Н.А. Ильясова, А.С. Онищенко. – Текст (визуальный): непосредственный // Проблемы репродукции. – 2014. – № 2. – С. 59-65.

9. Варикозная болезнь: на пороге открытия причины? / И.А. Золотухин, О.Я. Порембская, М.А. Сметанина [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Вестник РАМН. – 2020. – Т. 75, № 1. – С. 36-45.

10. Васина, Л.В. Функциональная гетерогенность эндотелия (обзор) / Л.В. Васина, Т.Д. Власов, Н.Н. Петрищев. – Текст (визуальный): непосредственный // Артериальная гипертензия. – 2017. – Т. 23, № 2. – С. 88-102. DOI:10.18705/1607-419X-2017-23-2-88-1.

11. Васина, Л.В. Эндотелиальная дисфункция и ее основные маркеры / Л.В. Васина, Н.Н. Петрищев, Т.Д. Власов. – Текст (визуальный): непосредственный // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2017. – Т. 16, № 1. – С. 4-15. DOI: 10.24884/1682-6655-2017-16-1-4-15.

12. Власов, Т.Д. Артериальные и венозные тромбозы. Всегда ли применима триада Вирхова? Регионарное кровообращение и микроциркуляция / Т.Д. Власов, С.М. Яшин. – Текст (визуальный): непосредственный // Regional blood circulation and microcirculation. – 2022. – Т. 21, № 1. – С. 78-86.

13. Власов, Т.Д. Эндотелиальная дисфункция: от частного к общему. Возврат к «старой парадигме»? Регионарное кровообращение и микроциркуляция / Т.Д. Власов, И.И. Нестерович, Д.А. Шиманьски. – Текст (визуальный): непосредственный // Regional hemodynamics and microcirculation. – 2019. – Т. 18, № 2. – С. 19-27. DOI: 10.24884/1682-6655-2019-18-2-19-27.

14. Влияние донора оксида азота S-нитрозоглутатиона на экспрессию конститутивного андростанового рецептора / Ю.В. Абаленихина, Е.А. Судакова, А.А. Сеидкулиева [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2022. – Т. 58, № 5. – С. 410-420.

15. Возникновение и эволюция сигнальной функции оксида азота / К.Б.

Шумаев, О.В. Космачевская, Э.И. Насыбуллина, А.Ф. Топунов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + ME`22. Весенняя сессия.- Москва, 2022.- С. 247-251.

16. Войнов, В.А. Патолофизиология сердца и сосудов : учебное пособие / В.А. Войнов. – М.: Издательский дом БИНОМ, 2017. – 208 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

17. Галагудза, М.М. Индуцибельная NO-синтаза как фармакологическая мишень противовоспалительной терапии: надежда не потеряна? / М.М. Галагудза, Ю.П. Бельский, Н.В. Бельская. – Текст (визуальный): непосредственный // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. – 2023. – Т. 38, № 1. – С. 13-20. DOI:10.29001/2073-8552-2023-38-1-13-20.

18. Гетерогенность клеток эндотелия / М.К. Живень, И.С. Захарова, А.И. Шевченко [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19, № 4–2. – С. 104-112.

19. Голубева, М.Г. Роль Р-селектина в развитии нарушений гемостаза при COVID-19 / М.Г. Голубева. – Текст (визуальный): непосредственный // Успехи современной биологии. – 2022. – Т. 142, № 2. – С. 175-183. DOI: 10.31857/S004213242202003X.

20. Гуманова, Н.Г. Оксид азота, его циркулирующие метаболиты NOx и их роль в функционировании человеческого организма и прогнозе риска сердечно-сосудистой смерти (часть I) / Н.Г. Гуманова. – Текст (визуальный): непосредственный // Профилактическая медицина. – 2021. – Т. 24, № 9. – С. 102-109.

21. Гуманова, Н.Г. Оксид азота и его циркулирующие метаболиты NOx, их роль в функционировании человеческого организма и прогнозе риска сердечно-сосудистой смерти (Часть II) / Н.Г. Гуманова. – Текст (визуальный): непосредственный // Профилактическая медицина. – 2021. – Т. 24, № 10. – С. 119-125.

22. Дедух, Н.В. Адгезия. Боль / Н.В. Дедух. – Текст (визуальный):

непосредственный // Суставы. Позвоночник. – 2011. – № 4 – С. 44-46.

23. Дорофиенко, Н.Н. Роль сосудистого эндотелия в организме и универсальные механизмы изменения его активности (Обзор литературы) / Н.Н. Дорофиенко. – Текст (визуальный): непосредственный // Бюллетень. – 2018. – № 68. – С. 107-116.

24. Дубинина, Е.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения / Е.Е. Дубинина. – Текст (визуальный): непосредственный // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т.41, № 1. – С. 24-26.

25. Затевахин, И.И. Острая артериальная непроходимость. Клиническая классификация и тактика лечения / И.И. Затевахин, М.Ш. Цициашвили, В.Н. Золкин. - Текст (визуальный): непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия.- 2002.- №2.- С.74-77.

26. Значение молекул адгезии для оценки эффективности терапии язвенного колита и болезни Крона / А.И. Парфенов, О.Н. Болдырева, И.Н. Ручкина [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Терапевтический архив. – 2014. – Т. 86, № 2. – С. 32-38.

27. Зубаирова, Л.Д. Патогенетические подходы к исследованию маркёров венозного тромбоза / Л.Д. Зубаирова, И.Г. Мустафин, Р.М. Набиуллина. – Текст (визуальный): непосредственный // Казанский медицинский журнал. – 2013. – Vol. 94, № 5. – Р. 685-691.

28. 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 (визуальный): непосредственный // Молекулярная медицина. – 2022. – Т. 20, № 2. – С. 39-45. DOI:10.29296/24999490-2022-02-06.

29. Карпищенко, А.И. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике / А.И. Карпищенко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 762 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

30. Климентова, Э.А. Комплексная оценка маркеров апоптоза, пролиферации клеток и эндотелиальной дисфункции и способ их коррекции у пациентов с

атеросклерозом периферических артерий: дис. ... д-ра мед. наук : специальность 3.1.15 – Сердечно-сосудистая хирургия / Э.А. Климентова. – Рязань, 2022. – 245 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

31. Кобалава, Ж.Д. Значение сигнального пути “оксид азота – растворимая гуанилатциклаза – циклический гуанозинмонофосфат” в патогенезе сердечной недостаточности и поиске новых терапевтических мишеней / Ж.Д. Кобалава, П.В.Лазарев. – Текст (визуальный): непосредственный // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2021. – Т. 20, №6. – С. 3035.

32. Косолапов, В.П. Анализ высокой сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности взрослого населения как медико-социальной проблемы и поиск путей ее решения / В.П. Косолапов, М.В. Ярмонова. – Текст (визуальный): непосредственный // Уральский медицинский журнал. – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 58-64. DOI: 10.52420/2071-5943-2021-20-1-58-64.

33. Кравченко Ю.А. Роль селективов в формировании и прогрессировании неалкогольной жировой болезни печени: дис. ... канд. мед. наук : специальность 3.1.18 – Внутренние болезни. – Ставрополь, 2024. – 151 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

34. Кудлаева, А.М. Активность лизосомальных цистеиновых протеиназ и пермеабилзация лизосомальной мембраны при *in vitro* воздействии L-карнитина и модуляторов генерации оксида азота: дис. ... канд. биол. наук : специальность 03.01.04 – Биохимия / А.М. Кудлаева. – Рязань, 2018. – 141 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

35. Леонченко, С.В. Генетические факторы венозного тромбоза в свете персонифицированного подхода к лечению пациентов с венозными тромбозомболическими осложнениями / С.В. Леонченко. – Текст (визуальный): непосредственный // Наука молодых (EruditioJuvenium). – 2020. – Т. 8, № 1. – С. 116-123. DOI:10.23888/HMJ202081116-123.

36. Лобанова, Н.Ю. Особенности течения и диагностики субклинического атеросклероза у пациентов с гипертонической болезнью и факторами сердечно-сосудистого риска: дис. ... канд. мед. наук: специальность 3.1.20 – Кардиология /

Н.Ю. Лобанова. – Пермь, 2022. – 146 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

37. Лобачев, В.Л. Химия пероксинитрита. Кинетика и механизмы реакций / В.Л. Лобачев, Е.С. Рудаков. – Текст (визуальный): непосредственный // Успехи химии. – 2006. – Т. 75, № 5. – С. 422-444.

38. Максименко, А.В. Функции и состояние эндотелиального гликокаликса в норме и патологии / А.В. Максименко, А.Д. Турашев. – Текст (визуальный): непосредственный // Атеросклероз и дислипидемии. – 2011. – Т. 2, № 3. – С. 5-17.

39. Маргиев, О.И. Роль L-аргинина как донора оксида азота и перспективы его применения: обзор литературы / О.И. Маргиев, М.Т.Маргиева. – Текст (визуальный): непосредственный // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. – 2024. – Т.39, № 3. – С. 34-40.

40. Метаболиты оксида азота как триггеры модификации биомолекул при окислительном и карбонильном стрессе / К.Б. Шумаев, О.В. Космачевская, Э.И. Насыбулина [и др.]. - Текст (визуальный): непосредственный // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : тезисы докладов международной научной конференции, Четырнадцатого съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. - Минск, 2020.- С. 139.

41. Метельская, В.А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова. – Текст (визуальный): непосредственный // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 6. – С. 15-18.

42. Мжаванадзе, Н.Д. Гемостатическое звено эндотелиальной дисфункции при развитии осложнений у пациентов с периферическим атеросклерозом: дис. ... д-ра мед. наук : специальность 3.1.15 – Сердечно-сосудистая хирургия / Н.Д. Мжаванадзе. – Рязань, 2022. – 217 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

43. Национальные рекомендации по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей / А.В. Троицкий, А.В. Чупин, А.В. Покровский [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2013.– Т. 19, № 2. – С. 1-75.

44. Новиков, Д.К. Клеточные методы иммунодиагностики / Д.К. Новиков,

В.И. Новикова. – Минск, 1979. – 222 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

45. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов, И.Г. Поротов. – Текст (визуальный): непосредственный // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т.41, № 1. – С. 24-26.

46. Окислительный стресс и модификация белков крови у детей с воспалительными заболеваниями кишечника / Е.Г. Сорокина, Т.В. Радыгина, В.П. Реутов [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Российский педиатрический журнал. – 2023. – Т. 26, № 4. – С. 252-257. DOI:10.46563/1560-9561-2023-26-4-252-257.

47. Он первый сказал: «Эндотелий»!– Текст (визуальный): непосредственный // Артериальная гипертензия. – 2008. – Т. 14, №4. – С. 408-410.

48. Острая ишемия конечностей. Кодирование по Международной Статистической классификации Болезней и проблем, связанных со здоровьем: I74. Возрастная группа: Взрослые Дети. Клинические рекомендации. – 2024. – Текст (визуальный): непосредственный.

49. Оценка уровня селектинов и их лигандаPSGL-1 у пациентов с острым венозным тромбозом / Н.В. Короткова, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2022. – Т. 25, № 5. – С. 3-9.DOI:10.29296/25877313-2022-05-00.

50. Патент №2524667 РФ, МПК G01N 33/52. Способ комплексной оценки содержания продуктов ОМБ в тканях и биологических жидкостях : №2013102618/15 : заявл.21.01.2013 : опубл.27.07.2014 / Фомина М.А. (RU), Абаленихина Ю.В. (RU), Фомина Н.В. (RU), Терентьев А.А. (RU); Патентообладатели: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU). – Бюл. № 21. – 8 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

51. Пероксинитрит регулирует экзоцитоз гранул нейтрофилов / М. Н. Стародубцева, Е. И. Коваленко, Н. И. Егоренков [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Биологические мембраны. – 2010. – Т.27, № 6, – С. 459–470.

52. Пожилова, Е.В. Активные формы кислорода в физиологии и патологии клетки / Е.В. Пожилова, В.Е. Новиков, О.С. Левченкова. – Текст (визуальный): непосредственный // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2015. – Т. 14, № 2. – С.13-22.

53. Пожилова, Е.В. Синтаза оксида азота и эндогенный оксид азота в физиологии и патологии клетки / Е.В. Пожилова, В.Е. Новиков. – Текст (визуальный): непосредственный // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2015. – Т. 14, № 4. – С.35-41.

54. Показатели митохондриального пути апоптоза в сыворотке крови и гомогенате сосудистой стенки у пациентов с атеросклерозом периферических артерий / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Э.А. Климентова [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2021. – Т. 9, № 2. – С. 226-234.

55. Покровский, А.В. Классификация СЕАР и её значимость для отечественной флебологии / А.В. Покровский, С.В. Сапелкин. – Текст (визуальный): непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2006. – Т. 12, № 1. – С.65-74.

56. Продукция растворимого Р-селектина тромбоцитами и эндотелиальными клетками / А.В. Семенов, Ю.А. Романов, С.А. Локтионова [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Биохимия. – 1999. – Т. 64, № 11. – С. 1570-1582.

57. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В.И. Черний, Ю.М. Колесник [и др.]. – Донецк : Изд. Заславский А. Ю., 2009. – 262 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

58. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

59. Роль молекул адгезии для оценки эффективности стандартной и

биологической терапии больных с болезнью Крона / Л.Б. Лазебник, О.Н. Болдырева, А.И. Парфенов [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // ЭиКГ. – 2013. – №3.

60. S-нитрозоглутатион в высоких концентрациях (75:1) ингибирует кислородсвязывающую функцию оксигемоглобина человека / О.В. Путинцева, Е.А. Калаева, В.Г. Артюхов, Е.В. Гостева. – Текст (визуальный): непосредственный // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2018. – № 4. – С. 66-72.

61. S-нитрозоглутатион как индуктор нитрозативного стресса и апоптоза / О.Н. Сучкова, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин. – Текст (визуальный): непосредственный // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2024. – № 9. – С. 50-56.

62. Соловьева, А.Г. Роль оксида азота в процессах свободнорадикального окисления / А.Г. Соловьева. – Текст (визуальный): непосредственный // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2016. – № 1(53). – С. 228-233.

63. Соотношение между содержанием кортизола и уровнем свободнорадикального окисления у лиц с героиновой наркоманией с учетом гендерных различий / М.А. Шатырко, Б.В. Изаровский, С.В. Голодный [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. – 2015. – Т. 115, № 4. – С. 69-72.

64. Сучков, И.А. Коррекция эндотелиальной дисфункции в комплексном лечении больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей: дис. ... д-ра мед. наук : специальность 14.01.26 – Сердечно-сосудистая хирургия / И.А. Сучков. – Рязань, 2014. – 327 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

65. Тарасова, Г.Н. Патогенетическая роль растворимых молекул межклеточной адгезии при воспалительных заболеваниях кишечника / Г.Н. Тарасова, А.А. Яковлев, Н.В. Добаева. – Текст (визуальный): непосредственный // Фарматека. – 2019. – № 2. – С. 31-36.

66. Титов, В.Ю. Возможный механизм образования нитрита и нитрилатных нитрозосоединений в плазме крови при воспалительных процессах / В.Ю. Титов.

– Текст (визуальный): непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 157, № 4. – С. 479-482.

67. Ударцева, Т.П. Недостаточность аргинина и ее возможные механизмы / Т.П. Ударцева, Е.Д. Даленов. – Текст (визуальный): непосредственный // Вестник КазНМУ. – 2013. – № 5(1). – С. 255-257.

68. Участие молекул адгезии в изменении взаимодействий клеток при развитии метастазирования / Н.Н. Шевлюк, Л.В. Халикова, А.А. Халиков [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Гены & Клетки. – 2020. – Т. 15, № 4. – С. 27-32.

69. Фомина, М.А. Лизосомальные цистеиновые протеиназы в условиях окислительного стресса: дис. ... д-ра мед. наук : специальность 03.01.04 – Биохимия / М.А. Фомина. – Рязань, 2018. – 280 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

70. Хайбуллина, З.Р. Сравнительная оценка уровня факторов воспаления при периферическом и коронарном атеросклерозе / З.Р. Хайбуллина, С.Д. Абдулаева, Ж.Г. Собиров. – Текст (визуальный): непосредственный // Вестник Новосибирского государственного педагогического университета. – 2015. – Т. 4, № 26. – С. 68-76.

71. Хлопин, Н.Г. Общебиологические и экспериментальные основы гистологии / Н.Г. Хлопин. – Ленинград: Издательство Академии наук СССР, 1946. – 491 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

72. Цитокины про- и противовоспалительной субпопуляций макрофагов и их значение в формировании и стабилизации атеросклеротических бляшек в сонных артериях человека В.С. Шишкина, М.А. Челомбитко, Ю.Е. Ефремова [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Кардиологический вестник. – 2014. – Т. 9, № 4. – С. 62-70.

73. Черняк, А.А. Уровень Р-селектина, интегрина- $\beta 3$ в плазме крови у пациентов с ишемической болезнью сердца после чрескожного коронарного вмешательства / А.А. Черняк. – Текст (визуальный): непосредственный // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2024. – Т. 22, № 5. – С. 451-457.

74. Шадрина, А.С. Молекулярные механизмы развития варикозной болезни нижних конечностей / А.С. Шадрина, И.А. Золотухин, М.Л. Филипенко. – Текст (визуальный): непосредственный // Флебология. – 2017. – Т. 11, № 2. – С. 71-75.

75. Ших, Е.В. Эндотелиальная дисфункция и регуляторные пептиды / Е.В. Ших, Е.В. Реброва. – Текст (визуальный): непосредственный // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2023. – Т. 16, № 2. – С. 205-210. DOI: 10.17116/kardio202316021205.

76. Шумаев, К.Б. Роль динитрозильных комплексов железа в защите биомолекул и клеточных структур от окислительного, нитрозативного и карбонильного стрессов : дис. д-ра биол. наук : 03.01.04 / К.Б. Шумаев.- Москва, 2010.- 332 с. - Текст (визуальный): непосредственный.

77. Эндотелиальная дисфункция при артериальной гипертензии / Г.И. Сторожаков, Н.М. Федотова, Г.С. Верещагина [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Лечебное дело. – 2005. – № 4. – С. 58-64.

78. Эндотелий – структурная основа системы кровообращения: история проблемы / Ю.Л. Шевченко, П.Е. Асташев, С.А. Матвеев, В.Г. Гудымович. – Текст (визуальный): непосредственный // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 9-15.

79. Эндотелий. Функция и дисфункция / З.А. Lupinskaya, А.Г. Зарифьян, Т.Ц. Гурович, С.Г. Шлейфер. – Б.: КРСУ, 2008 – 373 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

80. Юпатов, Е.Ю. Современное понимание функции и дисфункции эндотелия сосудов. Обзор литературы / Е.Ю. Юпатов, Т.Е. Курманбаев, Ю.Л. Тимошкова. – Текст (визуальный): непосредственный // Русский медицинский журнал. – 2022. – № 3. – С. 20-23.

81. Ягода, А.В. Особенности адгезивной функции эндотелия при различных клинических вариантах первичного пролапса митрального клапана / А.В. Ягода, Н.Н. Гладких, Л.Н. Гладких. – Текст (визуальный): непосредственный // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2016. – Т. 15, № 1. – С. 45-50.

82. Ярилина, А.А. Роль молекул адгезии в патогенезе ревматоидного артрита

/ А.А. Ярилина. – Текст (визуальный): непосредственный // Научно-практическая ревматология. – 2000. – № 1. – С. 61-68.

83. A juxta-membrane amino acid sequence of P-selectin glycoprotein ligand-1 is involved in moesin binding and ezrin/radixin/moesin-directed targeting at the trailing edge of migrating lymphocytes / J.M. Serrador, A. Urzainqui, J.L. Alonso-Lebrero [et al.]. – Text: visual // European Journal of Immunology. – 2002. – Vol. 32. – P. 1560-1566.

84. A major class of L-selectin ligands is eliminated in mice deficient in two sulfotransferases expressed in high endothelial venules / K. Uchimura, J.M. Gauguet, M.S. Singer [et al.]. – Text: visual // Nature Immunology. – 2005. – Vol. 6. – P. 1105-1113.

85. A monocyteptin-angiogenesis pathway critical for repair post-infection / R.M. Kratofil, H.B. Shim, R. Shim [et al.]. – Text: visual // Nature. – 2022. – Vol. 609. – P. 166-173. DOI: 10.1038/s41586-022-05044-x.

86. A proinflammatory monocyte response is associated with myocardial injury and impaired functional outcome in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: monocytes and myocardial infarction / A.M. van der Laan, A. Hirsch, L.F. Robbers [et al.]. – Text: visual // American Heart Journal. – 2012. – Vol. 163, № 57. – P. 65-69. DOI: 10.1016/j.ahj.2011.09.002.

87. A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding / D. Sako, K.M. Comess, K.M. Barone [et al.]. – Text: visual // Cell. – 1995. – Vol. 83. – P. 323-331. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90173-6.

88. A targetable pathway in neutrophils mitigates both arterial and venous thrombosis / L. Nayak, D.R. Sweet, A. Thomas [et al.]. – Text: visual // Science Translational Medicine. – 2022. – Vol. 14. – P. 660. DOI: 10.1126/scitranslmed.abj7465.

89. Abadier, M. P-selectin glycoprotein ligand-1 in T cells / M. Abadier, K. Ley. – Text: visual // Vascular biology. – 2017. – Vol. 24, № 3. – P. 265-273.

90. Abdelhalim, M.A. The effects of size and period of administration of gold nanoparticles on rheological parameters of blood plasma of rats over a wide range of shear rates: in vivo / M.A. Abdelhalim. – Text: visual // Lipids Health Disease. – 2011.

– Vol. 10. – P. 191.

91. Acetyl-CoA carboxylase 1 regulates endothelial cell migration by shifting the phospholipid composition / D.K. Glatzel, A. Koeberle, H. Pein [et al.]. – Text: visual // Journal of Lipid Research. – 2018. – Vol. 59, № 2. – P. 298-311. DOI: 10.1194/jlr.M080101.

92. Adhesion molecules and their ligands in patients with varicose veins / R. Kalinin, I. Suchkov, N. Korotkova, N. Mzhavanadze. – Text: visual // Phlebology. Article Reuse Guidelines. – 2022. – Vol. 37, № 2. – P. 273-276. DOI:10.1177/02683555221110363.

93. Advanced Oxidation Protein Products and Carbonylated Proteins as Biomarkers of Oxidative Stress in Selected Atherosclerosis-Mediated Diseases / B. Grysczyńska, D. Formanowicz, M. Budzyń [et al.]. – Text: visual // Biomed Research International. – 2017. – P. 4975264. DOI: 10.1155/2017/4975264.

94. Amado, R. Dytiroline: in vitro production and characterization / R. Amado, R. Aeschbach, H. Neukom. – Text : visual // Methods Enzymol. – 1984. – Vol. 107. – P. 377-388.

95. Angiogenesis assays: problems and pitfalls / R. Auerbach, N. Akhtar, R.L. Lewis [et al.]. – Text: visual // Cancer and Metastasis Reviews. – 2000. – Vol. 19, № 1. – P. 167-172.

96. Ashwell, G. The role of surface carbohydrates in liver recognition and the transport of circulating glycoproteins / G. Ashwell, A.G. Modell. – Text: visual // Advances in enzymology and related areas of molecular biology. – 1974. – Vol. 41. – P. 99-128. DOI: 10.1002/9780470122860.ch3.

97. Autoregulation and Autoinhibition of the Main NO Synthase Isoforms (Brief Review) / N.A. Popova, S.K. Soodaeva, I.A. Klimanov [et al.]. – Text: visual // Sovremennye Tekhnologii Medicine. – 2023. – Vol. 15, № 3. – P. 53-59. DOI: 10.17691/stm2023.15.3.06.

98. Badimon, L. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture / L. Badimon, G. Vilahur. – Text: visual // Journal of International Medicine. – 2014. – Vol. 276, №6. – P. 618-632.

99. Baird, L. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway / L. Baird, M. Yamamoto. – Text: visual // *Molecular and Cell Biology*. – 2020. – Vol. 40, № 13. – P. e00099-20. DOI: 10.1128/MCB.00099-20.
100. Bandoowala, M. 3-Nitrotyrosine: a versatile oxidative stress biomarker for major neurodegenerative diseases / M. Bandoowala, P. Sengupta. – Text: visual // *International Journal of Neuroscience*. – 2020. – Vol. 130, № 10. – P. 1047-1062. DOI: 10.1080/00207454.2020.1713776.
101. Bartesaghi, S. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration / S. Bartesaghi, R. Radi. – Text: visual // *Redox Biology*. – 2018. – Vol. 14. – P. 618-625. DOI: 10.1016/j.redox.2017.09.009.
102. Bartesaghi, S. Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments / S. Bartesaghi. – Text: visual // *Amino Acids*. – 2007. – Vol. 32, № 4. – P. 501-515.
103. Baum, O. Expression of neuronal NO synthase α - and β -isoforms in skeletal muscle of mice / O. Baum. – Text: visual // *Biochemistry Journal*. – 2024. – Vol. 481, № 9. – P. 601-613. DOI: 10.1042/BCJ20230458.
104. Baumann, T. Analysis of close associations of uropod associated proteins in human T-cells using the proximity ligation assay / T. Baumann, S. Affentranger, V. Niggli. – Text: visual // *Peer Journal*. – 2013. – Vol. 1. – P. e186. DOI: 10.7717/peerj.186.
105. Beckman, J.S. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and ugly / J.S. Beckman, W.H. Koppenol. – Text: visual // *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. – 1996. – Vol. 271, № 5(1). – P. 1424-1437. DOI:10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424.
106. Belyaev, A.V. Molecular mechanisms of catch bonds and their implications for platelet hemostasis / A.V. Belyaev, I.V. Fedotova. – Text: visual // *Biophysical Reviews*. – 2023. – Vol. 15. – P. 1233-1256.
107. Besson-Bard, A. New insights into nitric oxide signaling in plants / A. Besson-Bard, A. Pugin, D. Wendehenne. – Text: visual // *Annual Review of Plant Biology*. – 2008. – Vol. 59. – P. 21-39.
108. Beyond repression of Nrf2: An update on Keap1 / A. Kopacz, D. Kloska, H.J.

Forman, A. Jozkowicz. – Text: visual // Free Radical Biology Medicine. – 2020. – Vol. 157. – P. 63-74. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.023.

109. Binding free energy calculations on E-selectin complexes with sLe(x) oligosaccharide analogs / P.A. Barra, A.J. Ribeiro, M.J. Ramos [et al.]. – Text: visual // Chemical Biology & Drug Design. – 2017. – Vol. 89. – P. 114-123.

110. Binding of glycosulfopeptides to P-selectin requires stereospecific contributions of individual tyrosine sulfate and sugar residues / A. Leppanen, S.P. White, J. Helin [et al.]. – Text: visual // Journal of biological chemistry. – 2000. – Vol. 275. – P. 39569-39578.

111. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration / G. Ferrer-Sueta, N. Campolo, M. Trujillo [et al.]. – Text: visual // Chemical Reviews. – 2018. – Vol. 118, № 3. – P. 1338-1408. DOI:10.1021/acs.chemrev.7b00568.

112. Biomechanics of leukocyte rolling / P. Sundd, M.K. Pospieszalska, L.S. Cheung [et al.]. – Text: visual // Biorheology. – 2011. – Vol. 48, № 1. – P. 1-35. DOI: 10.3233/BIR-2011-0579.

113. Biosynthesis of L-selectin ligands: Sulfation of sialyl Lewis x-related oligosaccharides by a family of GlcNAc-6-sulfotransferases / K.G. Bowman, B.N. Cook, C.L. de Graenried, C.R. Bertozzi. – Text: visual // Biochemistry. – 2001. – Vol. 40. – P. 5382-5391.

114. Biphasic Force-Regulated Phosphorylation Site Exposure and Unligation of ERM Bound with PSGL-1: A Novel Insight into PSGL-1 Signaling via Steered Molecular Dynamics Simulations / J. Feng, Y. Zhang, Q. Li [et al.]. – Text: visual // International Journal Molecular Science. – 2020. – Vol. 21, № 19. – P. 7064. DOI: 10.3390/ijms21197064.

115. Bizik, F. On the Flexibility of the Lewis x, Lewis a, Sialyl Lewis x, and Sialyl Lewis a Oligosaccharides. Conformational Analysis in Solution by Molecular Modelling / F. Bizik, I. Tvaroska. – Text: visual // Chemical Papers. – 1996. – Vol. 50. – P. 84-96.

116. Blocking a vicious cycle nNOS/peroxynitrite/AMPK by S-nitrosoglutathione: implication for stroke therapy / M. Khan, T.S. Dhammu, F. Matsuda, [et al.]. – Text: visual // BMC Neurosci. – 2015. – Vol. 15. – P. 16-42.

117. Boer, T.R. Peroxynitrite-mediated dimerization of 3-nitrotyrosine: unique chemistry along the spectrum of peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine / T.R. Boer, R.I. Palomino, P.K. Mascharak. – Text: visual // *Med One*. – 2019. – Vol. 4. – P. e190003.DOI: 10.20900/mo.20190003.

118. Bohle, D.S. Tetramethylammonium salts of Superoxide and Peroxynitrite / D.S. Bohle, E.S. Sagan. – Text: visual // *Inorganic Syntheses*. – 2004. – Vol. 36. DOI:10.1002/0471653683.ch1.

119. Botts, S.R. Dysfunctional Vascular Endothelium as a Driver of Atherosclerosis: Emerging Insights Into Pathogenesis and Treatment / S.R. Botts, J.E. Fish, K.L. Howe. – Text: visual // *Frontiers in Pharmacology*. – 2021. – Vol. 22, № 12. – P. 787541.

120. Boyd, W.C. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins) / W.C. Boyd, E. Shapleigh. – Text: visual // *Science*. – 1954. – Vol. 119. – P. 419.

121. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford. – Text : visual // *Anal Biochemistry*. – 1976. – Vol. 7, № 72. – P. 248-54.

122. Bredt, D.S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology / D.S. Bredt. – Text: visual // *Free Radical Research*. – 1999. – Vol. 31, № 6. – P. 577-596.DOI: 10.1080/10715769900301161.

123. Brill, A. Multiple Facets of Venous Thrombosis / A. Brill. – Text: visual // *International Journal of Molecular Science*. – 2021. – Vol. 22, № 8. – P. 3853.DOI: 10.3390/ijms22083853.

124. Bronchial asthma as a cardiovascular risk factor: A prospective observational study / M. Kreslová, O. Kirchnerová, D. Rajdl [et al.]. – Text: visual // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10. – P. 2614. DOI: 10.3390/biomedicines10102614.

125. Broniowska, A.K. S-Nitrosoglutathione / A.K. Broniowska, A.R. Diers, N. Hogg. – Text: visual // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. – 2013. – Vol. 1830, № 5. – P. 3173-3181.

126. Cahill, P.A. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health / P.A. Cahill, E.M. Redmond. – Text: visual // *Atherosclerosis*. – 2016. – Vol. 248. – P. 97-109. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.

127. Cappenberg, A. Selectin-mediated signaling-shedding light on the regulation of integrin activity in neutrophils / A. Cappenberg, M. Kardell, A. Zarbock. – Text: visual // *Cells*. – 2022. – Vol. 11. – P. 1310-1328. DOI: 10.3390/cells11081310.

128. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death / I.N. Mungrue, R. Gros, X. You [et al.]. – Text: visual // *Journal of Clinical Investigation*. – 2002. – Vol. 109, № 6. – P. 735-743.

129. Carmeliet, P. Gene targeting and gene transfer studies of the plasminogen/plasmin system: Implications in thrombosis, hemostasis, neointima formation, and atherosclerosis / P. Carmeliet, D. Collen. – Text: visual // *FASEB Journal*. – 1995. – Vol. 9, № 10. – P. 934-938.

130. Chemokine binding to PSGL-1 is controlled by O-glycosylation and tyrosine sulfation / C.K. Goth, A.Y. Mehta, A.M. McQuillan [et al.]. – Text: visual // *Cell Chemical Biology*. – 2023. – Vol. 30, № 8. – P. 893-905. DOI: 10.1016/j.chembiol.2023.06.013.

131. Coleman, H.A. Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease / H.A. Coleman, T. Mare, H.C. Parkington. – Text: visual // *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. – 2004. – Vol. 31, № 9. – P. 641-649.

132. Compression stockings attenuate the expression of proteins associated with vascular damage in human varicose veins / G. Moñux, M. Serna-Soto, F. Plá-Sanchez [et al.]. – Text: visual // *Journal of vascular surgery. Venous and lymphatic disorders*. – 2021. – Vol. 9, № 2. – P. 428-434. DOI: 10.1016/j.jvsv.2020.05.020.

133. Conformation of LexTetrasaccharide, Free in Solution and Bound to E-, P-, and L-Selectin / L. Poppe, G.S. Brown, J.S. Philo [et al.]. – Text: visual // *The Journal of the American Chemical Society*. – 1997. – Vol. 119. – P. 1727-1736.

134. Cooley, R.B. Structural basis of improved second-generation 3-nitro-tyrosine tRNA synthetases / R.B. Cooley. – Text: visual // *Biochemistry*. – 2014. – Vol. 53, № 12. – P. 1916-1924.

135. Cooperative PSGL-1 and CXCR2 signaling in neutrophils promotes deep vein thrombosis in mice / T. Yago, Z. Liu, J. Ahamed, R.P. McEver. – Text: visual // *Blood*.

– 2018. – Vol. 132, № 13. – P. 1426-1437. DOI: 10.1182/blood-2018-05-850859.

136. Crampton, S.P. Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) / S.P. Crampton, J. Davis, C.C.W. Hughes. – Text: visual // Journal of Visualized Experiments. – 2007. – № 3. – C.183.

137. Cytokine-activated endothelial cells internalize E-selectin into a lysosomal compartment of vesiculotubular shape. A tubulin-driven process / T.W. Kuijpers, M. Raleigh, T. Kavanagh [et al.]. – Text: visual // J Immunol. 1994 May 15;152(10):5060-9.

138. C-Type Lectins / R.D. Cummings, E. Chiffoleau, Y. van Kooyk [et al.]. – Text: visual // Essentials of Glycobiology [Internet]. – 4th edition. – Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2022. – Chapter 34. DOI: 10.1101/glycobiology.4e.34.

139. Dang, X. Transcriptional regulation of mouse L-selectin / X. Dang, N.A. Raffler, K. Ley. – Text: visual // Biochimica et Biophysica Acta. – 2009. – Vol. 1789. – P. 146-152. doi: 10.1016/j.bbagr.2008.10.004.

140. Darland, D.C. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival / D.C. Darland, L.J. Massingham, S.R. Smith. – Text: visual // Developmental Biology. – 2003. – Vol. 264, № 1. – P. 275-288.

141. Darwish, R.S. Nitrotyrosine as an oxidative stress marker: evidence for involvement in neurologic outcome in human traumatic brain injury / R.S. Darwish, N. Amiridze, B. Aarabi. – Text: visual // Journal of Trauma and Acute Care Surgery. – 2007. – Vol. 63, № 2. – P. 439-442.

142. Das Evcimen, N. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes / N. Das Evcimen, G.L. King. – Text: visual // Pharmacology Research. – 2007. – Vol. 55, № 6. – P. 498-510.

143. Decrease in fibrin content of venous thrombi in selectin-deficient mice / V.V. Sullivan, A.E. Hawley, D.M. Farris [et al.]. – Text: visual // Journal of Surgery Research. – 2003. – Vol. 109. – P. 1-7.

144. Decreased levels of L-selectin and platelet-endothelial cell adhesion molecule-

1 in children with autism spectrum disorder / S.C. Arslan, F.N. Arslan, H. Altun [et al.]. – Text: visual // International Journal of Developmental Neuroscience. – 2024. – Vol. 84, № 8. – P. 867-876. doi: 10.1002/jdn.10377.

145. DeFilippis, A.P. Atherothrombotic factors and atherosclerotic cardiovascular events: the multi-ethnic study of atherosclerosis / A.P. DeFilippis, P.J. Trainor, G. Thanassoulis. – Text: visual // European Heart Journal. – 2022. – Vol. 43, № 10. – P. 971-981. DOI: 10.1093/eurheartj/ehab600.

146. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver [et al.]. – Text: visual // Methods in enzymology. – 1990. – Vol. 186. – P. 464-478.

147. Differential regulation of human and murine P-selectin expression and function in vivo / Z. Liu, J.J. Miner, T. Yago [et al.]. – Text: visual // Journal of Experimental Medicine. – 2010. – Vol. 207, № 13. – P. 2975-2987. DOI:org/10.1084/jem.20101545.

148. Dimerization of a selectin and its ligand stabilizes cell rolling and enhances tether strength inshear flow / V. Ramachandran, T. Yago, T.K. Epperson [et al.]. – Text: visual // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. – Vol. 98. – P. 10166-10171.

149. Duffett, L. Deep Venous Thrombosis / L. Duffett. – Text: visual // Annual of International Medicine. – 2022. – Vol. 175, № 9. – P. 129-144. DOI: 10.7326/AITC202209200.

150. E2F-1 regulates nuclear factor-kappa B activity and cell adhesion: potential antiinflammatory activity of the transcription factor E2F-1 / M. Chen, C. Capps, J.T. Willerson, P. Zoldhelyi. – Text: visual // Circulation. – 2002. – № 106. – P. 2707-2713.

151. El-Awady, M.S. Agmatine ameliorates atherosclerosis progression and endothelial dysfunction in high cholesterol-fed rabbits / M.S. El-Awady, G.M. Suddek. – Text: visual // Journal of Pharmacology. – 2014. – Vol. 66, №6. – P. 835-843. DOI: 10.1111/jphp.12204.

152. Elevated markers of endothelial dysfunction predict type 2 diabetes mellitus in middle-aged men and women from the general population / B. Thorand, J. Baumert, L. Chambless [et al.]. – Text: visual // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.

– 2006. – Vol. 26. – P. 398-405.

153. Endothelial cell metabolism / G. Eelen, P. de Zeeuw, L. Treps [et al.]. – Text: visual // *Physiological Review*. – 2018. – Vol. 98, № 1. – P. 53-58. DOI: 10.1152/physrev.00001.2017.

154. Endothelial cell activating antibodies in COVID-19 / H. Shi, Y. Zuo, S. Navaz [et al.]. – Text: visual // *Arthritis Rheumatology*. – 2022. – Vol. 74. – P. 1132-1138. doi: 10.1002/art.42094.

155. Endothelial Dysfunction and Diabetic Cardiomyopathy / M. Wang, Y. Li, S. Li, J. Lv. – Text: visual // *Frontiers Endocrinology (Lausanne)*. – 2022. – Vol. 7, № 13. – P. 851941. doi: 10.3389/fendo.2022.851941.

156. Endothelial Dysfunction Driven by Hypoxia – The Influence of Oxygen Deficiency on NO Bioavailability / A. Janaszak-Jasiecka, A. Siekierzycka, A. Płoska [et al.]. – Text: visual // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11, № 7. – P. 982.

157. Endothelial dysfunction due to eNOS uncoupling: molecular mechanisms as potential therapeutic targets / A. Janaszak-Jasiecka, A. Płoska, J.M. Wierońska [et al.]. – Text: visual // *Cellular & Molecular Biology Letters*. – 2023. – Vol. 28. – P. 21.

158. Endothelial E-selectin potentiates neovascularization via endothelial progenitor cell-dependent and independent mechanisms / Y. Nishiwaki, M. Yoshida, H. Iwaguro [et al.]. – Text: visual // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2007. – Vol. 27, № 3. – P. 512-518.

159. Endothelial function in coronary arterioles from pigs with early-stage coronary disease induced by high fat, high cholesterol-diet: effect of exercise / K.K. Henderson, R.T. James, W. E. James Rush [et al.]. – Text: visual // *Journal of Applied Physiology*. – 2004. – Vol. 97, № 3. – P. 1159-1168.

160. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins / M.P. Bevilacqua, S. Stengelin, M.A.Jr. Gimbrone, B. Seed. – Text: visual // *Science (New York NY)*. – 1989. – № 243. – P. 1160-1165.

161. Endothelial PFKFB3 plays a critical role in angiogenesis / Y. Xu, X. An, X. Guo [et al.]. – Text: visual // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2014.

– Vol. 34, № 6. – P. 1231-1239. DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.303041.

162. E-selectin expression in experimental models of inflammation in mice / U. Henseleit, K. Steinbrink, M. Goebeler [et al.]. – Text: visual // Journal of Pathology. – 1996. – № 3. – P. 17-25.

163. E-selectin in vascular pathophysiology / J. Zhang, S. Huang, Z. Zhu [et al.]. – Text: visual // Frontiers Immunology. – 2024. – Vol. 19, № 15. – P. 1401399.

164. E-selectin ligand complexes adopt an extended high-affinity conformation / R.C. Preston, R.P. Jakob, F.P. Binder [et al.]. – Text: visual // Journal of Molecular Cell Biology. – 2016. – Vol. 8, № 1. – P. 62-72.

165. E-selectin-mediated rapid NLRP3 inflammasome activation regulates S100A8/S100A9 release from neutrophils via transient gasdermin D pore formation / M. Pruenster, R. Immler, J. Roth [et al.]. – Text: visual // Nature Immunology. – 2023. – Vol. 24. – P. 2021-2031.

166. Establishment of a sandwich ELISA using commercial antibody for plasma or serum 3-nitrotyrosine (3NT). Elevation in inflammatory diseases and complementary between 3NT and myeloperoxidase / Y.C. Sun, P.Y. Chang, K.C. Tsao [et al.]. – Text: visual // Clinica Chimica Acta. – 2007. – Vol. 378, № 1. – P. 175-180.

167. Evaluation of admission levels of P, E and L selectins as predictors for thrombosis in hospitalized COVID-19 patients / M.M. Watany, S. Abdou, R. Elkolaly [et al.]. – Text: visual // Clinical and experimental medicine. – 2022. – Vol. 22, №4. – P. 567-575.

168. Evaluation of serum levels of soluble (s)L- and (s)P-selectins in endometrial cancer / D. Majchrzak-Baczmańska, K. Pogoda, A. Oblekowska [et al.]. – Text: visual // Ginekologia Polska. – 2023. DOI: 10.5603/GP.a2023.0056.

169. Evolution of Coagulation and Platelet Activation Markers After Transcatheter Edge-to-Edge Mitral Valve Repair / S. Hadjadj, J. Beaudoin, F. Beaupré [et al.]. – Text: visual // Journal of Clinical Medicine. – 2025. – Vol. 14, № 3. – P. 831.

170. Expression and significance of NELIN and SM22 α in varicose vein tissue / S. Chen, S. Qin, M. Wang, S. Zhang. – Text: visual // Experimental and Therapeutic Medicine. – 2015. – Vol. 9, № 3. – P. 845-849.

171. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin / D. Sako, X.J. Chang, K.M. Barone [et al.]. – Text: visual // Cell. – 1993. – Vol. 75. – P. 1179-1186. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90327-m.

172. Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells molecule-1 on human neutrophils, monocytes and their precursors / D. Hollenbaugh, N. Mischel-Petty, C.P. Edwards [et al.]. – Text: visual // Journal of Experimental Medicine. – 1995. – Vol.182. – P. 33-40.

173. Extracellular MRP8/14 is a regulator of $\beta 2$ integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion / M. Pruenster, A.R.M. Kurz, K.J. Chung [et al.]. – Text: visual // Nature Communications. – 2015. – Vol. 20, № 6. – P. 6915. DOI: 10.1038/ncomms7915.

174. Fluorescence-Based Tool To Detect Endogenous Peroxynitrite in M1-Polarized Murine J774.2 Macrophages / M. Weber, A.B. Mackenzie, S.D. Bull, T.D. James. – Text: visual // Analytical Chemistry. – 2018. – Vol. 90, № 17. – P. 10621-10627. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b03035.

175. Forkhead box C2 promoter variant c.-512C>T is associated with increased susceptibility to chronic venous diseases / S. Surendran, A. Girijamma, R. Nair [et al.]. – Text: visual // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 3. – P. e90682.

176. Förstermann, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease / U. Förstermann– Text: visual // Pflugers Archive. – 2010. – Vol. 459, № 6. – P. 923-939.

177. FOXO1 regulates L-Selectin and a network of human T cell homing molecules downstream of phosphatidylinositol 3-kinase / S. Fabre, F. Carrette, J. Chen [et al.]. – Text: visual // Journal of Immunology. – 2008. – Vol. 181. – P. 2980-2989. DOI: 10.4049/jimmunol.181.5.2980.

178. Fukuda, M.N. An integrated view of L-selectin and trophinin function in human embryo implantation / M.N. Fukuda, K. Sugihara. – Text: visual // Journal of Obstetrics and Gynaecological Research. – 2008. – Vol. 34. – P. 129-136.

179. Furchogott, R.F. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine / R.F. Furchogott, J.V. Zawadzki. – Text: visual // Nature. – 1980. – Vol. 288. – P. 373-376.

180. GALNT4 primes monocytes adhesion and transmigration by regulating O-

Glycosylation of PSGL-1 in atherosclerosis / Z. Ye, H. Guo, L. Wang [et al.]. – Text: visual // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. – 2022. – Vol. 165. – P. 54-63.doi: 10.1016/j.yjmcc.2021.12.012.

181. Gatenby, R.A. Why do cancers have high aerobic glycolysis? / R.A. Gatenby, R.J. Gillies. – Text: visual // Nature Reviews Cancer. – 2004. – Vol. 4, № 11. – P. 891-899. DOI: 10.1038/nrc1478.

182. Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1 / M.L. Watson, S.F. Kingsmore, G.I. Johnston [et al.]. – Text: visual // Journal of Experimental Medicine. – 1990. – Vol. 172. – P. 263-272.

183. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated / K. Ley, C. Laudanna, M.I. Cybulsky, S. Nourshargh. – Text: visual // National Review of Immunology. – 2007. – Vol. 7. – P. 678-689.

184. Glycan Bound to the Selectin Low Affinity State Engages Glu-88 to Stabilize the High Affinity State under Force / P. Mehta-D'souza, A.G. Klopocki, V. Oganessian [et al.]. – Text: visual // Journal of biological chemistry. – 2017. – Vol. 292. – P. 2510-2518.

185. Goshchynsky, V. Pathophysiological and pathomorphological aspects of relapse of varicose veins after endovascular laser vein coagulation / V. Goshchynsky, B. Migenko, S. Riabokon. – Text: visual // Wiadomos ci Lekarskie. – 2020. – Vol. 73, № 11. – P. 2468-2475.

186. High expression of P-selectin induces neutrophil extracellular traps via the PSGL-1/Syk/Ca²⁺/PAD4 pathway to exacerbate acute pancreatitis / Q. Xu, M. Shi, L.Ding [et.al.]. – Text: visual // Frontiers Immunology. – 2023. – Vol. 28, № 14. – P. 1265344.DOI: 10.3389/fimmu.2023.1265344.

187. High glucose-treated macrophages augment E-selectin expression in endothelial cells / T.C. Chen, S.J. Chien, H.C. Kuo [et al.]. – Text: visual // The Journal of Biological Chemistry. – 2011. – Vol. 286, № 29. – P. 25564-25573.DOI:10.1074/jbc.M111.230540.

188. Hossain, M. Inhibition of nitric oxide synthesis enhances leukocyte rolling and adhesion in human microvasculature / M. Hossain, S.M. Qadri, L. Liu. – Text: visual //

The Journal of Inflammation. – 2012. – Vol. 9, № 1. – P. 28.

189. Huang, R.B. Laminar shear stress elicit distinct endothelial cell E-selectin expression pattern via TNF α and IL-1 β activation / R.B. Huang, A.L. Gonzalez, O. Eniola-Adefeso. – Text: visual // Biotechnology and Bioengineering. – 2013. – Vol. 110, № 3. – P. 999-1003.DOI: 10.1002/bit.24746.

190. Huang, R.B. Shear stress modulation of IL-1 β -induced E-selectin expression in human endothelial cells / R.B. Huang, O. Eniola-Adefeso. – Text: visual // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 2. – P. e31874. DOI: 10.1371/journal.pone.0031874.

191. Human polymorphism of P-selectin glycoprotein ligand 1 attributable to variable numbers of tandem decameric repeats in the mucinlike region / V. Afshar-Kharghan, R. Diz-Kucukkaya, E.H. Ludwig [et al.]. – Text: visual // Blood. – 2001. – Vol. 97, № 10. – P. 3306-3307.

192. Identification of novel isoforms of mouse L-selectin with different carboxyl-terminal tails / Y. Furukawa, E. Umemoto, M.H. Jang [et al.]. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 2008. – Vol. 283. – P. 12112-12119.doi: 10.1074/jbc.M801745200.

193. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo / E.E. Eriksson, X. Xie, J. Werr [et al.]. – Text: visual // Journal of Experimental Medicine. – 2001. – Vol. 194. – P. 205-218.

194. Important contributions of P-selectin glycoprotein ligand-1-mediated secondary capture to human monocyte adhesion to P-selectin, E-selectin, and TNF- α -activated endothelium under flow in vitro / Y.C. Lim, K. Snapp, G.S. Kansas [et al.]. – Text: visual // Journal of Immunology. – 1998. – Vol. 161. – P. 2501-2508.

195. Inagami, T. Endothelium as an endocrine organ / T. Inagami, M. Naruse, R. Hoover. – Text: visual // The Annual Review of Physiology. – 1995. – Vol. 57. – P. 171-189.

196. Increasing circulating ESM-1 and adhesion molecules are associated with early stage atherosclerosis in OSA patients: A cross-sectional study / H. Sun, Y. Du, L. Zhang [et al.]. – Text: visual // Sleep Medicine. – 2022. – Vol. 98. – P. 114-120.doi:

10.1016/j.sleep.2022.06.015.

197. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? / M. Lind, A. Hayes, M. Caprnda [et al.]. – Text: visual // Biomedical Pharmacotherapy. – 2017. – Vol. 93. – P. 370-375. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.06.036.

198. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? / M. Lind, A. Hayes, M. Caprnda [et al.]. – Text: visual // Biomedicine Pharmacotherapy. – 2017. – Vol. 93. – P. 370-375.

199. Influence of hypoxia and hypoxia-reoxygenation on endothelial P-selectin expression / C. Closse, M. Seigneur, M. Renard [et al.]. – Text: visual // Haemostasis. – 1996. – Vol. 4. – P.177-181.

200. Inhibition of caspase-3 activation by SB 203580, p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor in nitric oxide-induced apoptosis of PC-12 cells / K.P. Sarker, M. Nakata, I. Kitajima [et al.]. – Text: visual // The Journal of Molecular Neuroscience. – 2000. – Vol. 15, № 3. – P. 243-250.

201. iNOS deficiency protects the heart from systolic overload induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure / P. Zhang, X. Xu, X. Hu [et al.]. – Text: visual // Circular Research. – 2007. – Vol. 100, № 7. – P. 1089-1098.

202. Insulin resistance, cardiovascular stiffening and cardiovascular disease / M. Hill, Y. Yang, L. Zhang [et al.]. – Text: visual // Metabolism. – 2021. – Vol. 119. – P.154766. DOI: 10.1016/j.metabol.2021.154766.

203. Interleukin-13 induces PSGL-1/P-selectin-dependent adhesion of eosinophils, but not neutrophils, to human umbilical vein endothelial cells under flow / G. Woltmann, C.A. McNulty, G. Dewson [et al.]. – Text: visual // Blood. – 2000. – Vol. 95, № 10. – P. 3146-3152. DOI:10.1182/blood.V95.10.3146.

204. ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1 / A. Urzainqui, J.M. Serrador, F. Viedma [et al.]. – Text: visual // Immunity. – 2002. – Vol. 17. – P. 401-412. DOI: 10.1016/s1074-7613(02)00420-x.

205. Ivetic, A. Mutagenesis of the Ezrin-Radixin-Moesin Binding Domain of L-selectin Tail Affects Shedding, Microvillar Positioning, and Leukocyte Tethering / A. Ivetic, O. Florey, J. Deka. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 2004. –

Vol. 279. – P. 33263-33272.

206. Jiang, W.G. Expression of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma (PPARgamma) and the PPARgamma co-activator, PGC-1, in human breast cancer correlates with clinical outcomes / W.G. Jiang, A. Douglas-Jones, R.E. Mansel. – Text: visual // International Journal of Cancer. – 2003. – Vol. 106, № 5. – P. 752-757. DOI: 10.1002/ijc.11302.

207. Kahn, J. Calmodulin Regulates L-Selectin Adhesion Molecule Expression and Function through a Protease-Dependent Mechanism / J. Kahn, B. Walcheck, G.I. Migaki. – Text: visual // Cell. – 1998. – Vol. 92. – P. 809-818.

208. Kansas, G.S. Selectins and their ligands: Current concepts and controversies / G.S. Kansas. – Text: visual // Blood. – 1996. – Vol. 88. – P. 3259-3287.

209. Kaplan, M.J. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity / M.J. Kaplan, M. Radic. – Text: visual // Journal of Immunology. – 2012. – Vol. 189. – P. 2689-2695.

210. Kappelmayer, J. The Interaction of Selectins and PSGL-1 as a Key Component in Thrombus Formation and Cancer Progression / J. Kappelmayer, B.N. Jr. – Text: visual // BioMed Research International. – 2017. – Vol. 7. – P. 6138145.doi: 10.1155/2017/6138145.

211. Kawasaki, H. Mass spectrometric identification of tryptophan nitration sites on proteins in peroxynitrite-treated lysates from PC12 cells / H. Kawasaki. – Text: visual // Free Radical Biological Medicine. – 2011. – Vol. 50, № 3. – P. 419-427.

212. Kujovich, J.L. Factor V Leiden thrombophilia / J.L. Kujovich. – Text: visual // Genetic Medicine. – 2011. – Vol. 13, № 1. – P. 1-16.

213. Kuo, A. Lipid droplet biogenesis and function in the endothelium / A. Kuo, M.Y. Lee, W.C. Sessa. – Text: visual // Circular Research. – 2017. – Vol. 120, № 8. – P. 1289-1297. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310498.

214. Kurutas, E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/ nitrosative stress: current state / E.B. Kurutas. – Text: visual // Nutrition Journal. – 2015. – Vol.15. – P. 71.

215. Kvietys, P.R. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular

responses to inflammation / P.R. Kvietys, D.N. Granger. – Text: visual // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2012. – Vol. 52, № 3. – P. 556-592. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.002.

216. Lampugnani, M.G. Endothelial adherens junctions and the actin cytoskeleton: an 'infinity net'? / M.G. Lampugnani. – Text: visual // *Journal of Biology*. – 2010. – Vol. 9. – P. 16.

217. Lancaster, J.R. Tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide / J.R. Lancaster, A. Jr. – Text: visual // *Nitric Oxide*. – 1997. – Vol. 1. – P. 18-30. doi: 10.1006/niox.1996.0112.

218. Landmesser, U. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? / U. Landmesser, B. Horning, H. Drexler. – Text: visual // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109, № 21. – P. 27-33.

219. Lasky, L.A. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response / L.A. Lasky. – Text: visual // *Annual Review of Biochemistry*. – 1995. – Vol. 64. – P. 113-139.

220. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease / C. Goliaas, E. Tsoutsis, A. Matziris [et al.]. – Text: visual // *In Vivo*. – 2007. – Vol. 21. – P. 757-769.

221. Leukocytes Crossing the Endothelium: A Matter of Communication / I. Timmerman, A.E. Daniel, J. Kroon, D.B. Jaap. – Text: visual // *The International Review of Cell and Molecular Biology*. – 2016. – Vol. 322. – P. 281-292. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2015.10.005.

222. Levine, R.L. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R.L. Levine. – Text: visual // *Methods in enzymology*. – 1990. – Vol. 186. – P. 464-478.

223. Ley, K. The role of selectins in inflammation and disease / K. Ley. – Text: visual // *Trends in Molecular Medicine*. – 2003. – Vol. 9. – P. 263-268. DOI: 10.1016/s1471-4914(03)00071-6.

224. Li, X. Ma Y, Wang D. The role of P-selectin/PSGL-1 in regulating NETs as a novel mechanism in cerebral ischemic injury / X. Li, Y.Ma, D.Wang. – Text: visual //

Front Neurol. – 2024. – Vol. 3, № 15. P.1442613. DOI: 10.3389/fneur.2024.1442613

225. Liver inflammation and hepatobiliary cancers / V. Leone, A. Ali, A. Weber [et al.]. – Text: visual // Trends Cancer. – 2021. – Vol. 7. – P. 606-623.doi: 10.1016/j.trecan.2021.01.012.

226. Lobysheva, I.I. Interaction of peroxyxynitrite and hydrogen peroxide with dinitrosyl iron complexes containing thiol ligands in vitro / I.I. Lobysheva, V.A. Serezhnikov, A.F. Vanin. – Text : visual // Biochemistry. – 1999. – Vol. 64. – P. 194-200.

227. Lower Extremity Peripheral Artery Disease: Contemporary Epidemiology, Management Gaps, and Future Directions: A Scientific Statement From the American Heart Association / Criqui MH, Matsushita K, Aboyans V [et al.]. – Text: visual // Circulation. – 2021. – Vol. 144, № 9. – P. e171-e191.

228. L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling / A. Ivetic, H.L. Hoskins Green, S.J. Hart. – Text: visual // Frontiers of Immunology. – 2019. – Vol. 10. – P. 1068.

229. Ludwig, R.J. P-selectin: A common therapeutic target for cardiovascular disorders, inflammation and tumour metastasis / R.J. Ludwig, M.P. Schon, W.H. Boehncke. – Text: visual // Expert Opinion in Therapeutic Targets. – 2007. – Vol. 11. – P. 1103-1117.

230. Lundberg, J.O. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide / J.O. Lundberg, M. Govoni. – Text: visual // Free Radical Biology Medicine. – 2004. – Vol. 37. – P. 395-400.

231. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice / M.L. Arbonés, D.C. Ord, K. Ley [et al.]. – Text: visual // Immunity. – 1994. – Vol. 1. – P. 247-260.

232. Mangoni, A.A. A systematic review and meta-analysis of circulating adhesion molecules in rheumatoid arthritis / A.A. Mangoni, A. Zinellu. – Text: visual // Inflammation Research. – 2024. – Vol. 73, № 3. – P. 305-327. DOI: 10.1007/s00011-023-01837-6.

233. Mangoni, A.A. Circulating cell adhesion molecules in systemic sclerosis: a

systematic review and meta-analysis / A.A. Mangoni, A. Zinellu. – Text: visual // *Frontiers in Immunology*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1438302.

234. Matala, E. The Cytoplasmic Domain of L-Selectin Participates in Regulating L-Selectin Endoproteolysis / E. Matala, S.R. Alexander, T.K. Kishimoto. – Text: visual // *Journal of Immunology*. – 2001. – Vol. 167. – P. 1617-1623.

235. Matsumoto, M. Moesin regulates neutrophil rolling velocity in vivo / M. Matsumoto, T. Hirata. – Text: visual // *Cell Immunology*. – 2016. – Vol. 3. – P. 59-62. DOI: 10.1016/j.cellimm.2016.04.007.

236. McEver, R.P. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall / R.P. McEver. – Text: visual // *Cardiovascular Research*. – 2015. – Vol. 107, № 3. – P. 331-339.

237. Mechanical stretch: physiological and pathological implications for human vascular endothelial cells / N.F. Jufri, A. Mohamed-ali, A. Avolio [et al.]. – Text: visual // *Vascular Cell*. – 2015. – Vol. 7, №8. – P. 1-13. DOI:10.1186/s13221-015-0033-z.

238. Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase / N. Ramachandran, P. Root, X.M. Jiang [et al.]. – Text: visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 98, № 17. – P. 9539-9544. DOI: 10.1073/pnas.171180998.

239. Mechanoresponsive networks controlling vascular inflammation / M.T. Bryan, H. Duckles, S. Feng [et al.]. – Text: visual // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2014. – Vol. 34, № 10. – P. 2199-2205.

240. Mestas, J. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology / J. Mestas, C.C. Hughes. – Text: visual // *Immunology*. – 2004. – Vol. 172. – P. 2731-2738.

241. Metabolic modulation of cytokine-induced brain endothelial adhesion molecule expression / G.V. Chaitanya, W. Cromer, S. Wells [et al.]. – Text: visual // *Microcirculation*. – 2012. – Vol. 19, № 2. – P. 155-65. DOI: 10.1111/j.1549-8719.2011.00141.x.

242. MiR-155 regulates PAD4-dependent formation of neutrophil extracellular traps / A. Hawez, A. Al-Haidari, R. Madhi [et al.]. – Text: visual // *Frontiers of*

Immunology. – 2019. – Vol. 10. – P. 2462. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02462

243. Mitchell, S. Signaling via the NF κ B system. Wiley Interdiscip / S. Mitchell, J. Vargas, A. Hoffmann. – Text: visual // Review System Biology Medicine. – 2016. – Vol. 8, № 3. – P. 227-241. DOI: 10.1002/wsbm.1331.

244. Molecular signatures of tissue-specific microvascular endothelial cell heterogeneity in organ maintenance and regeneration / D.J. Nolan, M. Ginsberg, E. Israely [et al.]. – Text: visual // Developmental Cell. – 2013. – Vol. 26, № 2. – P. 204-209. DOI: 10.1016/j.devcel.2013.06.017.

245. Momot, K. Evaluation of Nitrosative/Oxidative Stress and Inflammation in Heart Failure with Preserved and Reduced Ejection Fraction / K. Momot, K. Krauz, K. Czarzasta. – Text: visual // International Journal of Molecular Science. – 2023. – Vol.24, № 21. – P. 15944. DOI: 10.3390/ijms242115944.

246. Montreuil, J. New Comprehensive Biochemistry of Glycoproteins / J. Montreuil, J.F. Vliegthart, H. Schachter. – Text: visual // Elsevier. – 1995. – Vol. 29. – P. 644.

247. Mutua, V. A review of neutrophil extracellular traps (NETs) in disease: potential anti-NETs therapeutics / V. Mutua, L.J. Gershwin. – Text: visual // Clinical Review of Allergy and Immunology. – 2021. – Vol. 61. – P. 194-211.

248. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps / V. Papayannopoulos, K.D. Metzler, A. Hakkim, A. Zychlinsky. – Text: visual // Journal of Cell Biology. – 2010. – Vol. 191. – P. 677-691. DOI: 10.1083/jcb.201006052

249. Neutrophil extracellular trap-derived enzymes oxidize high-density lipoprotein: an additional proatherogenic mechanism in systemic lupus erythematosus / C.K. Smith, A. Vivekanandan-Giri, C. Tang [et al.]. – Text: visual // Arthritis Rheumatology. – 2014. – Vol. 66. – P. 2532-2544. DOI: 10.1002/art.38703

250. Neutrophil Migratory Patterns: Implications for Cardiovascular Disease / A. Dahdah, J. Johnson, S. Gopalkrishna [et al.]. – Text: visual // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2022. – Vol. 10. – P. 795784.

251. Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-

selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro / B. Walcheck, K.L. Moore, R.P. McEver, T.K. Kishimoto. – Text: visual // *Journal of Clinical Investigation*. – 1996. – Vol. 98. – P. 1081-1087.

252. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and mortality in the United States general population / M. Song, B.I. Graubard, C.S. Rabkin, E.A. Engels. – Text: visual // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – P. 464.

253. Nitric oxide synthase and its function in animal reproduction: an update / W. Zhang, S.J. Chen, L.Y. Guo [et al.]. – Text: visual // *Frontiers Physiology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1288669. DOI: 10.3389/fphys.2023.1288669.

254. Nitric Oxide: Physiological Functions, Delivery, and Biomedical Applications / S.M. Andrabi, N.S. Sharma, A. Karan [et al.]. – Text: visual // *Advanced Science*. – 2023. – Vol. 10, № 30. – P. e2303259. doi: 10.1002/advs.202303259.

255. Nitrosative Stress and Its Association with Cardiometabolic Disorders / I. Pérez-Torres, L. Manzano-Pech, M.E. Rubio-Ruiz [et al.]. – Text: visual // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, № 11. – P. 2555. doi: 10.3390/molecules25112555.

256. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress / I. Bellezza, I. Giambanco, A. Minelli, R. Donato. – Text: visual // *Cell Research*. – 2018. – Vol. 1865, № 5. – P. 721-733. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2018.02.010.

257. Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) regulation of IL-1 β -induced retinal vascular inflammation / M.J. Giblin, T.E. Smith, G. Winkler [et al.]. – Text: visual // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2021. – Vol. 1867, № 12. – P. 166238.

258. Ochoa, C.D. New developments in lung endothelial heterogeneity: von Willebrand factor, P-selectin, and the Weibel–Palade body / C.D. Ochoa, S. Wu, T. Stevens. – Text: visual // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – 2010. – Vol. 36, №3. – P. 301-308. DOI: 10.1055/s-0030–1253452.

259. O-glycans direct selectin ligands to lipid rafts on leukocytes / B. Shao, T. Yago, H. Setiadi [et al.]. – Text: visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – Vol. 112, № 28. – P. 8661-8665. DOI: 10.1073/pnas.1507712112.

260. Oliveira-Paula, G.H. Inducible nitric oxide synthase as a possible target in hypertension / G.H. Oliveira-Paula, R. Lacchini, J.E. Tanus-Santos. – Text: visual //

Current Cancer Drug Targets. – 2014. – Vol. 15, № 2. – P. 164-174.

261. Oxidative stress induces E-selectin expression through repression of endothelial transcription factor ERG / J. Zhang, S. Zhang, S. Xu [et al.]. – Text: visual // Journal of Immunology. – 2023. – Vol. 211. – P. 1835-1843.

262. Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases / A. Shaito, K. Aramouni, R. Assaf [et al.]. – Text: visual // Frontiers Bioscience (Landmark Ed). – 2022. – Vol. 27, № 3. – P. 105.DOI: 10.31083/j.fbl2703105.

263. Oxidative, Reductive, and Nitrosative Stress Effects on Epigenetics and on Posttranslational Modification of Enzymes in Cardiometabolic Diseases / I. Pérez-Torres, M.E. Soto, V. Castrejón-Tellez [et al.]. – Text: visual // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2020. – Vol. 30. – P. 8819719.doi: 10.1155/2020/8819719.

264. P- and E- selectin in venous thrombosis and non-venous pathologies / M. Purdy, A. Obi, D. Myers, T. Wakefield. – Text: visual // Journal of Thrombosis and Homeostasis. – 2022. – Vol. 20, № 5. – P. 1056-1066.

265. Pacher, P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet. – Text: visual // Physiological Reviews. – 2007. – Vol. 87, № 1. – P. 315-424.doi:10.1152/physrev.00029.2006.

266. Parker, H. Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps / H. Parker, C.C. Winterbourn. – Text: visual // Frontiers of Immunology. – 2012. – Vol. 3. – P. 424.

267. Patel, K.D. P-selectin must extend a sufficient length from the plasma membrane to mediate rolling of neutrophils / K.D. Patel, M.U. Nollert, R.P. McEver. – Text: visual // Journal of Cell Biology. – 1995. – Vol. 131, № 2. – P. 1893-1902.

268. Paz, N.G. Arterial versus venous endothelial cells / N.G. Paz, P.A. D'Amore. – Text: visual // Cell Tissue Research. – 2009. – Vol. 335. – P. 5-16. DOI: 10.1007/s00441-008-0706-5.

269. Peroxynitrite mediates diabetes-induced endothelial dysfunction: possible role of Rho kinase activation / A.B. El-Remessy, H.E. Tawfik, S. Matragoon [et al.]. – Text: visual // Experimental Diabetes Research. – 2010. – Vol. 247. – P. 861.

270. Peucedanumostruthium Inhibits E-Selectin and VCAM-1 Expression in

Endothelial Cells through Interference with NF- κ B Signaling / C. Lammel, J. Zwirchmayr, J. Seigner [et al.]. – Text: visual // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10. – P. 1215. doi: 10.3390/biom10091215.

271. Plasma P-selectin is an early marker of thromboembolism in COVID-19 / B.G. Fenyves, A. Mehta, K.R. Kays [et al.]. – Text: visual // *American Journal of Hematology*. – 2021. – Vol. 96, № 12. – P. 468-471.

272. Platelet-Released Extracellular Vesicle Characteristics Differ in Chronic and in Acute Heart Disease / A. Vilella-Figuerola, A. Cordero, S. Mirabet [et al.]. – Text: visual // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2023. – Vol. 123, № 9. – P. 892-903. doi: 10.1055/s-0043-57017.

273. Poredos, P. Endothelial Dysfunction and Venous Thrombosis / P. Poredos, M.K. Jezovnik. – Text: visual // *Angiology*. – 2018. – Vol. 69, № 7. – P. 564-567.

274. Posttranslational modifications of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P- and E-selectin / F. Li, P.P. Wilkins, S. Crawley [et al.]. – Text: visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol. 271. – P. 3255-3264.

275. Poulaki, V. Angiogenesis assays / V. Poulaki. – Text: visual // *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. – 2011. – P. 345-358.

276. PPAR(γ)/PGC-1(α) pathway in E-cadherin expression and motility of HepG2 cells / H.J. Lee, Y. Su, P.H. Yin [et al.]. – Text: visual // *Anticancer Research*. – 2009. – Vol. 29, № 12. – P. 5057-5063.

277. Probing calmodulin-NO synthase interactions via site-specific infrared spectroscopy: an introductory investigation / S. Singh, Y.P. Gyawali, T. Jiang [et al.]. – Text: visual // *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. – 2024. – Vol. 29, № 2. – P. 243-250. doi: 10.1007/s00775-024-02046-0.

278. Prothrombin 20210A mutation: a mild risk factor for venous thromboembolism but not for arterial thrombotic disease and pregnancy-related complications in a family study / I. Bank, E.J. Libourel, S. Middeldorp [et al.]. – Text: visual // *Archives of International Medicine*. – 2004. – Vol. 164, № 17. – P. 1932-1937.

279. P-selectin Glycoprotein Ligand-1 Decameric Repeats Regulate Selectin-dependent Rolling under Flow Conditions / C. Tauxe, X. Xie, M. Joffraud [et al.]. – Text:

visual // The journal of biological chemistry. – 2008. – Vol. 283, № 42. – P. 28536-28545. DOI: 10.1074/jbc.M802865200.

280. P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Deficiency Protects Against Aortic Aneurysm Formation Induced by DOCA Plus Salt / X. Wu, X. Liu, H. Yang [et al.]. – Text: visual // Cardiovascular Drugs and Therapy. – 2022. – Vol. 36, № 1. – P. 31-44. DOI: 10.1007/s10557-020-07135-1.

281. P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium / P.C. Martins, J.J. García-Vallejo, J.V. Thienen [et al.]. – Text: visual // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2007. – Vol. 27. – P. 1023-1029.

282. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules / M. Sperandio, M.L. Smith, S.B. Forlow [et al.]. – Text: visual // Journal of Experimental Medicine. – 2003. – Vol. 197. – P. 1355-1363.

283. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation / H.B. Wang, J.T. Wang, L. Zhang [et al.]. – Text: visual // Nature Immunology. – 2007. – Vol. 8, № 8. – P. 882-892. DOI: 10.1038/ni1491.

284. PSGL-1 function in immunity and steady state homeostasis / D.A. Carlow, K. Gossens, S. Naus, [et al.]. – Text: visual // Immunological Reviews. – 2009. – Vol. 230. – P. 75-96.

285. PSGL-1 Immune Checkpoint Inhibition for CD4+T Cell Cancer Immunotherapy / J.M. DeRogatis, K.M. Viramontes, E.N. Neubert, R. Tinoco. – Text: visual // Frontiers Immunology. – 2021. – Vol. 23, № 12. – P. 636-638.

286. PSGL-1, ADAM8, and selectins as potential biomarkers in the diagnostic process of systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis: an observational study / E. San Antonio, J. Silva'n, J. Sevilla-Montero [et al.]. – Text: visual // Frontiers Immunology. – 2024. – Vol. 15. – P. 1403104.

287. PSGL-1: A New Player in the Immune Checkpoint Landscape / R. Tinoco, D.C. Otero, A.A. Takahashi, L.M. Bradley. – Text: visual // Trends of Immunology. – 2017. – Vol. 38, № 5. – P. 323-335.

288. PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation / A. Zarbock, H. Muller, Y.

Kuwano, K. Ley. – Text: visual // The Journal of Leukocyte Biology. – 2009. – Vol. 86. – P. 1119-1124. DOI: 10.1189/jlb.0209117.

289. Radi, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine / R. Radi. – Text: visual // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – Vol. 115, № 23. – P. 5839-5848. DOI: 10.1073/pnas.1804932115.

290. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140 / J.G. Geng, M.P. Bevilacqua, K.L. Moore [et al.]. – Text: visual // Nature. – 1990. – Vol. 343. – P. 757-760.

291. Recent progress in therapeutic strategies and biomimetic nanomedicines based on neutrophils for inflammation treatment / Y. Liu, Y. Yu, M. Wang [et al.]. – Text: visual // Nanomedicine (London England). – 2023. – Vol. 18, № 5. – P. 485-500.

292. Reduced plasma levels of P-selectin and L-selectin in a pilot study from Alzheimer disease: relationship with neuro-degeneration / M.M. Corsi, F. Licastro, E. Porcellini [et al.]. – Text: visual // Biogerontology. – 2011. – Vol. 12, № 5. – P. 451-454. Doi: 10.1007/s10522-011-9335-6.

293. Regulation of B cell functions by S-nitrosoglutathione in the EAE model / J. Kim, S.M.T. Islam, F. Qiao [et al.]. – Text: visual // Redox Biology. – 2021. – Vol. 45. – P. 102053. DOI: 10.1016/j.redox.2021.102053.

294. Role of endothelial cell-selective adhesion molecule in hematogeneous metastasis / H.M. Cangara, T. Ishida, T. Hara [et al.]. – Text: visual // Microvascular Research. – 2010. – Vol. 80, № 1. – P. 133-141.

295. Rouleau, L. The response of human aortic endothelial cells in a stenotic hemodynamic environment: effect of duration, magnitude, and spatial gradients in wall shear stress / L. Rouleau, J. Rossi, R.L. Leask. – Text: visual // Journal of Biomechanical Engineering. – 2010. – № 132. – P. 71015.

296. RUNX transcription factors potentially control E-selectin expression in the bone marrow vascular niche in mice / K. Morita, C. Tokushige, S. Maeda [et al.]. – Text: visual // Blood Advances. – 2018. – Vol. 2. – P. 509-515.

297. Scarpulla, R.C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function / R.C. Scarpulla. – Text: visual // Physiology Review. – 2008. –

Vol. 88, № 2. – P. 611-638. DOI: 10.1152/physrev.00025.2007.

298. Schindler, U. Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression / U. Schindler, V.R. Baichwal. – Text: visual // *Molecular Cell Biology*. – 1994. – №14. – P. 5820-5831.

299. Selectin catch-bonds mechanotransduce integrin activation and neutrophil arrest on inflamed endothelium under shear flow / V.A. Morikis, S. Chase, T. Wun [et al.]. – Text: visual // *Blood*. – 2017. – Vol. 130. – P. 2101-2110.

300. Selectins in Biology and Human Disease: Opportunity in E-selectin Antagonism / J.M. Peterson, T.A. Smith, E.P. Rock, J.L. Magnani. – Text: visual // *Cureus*. – 2024. – Vol. 16, № 6. – P. e61996.

301. Serum nitrotyrosine and psycho metric tests as indicators of impaired fitness to drive in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy / V. Felipo, A. Urios, P. Valero [et al.]. – Text: visual // *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*. – 2013. – Vol. 33, № 10. – P. 1478-1489.

302. Shah, A.M. Inducible nitric oxide synthase and cardiovascular disease / A.M. Shah. – Text: visual // *Cardiovascular Research*. – 2000. – Vol. 45, № 1. – P. 148-155. DOI: 10.1016/s0008-6363(99)00316-8.

303. Shamaki, G.R. Peripheral Artery Disease: A Comprehensive Updated Review / G.R. Shamaki, F. Markson, D. Soji-Ayoade. – Text: visual // *Current Problems of Cardiology*. – 2022. – Vol. 47, № 11. – P. 101082. doi: 10.1016/j.cpcardiol.2021.101082.

304. Sharon, N. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins / N. Sharon, H. Lis. – Text: visual // *Science*. – 1972. – Vol. 177. – P. 949-959.

305. Short alleles of P-selectin glycoprotein ligand-1 protect against premature myocardial infarction / V. Roldán, R. González-Conejero, F. Marín [et al.]. – Text: visual // *American Heart Journal*. – 2004. – Vol. 148, № 4. – P. 602-605. DOI: 10.1016/j.ahj.2004.04.020.

306. Silva, M. E-Selectin Ligands in the Human Mononuclear Phagocyte System: Implications for Infection, Inflammation, and Immunotherapy / M. Silva, P.A. Videira, R. Sackstein. – Text: visual // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 19, № 8. – P. 1878. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01878.

307. Sladek, V. How E-, L-, and P-Selectins Bind to sLex and PSGL-1: A Quantification of Critical Residue Interactions / V. Sladek, P. Šmak, I. Tvaroška. – Text: visual // The Journal of Chemical Information and Modeling. – 2023. – Vol. 63, № 17. – P. 5604-5618. DOI: 10.1021/acs.jcim.3c00704.

308. Smith, C.W. Adhesion molecules and receptors / C.W. Smith. – Text: visual // Clinical Immunology. – 2008. – Vol. 121, № 2. – P. 375-379. DOI: 10.1016/j.jaci.2007.07.030.

309. Snapp, K.R. Attachment of the PSGL-1 cytoplasmic domain to the actin cytoskeleton is essential for leukocyte rolling on P-selectin / K.R. Snapp, C.E. Heitzig, G.S. Kansas. – Text: visual // Blood. – 2002. – Vol. 99. – P. 4494-4502. DOI: 10.1182/blood.v99.12.4494.

310. Soluble E-selectin, von Willebrand factor, soluble thrombomodulin, and total body nitrate/nitrite product as indices of endothelial damage/dysfunction in paroxysmal, persistent, and permanent atrial fibrillation / B. Freestone, A.Y. Chong, S. Nuttall [et al.]. – Text: visual // Chest. – 2007. – Vol. 132. – P. 1253-1258. doi: 10.1378/chest.07-1185.

311. Soluble P-selectin levels in patients with obstructive sleep apnea: a systematic review and meta-analysis / Z. Ding, Z. Xu, T. Liu, Y. Li. – Text: visual // European Archives of Oto-Rhino-Laryngology. – 2021. – Vol. 278, № 12. – P. 4633-4644. DOI:

312. Soluble P-selectin Predicts Lower Extremity Peripheral Artery Disease Incidence and Change in the Ankle Brachial Index: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) / C.L. Wassel, C. Berardi, J.S. Pankow [et al.]. – Text: visual // Atherosclerosis. – 2015. – Vol. 239, №2. – P. 405-411.

313. Sperandio, M. Glycosylation in immune cell trafficking / M. Sperandio, C.A. Gleissner, K. Ley. – Text: visual // Immunology Review. – 2009. – Vol. 230, № 1. – P. 97-113. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2009.00795.x.

314. Spertini, C. Ezrin-radixin-moesin-binding sequence of PSGL-1 glycoprotein regulates leukocyte rolling on selectins and activation of extracellular signal-regulated kinases / C. Spertini, B. Baisse, O. Spertini. – Text: visual // Journal Biology Chemistry. – 2012. – Vol. 287. – P. 10693-10702. DOI: 10.1074/jbc.M111.318022.

315. Spontaneous Pulmonary Hypertension Associated With Systemic Sclerosis in

P-Selectin Glycoprotein Ligand 1-Deficient Mice / R. González-Tajuelo, M. de la Fuente-Fernández, D. Morales-Cano [et al.]. – Text: visual // *Arthritis Rheumatology*. – 2020. – Vol. 72, № 3. – P. 477-487. DOI: 10.1002/art.41100.

316. Staton, C.A. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays / C.A. Staton, M.W.R. Reed, N.J. Brown. – Text: visual // *International journal of experimental pathology*. – 2009. – Vol. 90, № 3. – P. 195-221.

317. Structure and dynamics of the platelet integrin-binding C4 domain of von Willebrand factor / E.R. Xu, S. von Bülow, P.C. Chen [et al.]. – Text: visual // *Blood*. – 2019. – Vol. 133, № 4. – P. 366-376.

318. Structure, distribution, regulation, and function of splice variant isoforms of nitric oxide synthase family in the nervous system / N. Hosseini, M. Kourosh-Arami, S. Nadjafi, B. Ashtari. – Text: visual // *Current Protein and Peptide Science*. – 2022. – Vol. 23, № 8. – P. 510-534. doi: 10.2174/1389203723666220823151326.

319. Szabó, C. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics / C. Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi. – Text: visual // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2007. – Vol. 6. – P. 662-680. DOI:10.1038/nrd2222.

320. Takada, Y.K. The C-type lectin domain of CD62P (P-selectin) functions as an integrin ligand. The C-type lectin domain of CD62P (P-selectin) functions as an integrin ligand / Y.K. Takada, S.I. Simon, Y. Takada. – Text: visual // *Life Science Alliance*. – 2023. – Vol. 6, № 7. – P. e202201747.

321. Tan, C. The vitals of NETs / C. Tan, M. Aziz, P. Wang. – Text: visual // *Journal Leukocytes' Biology*. – 2021. – Vol. 110. – P. 797-808.

322. Targeting endothelial dysfunction and inflammation / L. Wang, C.K. Cheng, M. Yi [et al.]. – Text: visual // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2022. – Vol. 168. – P. 58-67. doi: 10.1016/j.yjmcc.2022.04.011.

323. Targeting E-selectin to Tackle Cancer Using Uproleselan / B. Muz, A. Abdelghafer, M. Markovic [et al.]. – Text: visual // *Cancers (Basel)*. – 2021. – Vol. 13, № 2. – P. 335.

324. Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis / P. Sonveaux, T. Copetti, C.J. De

Saedeleer [et al.]. – Text: visual // PloS One. – 2012. – Vol. 7, № 3. – P. e33418.

325. Taylor, M.E. Paradigms for glycan-binding receptors in cell adhesion / M.E. Taylor, K. Drickamer. – Text: visual // Current Opinion in Cell Biology. – 2007. – Vol. 19. – P. 572-577.

326. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger / T.J. O'Dell, R.D. Hawkins, E.R. Kandel, O. Arancio. – Text: visual // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1991. – Vol. 88, № 24. – P. 11285-11289.

327. The chick embryo aortic arch assay: a new, rapid, quantifiable in vitro method for testing the efficacy of angiogenic and anti-angiogenic factors in a three-dimensional, serum-free organ culture system / V.R. Muthukkaruppan, B.L. Shinnars, R. Lewis [et al.]. – Text: visual // Proceedings American Association of Cancer Research. – 2000. – Vol. 41. – P. 65.

328. The influence of high glucose on the aerobic metabolism of endothelial EA.hy926 cells / A. Koziel, A. Woyda-Ploszczyca, A. Kicinska, W. Jarmuszkiewicz. – Text: visual // Pflügers Archiv: European Journal of Physiology. – 2012. – Vol. 464, № 6. – P. 657-669.

329. The mechanism underlying ICAM-1 and E-selectin-mediated hypertriglyceridemic pancreatitis-associated lung injury / R. Yu, C. Hou, Y. Peng [et al.]. – Text: visual // Molecular Immunology. – 2022. – № 152. – P. 55-66.

330. The metalloprotease ADAM8 is associated with and regulates the function of the adhesion receptor PSGL-1 through ERM proteins / M. Domínguez-Luis, A. Lamana, J. Vazquez [et al.]. – Text: visual // Molecular immunology. – 2011. – Vol. 41. – P. 3436-3442. DOI:10.1002/eji.201141764.

331. The use of cylexin (CY-1503) in prevention of reperfusion lung injury in patients undergoing pulmonary thromboendarterectomy / K.M. Kerr, W.R. Auger, J.J. Marsh [et al.]. – Text: visual // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2000. – Vol. 162. – P. 14-20.

332. Tolosa, L. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay / L. Tolosa, M. T. Donato, M. J. Gómez-Lechón. – Text: visual // Methods of Molecular

Biology. – 2015. – Vol. 1250. – P. 333-348.

333. Tvaroška, I. Selectins – The Two Dr. Jekyll and Mr. Hyde Faces of Adhesion Molecules / I. Tvaroška, C. Selvaraj, J. Koča. – Text: visual // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, № 12. – P. 2835. DOI:org/10.3390/molecules25122835.

334. is required for high affinity binding to P-selectin / P.P. Wilkins, K.L. Moore, R.P. McEver, R.D. Cummings. – Text: visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – Vol. 270. – P. 22677-22680. DOI: 10.1074/jbc.270.39.22677.

335. Understanding Chronic Venous Disease: A Critical Overview of Its Pathophysiology and Medical Management / M.A. Ortega, O. Fraile-Martínez, C. García-Montero [et al.]. – Text: visual // *Journal of Clinical Medicine*. – 2021. – Vol. 10. – P. 3239.

336. Understanding selectincounter-receptor binding from electrostatic energy computations and experimental binding studies / A.L. Woelke, C. Kuehne, T. Meyer [et al.]. – Text: visual // *Journal of Physical Chemistry A*. – 2013. – Vol. 117, № 51. – P. 16443-16454. DOI: 10.1021/jp4099123.

337. Varki, A. Biological roles of glycans / A. Varki. – Text: visual // *Glycobiology*. – 2017. – Vol. 27. – P. 3-49.

338. Virchow, R. Gesammelteabhandlungenzur Wissen-schaftlichenmedtzin / R. Virchow. – Text: visual // Frankfurt: Medinger Sohn & Co. – 1856. – P. 219-732.

339. Wacker, A. Endothelial development taking shape / A. Wacker, H. Gerhardt. – Text: visual // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2011. – Vol. 23, № 6. – P. 676-685. DOI: 10.1016/j.ceb.2011.10.002.

340. Wagers, A.J. An important role for the alpha 1,3 fucosyltransferase, FucT-VII, in leukocyte adhesion to E-selectin / A.J. Wagers, J.B. Lowe, G.S. Kansas. – Text: visual // *Blood*. – 1996. – № 88. – P. 2125-2132.

341. Wellings, P.J. Mechanisms of Platelet Capture Under Very High Shear / P.J. Wellings, D.N. Ku. – Text: visual // *Cardiovascular Engineering and Technology*. – 2012. – Vol. 3, № 2. – P. 161-170.

342. Wu, L.L. Serum 3-Nitrotyrosine May Be Elevated With the Exposure to Acute Inflammatory Risk Factors Such As Unhealthy Diet, Pollutant, Drug and Psychosocial

Stress / L.L. Wu, J.T. Wu. – Text: visual // Journal of Biomedicine Laboratory Science. – 2007. – Vol. 19, № 4. – P. 113-116.

343. Wynia-Smith, S.L. Nitrosothiol formation and S-nitrosation signaling through nitric oxide synthases / S.L. Wynia-Smith, B.C. Smith. – Text: visual // Nitric Oxide. – 2017. – Vol. 63. – P. 52-60.

344. Yang, L. Acidosis promotes tumorigenesis by activating AKT/NF- κ B signaling / L. Yang, X. Hu, Y.Y. Mo. – Text: visual // Cancer Metastasis Review. – 2019. – Vol. 38, № 1. – P. 179-188. DOI: 10.1007/s10555-019-09785-6.

345. Zaongo, S.D. P-selectin glycoprotein ligand-1 and cardiovascular diseases: from a general perspective to an HIV infection context / S.D. Zaongo, Y. Song, Y. Chen. – Text: visual // Frontiers Cardiovascular Medicine. – 2025. – Vol. 18, № 12. – P. 1521158. doi: 10.3389/fcvm.2025.1521158.

346. Zaongo, S.D. PSGL-1, a Strategic Biomarker for Pathological Conditions in HIV Infection: A Hypothesis Review / S.D. Zaongo, Y. Chen. – Text: visual // Viruses. – 2023. – Vol. 31. № 15(11). – P. 2197. DOI: 10.3390/v1511219PSGL-1.

347. Zhang, J. Biomarkers of endothelial activation and dysfunction in cardiovascular diseases / J. Zhang. – Text: visual // Reviews in Cardiovascular Medicine. – 2022. – Vol. 23, № 2. – P. 73.

348. Zhang, X. Brg1 deficiency in vascular endothelial cells blocks neutrophil recruitment and ameliorates cardiac ischemia-reperfusion injury in mice / X. Zhang, S. Liu, X. Weng. – Text: visual // International Journal of Cardiology. – 2018. – Vol. 15, № 269. – P. 250-258. DOI: 10.1016/j.ijcard.2018.07.105.

349. Zhang, Y. Study on hsa_circ_101209 in Plasma of Pregnant Women with Deep Venous Thrombosis / Y. Zhang, J. Li. – Text: visual // International Journal of General Medicine. – 2025. – Vol. 15, № 18. – P. 209-219. doi: 10.2147/IJGM.S477830.

350. Zhang, Y. The mechanism of transmembrane S-nitrosothiol transport / Y. Zhang, N. Hogg. – Text: visual // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – Vol. 101, № 21. – P. 7891-7896.