

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

На правах рукописи

Суров Иван Юрьевич

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

3.1.15. Сердечно-сосудистая хирургия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Пшенников Александр Сергеевич

Рязань – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Состояние проблемы лечения пациентов с ОААНК.....	16
1.1.1. Распространенность патологии	16
1.2 Консервативное лечение пациентов с ОААНК.....	19
1.3 Рестеноз при эндоваскулярных вмешательствах.....	20
1.4 Причины развития рестеноза	23
1.5 Эндотелиально-мезенхимальный переход	24
1.6 Эндотелиально-мезенхимальный переход при атеросклерозе и рестенозе	27
1.7 Эндотелиальные маркеры EndMT	31
1.8 Мезенхимальные маркеры EndMT	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1 Материалы и методы экспериментальной части исследования.....	36
2.1.1 Выделение первичных культур HUVEC.....	37
2.1.2 Верификация принадлежности культур к эндотелиальным.....	39
2.1.3 Моделирование баллонной ангиопластики.....	40
2.1.4 Изучение метаболической (митохондриальной) активности первичной культуры HUVEC в условиях моделирования баллонной ангиопластики и добавления различных концентраций сулодексида	42
2.1.5 Изучение миграционной активности первичной культуры HUVEC в условиях моделирования баллонной ангиопластики	43
2.1.6 Оценка относительного количества маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода в первичных культурах эндотелиоцитов.....	44
2.2 Материалы и методы клинической части исследования	46
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	53
3.1 Результаты экспериментального исследования	53
3.1.1 Оценка метаболической активности HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики	53

3.1.2 Внутригрупповое сравнение среди интактных первичных клеток HUVEC (нормальных) показателей оптической плотности при различных концентрациях сулодексида.....	54
3.1.3 Внутригрупповое сравнение среди патологических клеток (первичные культуры клеток HUVEC в модели баллонной ангиопластики) показателей оптической плотности при различных концентрациях сулодексида.....	55
3.1.4 Оценка миграционной активности культур HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики	57
3.1.5 Оценка относительного количества белков-маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода при инкубации первичных культур HUVEC с сулодексидом	60
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ЧАСТИ	
ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	73
4.1 Характеристики пациентов, включенных в исследование	73
4.1.1 ROC-анализ в группах клинической части исследования	79
4.1.2 Логистическая регрессия.....	88
4.1.3 Возможности использования прогностических моделей на примере клинических случаев.....	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	102
ВЫВОДЫ	114
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	119

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

На данный момент заболевания сердечно-сосудистой системы являются одной из самых важных медико-социальных проблем в Российской Федерации и мире, определяющих высокую смертность населения и экономическую нагрузку государства. В 2021 году в России зарегистрировано 35 574 831 взрослых больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. За десятилетний период времени (2012-2021) от данной группы заболеваний умерло 8209196 человек, что составляет 42,1% случаев летального исхода среди всех заболеваний [2].

В настоящее время атеросклероз является наиболее частой причиной развития сердечно-сосудистых заболеваний. Его характерной особенностью является длительное прогрессирующее течение заболевания, проявляющееся постепенным снижением толерантности к физической нагрузке, что в свою очередь, приводит к снижению трудоспособности и инвалидизации больного. Своё негативное воздействие на состояние здоровья оказывает атеросклероз любой локализации, как со стороны коронарной патологии, патологии экстра- и интракраниальных артерий головного мозга, так и со стороны артерий нижних конечностей [15].

В последнее десятилетие растёт количество пациентов с симптомными атеросклеротическими поражениями артерий нижних конечностей. В России хроническими заболеваниями артерий нижних конечностей страдает около 3% населения. Среди людей средней возрастной группы заболевание отмечается у 1,1%, среди пожилых людей встречается – у 5,2% населения. В популяции людей старше 75 лет до половины населения отмечают симптомы хронической ишемии нижних конечностей, основную массу данных людей составляют пациенты с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (ОААНК). По гендерному признаку данное заболевание распределяется ассиметрично, так мужчины болеют гораздо чаще, чем женщины, в среднем соотношении 10:1 [9,17]. В общей структуре сердечно-сосудистых заболеваний ОААНК занимает

второе место, уступая первенство ишемической болезни сердца (ИБС), и составляет около 20% среди всех патологий, затрагивающих сердечно-сосудистую систему [6].

ОААНК связан с повышенным риском развития различных сопутствующих неблагоприятных клинических исходов (других заболеваний сердечно-сосудистой системы, исходов связанных с прогрессированием ОААНК, таких как перемежающаяся хромота и трофические нарушения ишемического генеза). Несмотря на свою распространенность и клиническую значимость, ОААНК исторически недооценивался как самими пациентами, так и медицинскими работниками. Эта недооценка представляется многофакторной, например, неправильное представление о том, что патология артерий нижних конечностей не является фатальной, и что сопутствующий диагноз ОААНК не обязательно окажет негативное влияние на исход того или иного основного заболевания. За последние несколько лет ряд фактов показал, что эти представления ошибочны. Несколько исследований последовательно продемонстрировали, что многие пациенты с ОААНК не получают научно обоснованного лечения, а некоторые врачи попросту игнорируют лечение данного заболевания, сосредоточившись исключительно на патологии в рамках своей специальности [97,115].

Облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей в 10-15% является причиной острой ишемии конечности, в 85-90% является причиной развития хронической ишемии нижних конечностей (ХИНК). Основное клиническое проявление ХИНК – перемежающаяся хромота (ПХ) проявляется снижением толерантности к физической нагрузке, в виде уменьшения дистанции без болевой ходьбы. Приблизительно у 20% пациентов с ОААНК отсутствуют клинические проявления (бессимптомная стадия заболевания), иногда потому, что пациенты недостаточно активны, чтобы возникли клинические проявления хронической ишемии нижних конечностей. У некоторых больных наблюдаются атипичные симптомы (например, неспецифическое снижение толерантности к физической нагрузке, боль в тазобедренном или других суставах). Постепенное

поражение артериального русла нижних конечностей приводит к уменьшению дистанции без болевой ходьбы и появлению боли в конечности в покое и/или развитию трофических нарушений; данные симптомы характеризуют наиболее опасную стадию ОААНК – критическую ишемию нижних конечностей (КИНК). Эти стадии заболевания гораздо сложнее поддаются консервативной терапии и в большинстве случаев требуют оперативного вмешательства [86]. В свою очередь, большое значение в скорости течения заболевания и в возможных клинических проявлениях играет уровень наиболее выраженного поражения артериального русла. Высокий уровень поражения, затрагивающий аорту и подвздошные артерии, может вызвать боль при ходьбе в ягодичных мышцах, мышцах бедра или голени, а также эректильную дисфункцию у мужчин (синдром Лериша). При бедренно-подколенном поражении симптомы перемежающей хромоты обычно проявляются в икроножных мышцах, пульс на подколенной артерии и магистральных артериях голени отсутствует. При поражении берцовых артерий можно пальпировать пульсации на артериях бедренно-подколенного сегмента, однако пульс на берцовых артериях отсутствует, данный тип поражения наиболее часто ассоциирован с трофическими нарушениями [18]. Традиционно применяемая консервативная терапия, включающая антикоагулянты, антиагреганты, и ангиопротекторы, оказывается недостаточно эффективной и лечение заканчивается ампутацией у 37% больных в течение 1 года. Рекомендующим методом лечения критической ишемии является операция, направленная на прямую реваскуляризацию целевых артерий пораженной конечности. Эндоваскулярные методы, в виду своей малоинвазивности, являются предпочтительными. Адекватная реваскуляризация нижних конечностей на практике оказывается возможной лишь у 37,3-58% пациентов. В свою очередь, отдаленные результаты подобных операций нельзя назвать удовлетворительными. Эффект от оперативного вмешательства сохраняется в течение 1 года в 49-72,4% наблюдений при реконструктивных вмешательствах на артериях подвздошно-бедренного и бедренно-подколенного сегментов, и только в 10,1-39% при вмешательствах на магистральных артериях голени [16].

Одной из основных причин снижения эффективности эндоваскулярных вмешательств остаётся рестеноз. Рестеноз – повторное сужение артерии в месте баллонной ангиопластики и/или установки стента, в результате которого артериальный просвет в зоне вмешательства стенозируется более чем на 50%. Повторное сужение просвета артерии в результате процессов формирования неоинтимы, фиброза, эндотелиально-мезенхимального перехода снижает приводит к повышению ригидности сосудистой стенки, что в свою очередь осложняет проведение повторного открытого или эндоваскулярного вмешательства на артериях данного сегмента [8]. До конца механизмы развития рестеноза не известны. Факторы, предрасполагающие развитие рестеноза, подразделяются на две основные группы. Внешние факторы связаны с механическим воздействием на артериальную стенку. Внутренние факторы, связанные с процессами воспаления, тромбообразования и последующей гиперплазией интимы артерий в зоне оперативного вмешательства. При эндоваскулярных оперативных вмешательствах наибольшему механическому воздействию подвержена интима артерии, представленная эндотелиоцитами. В результате повреждения, в стенке артерии развивается воспаление, что оказывает дополнительное негативное воздействие эндотелий поврежденной стенки артерии [19].

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

Учитывая вышеизложенное, актуальным видится решение вопроса

прогнозировании рестеноза и способов влияния на каскад механизмов данного явления.

Степень разработанности темы

Определение роли эндотелиально-мезенхимального перехода в развитии рестенозов после эндоваскулярного лечения пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей является одной из актуальных проблем современной сердечно-сосудистой хирургии. На протяжении длительного периода времени данная тема изучалась многими ведущими специалистами. В большей степени исследовалось влияние данного механизма развития рестеноза в контексте эндоваскулярного лечения ишемической болезни сердца, однако всё чаще группы исследователей изучают влияние эндотелиально-мезенхимального перехода на развитие рестеноза после эндоваскулярных вмешательств на артериях нижних конечностей при облитерирующем атеросклерозе, а также изучают способы ингибирования EndMT. [13, 126]

Существует целый ряд *in vitro* исследований данного явления, предложены способы верификации EndMT, основанные на определении относительного количества белков-маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода, эндотелиальных и мезенхимальных. Ряд авторов предлагают различные модели для индукции EndMT [21, 31, 52]. Kun Zhou и соавторы в своём обзоре заявляют о большой необходимости подробного определения роли EndMT в патогенезе различных сердечно-сосудистых заболеваний. А также о необходимости поисков механизмов регуляции EndMT [33]. Однако роль эндотелиально-мезенхимального перехода в развитии рестеноза и способы влияния на данный процесс до сих пор остаются неизвестными.

Цель исследования

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

диагностических алгоритмов.

Задачи исследования

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

2. Изучить относительное количество маркеров EndMT: эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1 в первичных культурах HUVEC в экспериментальной модели баллонной ангиопластики *in vitro*, в том числе при воздействии сулодексида в концентрациях (0,1 ЛЕ/мл, 0,25ЛЕ/мл, 0,5ЛЕ/мл, 1ЛЕ/мл, 5ЛЕ/мл).

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

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

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

Научная новизна

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

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

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

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

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

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

Теоретическая значимость работы

В рамках экспериментальной части исследования проведено *in vitro* изучение экспрессии маркеров EndMT, а также оценка миграционной активности

первичных культур HUVEC в модели баллонной ангиопластики, в том числе при воздействии сулодексида.

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

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

Практическая значимость работы

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

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

Методология и методы исследования

Исследование является проспективным, когортным, разделённым на экспериментальную и клиническую части. В экспериментальной части

производилось *in vitro* изучение миграционной, метаболической активности эндотелиоцитов в модели баллонной ангиопластики, а также изучение относительного количества маркеров EndMT (эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1) в первичных культурах HUVEC в различных условиях. В клинической части исследования изучался уровень маркеров EndMT (эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1) у пациентов с ОААНК. Экспериментальная часть исследования проводилась *in vitro* на первичной культуре HUVEC производилась оценка метаболической и миграционной активности первичной культуры эндотелиоцитов (HUVEC) в модели баллонной ангиопластики и добавления в кондиционную среду препарата сулодексид *in vitro* в различных его концентрациях (0,1 ЛЕ/мл, 0,25ЛЕ/мл, 0,5ЛЕ/мл, 1ЛЕ/мл, 5ЛЕ/мл), а также произведена оценка относительного количества белков-маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода (эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1) при инкубации культур клеток с сулодексидом в различных его концентрациях (0,1 ЛЕ/мл, 0,25ЛЕ/мл, 0,5ЛЕ/мл, 1ЛЕ/мл, 5ЛЕ/мл) с использованием методики вестерн-блот. В клиническую часть исследования было включено 90 человек: 80 пациентов с ОААНК с хронической ишемией нижних конечностей II-IV стадии заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна; кроме того, дополнительно было включено 10 добровольцев для оценки уровня исследуемых маркеров в популяции условно здоровых людей без подтверждённых признаков атеросклероза. Пациентам проводилось УЗДГ зоны оперативного вмешательства, определялось значение ЛПИ и проводился иммуноферментный анализ (ИФА) для оценки уровня маркеров EndMT (эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1) в сыворотке/плазме пациентов на фоне эндоваскулярного или консервативного лечения. Затем все полученные данные подвергались статистической обработке.

Положения, выносимые на защиту

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

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

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

4. Развитие неблагоприятных исходов после эндоваскулярного лечения пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (рестенозов, прогрессирования стадии ХИНК, летальных исходов) ассоциируется с изменёнными уровнями маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода (эндотелиальных – CD31, vWF, мезенхимальных – VIM, интегрального маркера EndMT – TGF β 1) в крови пациентов, значением ЛПИ и возрастом пациентов.

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

Внедрение результатов исследования в практику и учебный процесс

Результаты исследования внедрены в лечебную работу отделения сосудистой хирургии Государственного бюджетного учреждения Рязанской

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

Степень достоверности результатов апробация результатов

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

Результаты диссертации были доложены и обсуждены на XXIX Международной конференции «Горизонты современной ангиологии, сосудистой и рентгенэндоваскулярной хирургии» (Москва, 2024); Международной научно-практической конференции «Экспериментальные и клинические аспекты микроциркуляции и функции эндотелия» (Смоленск, 2024); конференции «Актуальные вопросы сердечно-сосудистой хирургии» (Курск, 2024); 2-ом Рязанском кардиологическом конгрессе (Рязань, 2024); XXXX Международной конференции «Горизонты современной ангиологии, сосудистой и рентгенэндоваскулярной хирургии» (Санкт-Петербург, 2025).

Личный вклад автора

Вклад автора состоит в непосредственном участии и является определяющим на всех этапах исследования: от постановки целей и задач до обсуждения результатов в научных публикациях. Автор исследования в рамках экспериментальной части самостоятельно выполнил моделирование баллонной ангиопластики *in vitro*, принимал непосредственное участие в проведении

экспериментов по определению метаболической и миграционной активности первичных культур HUVEC, в том числе при инкубации с сулодексидом. В рамках клинической части исследования автор самостоятельно провел оперативные вмешательства большей части пациентов, включённых в исследование, выполнил сбор всех материалов, осуществлял оценку результатов исследования, сформировал базу данных и проводил дальнейший анализ ее результатов.

Публикации

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

Структура и объем диссертации

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Состояние проблемы лечения пациентов с ОААНК

1.1.1. Распространенность патологии

Растущее бремя хронических неинфекционных заболеваний, в первую очередь, сердечно-сосудистых (ССЗ), представляет собой большую опасность для здоровья населения многих стран, ухудшая качество и снижая продолжительность жизни. В мире около трети всех смертей происходит от болезней системы кровообращения (85% из них – по причине инфаркта или инсульта), более 75% приходится на страны с низким и средним уровнем экономического развития. В России заболеваемость ССЗ составляет более 19% в структуре всех болезней, смертность доходит до 50%. Эксперты Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) прогнозируют дальнейший рост заболеваемости и смертности от ССЗ от года к году. Данный прогноз роста заболеваемости характерен как для развитых, так и развивающихся стран. Эта тенденция обусловлена ухудшением демографических показателей (старение населения), ростом числа неинфекционных заболеваний (НИЗ), ухудшением экологической обстановки, снижением качества продуктов питания, гиподинамией, а также высоким числом людей с никотиновой зависимостью [27]. В Российской Федерации заболевания сердечно-сосудистой системы в 56,9% случаев являются причиной летального исхода. В свою очередь наиболее частой причиной развития ССЗ остается атеросклероз, он же является основной причиной смертности во многих других развитых и развивающихся странах [44]. Облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей (ОААНК) следует рассматривать как одно из проявлений системного атеросклероза, распространенность которого среди населения составляет в среднем 2-3%. При этом у 40-50% таких пациентов развивается критическая ишемия нижних конечностей (КИНК). Заболевание отличается прогрессирующим течением, существенно повышая риск утраты конечности и

инвалидизации, что особенно актуально для трудоспособного населения. Это, в свою очередь, приводит к значительным социально-экономическим потерям для общества. В развитых странах ежегодно регистрируется до 20 ампутаций на каждые 100000 человек населения, что эквивалентно четырём ампутациям на каждого четвертого пациента с диагностированной критической ишемией., однако стоит учитывать уровень ампутации, так как не каждая ампутация приводит к инвалидизации, но в свою очередь любое оперативное вмешательство оказывает нагрузку на систему здравоохранения. Ампутация конечности при хронической ишемии нижних конечностей (ХИНК) зачастую происходит спустя длительный период после появления первых признаков заболевания – от 3 до 5 лет в 10-40% случаев. Это связано с тем, что пациенты не всегда своевременно обращаются за медицинской помощью. Более того, чем выше уровень ампутации, тем выше риск летального исхода. В частности, летальность после высоких ампутаций достигает 20-45% в общей популяции. Для пожилых людей (старческого возраста) этот показатель значительно выше – 50-60%. В целом, пятилетняя выживаемость после ампутации нижней конечности на уровне бедра, составляет приблизительно 30%. Таким образом, промедление в лечении ХИНК и высокий уровень ампутации являются серьезными факторами, негативно влияющими на прогноз выживаемости пациентов с ОААНК [23].

По возрастным категориям ОААНК распространяется неравномерно: так, атеросклероз артерий нижних конечностей практически не встречается у людей до 50 лет, однако у пациентов старше 70 лет атеросклероз выявляется примерно у 20% людей. В связи с общемировой тенденцией увеличения продолжительности жизни растет и число случаев патологии артерий нижних конечностей, вызванной атеросклерозом [7].

Атеросклероз артерий нижних конечностей можно неинвазивно диагностировать с помощью определения лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ), отношения систолического давления, измеренного при помощи доплерографии на тыльной артерии стопы и/или задней большеберцовой артерии на каждой ноге к систолическому давлению на плечевой артерии. Значение ЛПИ менее 0,90

имеет чувствительность от 57% до 79% и специфичность от 83% до 99% для артериального стеноза не менее 50%. Перемежающаяся хромота, представляющая из себя боль в икроножных мышцах при физической нагрузке, которая начинается после начала ходьбы и проходит в течение 10 минут после отдыха, считается классическим симптомом заболевания периферических артерий. Однако, от 70% до 90% людей со значением ЛПИ менее 0,90 либо не сообщают о наличии болевых симптомов со стороны нижних конечностей при нагрузке, либо сообщают о симптомах со стороны нижних конечностей при ходьбе, которые не соответствуют классической перемежающейся хромоте. Со временем люди с заболеваниями периферических артерий (ЗПА) ограничивают активность ходьбы или замедляют скорость ходьбы, чтобы избежать болевых ощущений. Таким образом, хотя примерно 75% людей с ЗПА сообщают об отсутствии изменений в симптомах со стороны нижних конечностей с течением времени, у данной когорты лиц наблюдается значительно большее ежегодное снижение производительности теста 6-минутной ходьбы по сравнению с людьми без ЗПА. Примерно у 11% людей с ЗПА развивается критическая ишемия нижних конечностей, самая тяжелая форма ЗПА, которая требует оперативного вмешательства в срочном порядке. По сравнению с людьми без ЗПА, у лиц с этим заболеванием примерно в два раза выше уровень смертности от всех причин, сердечно-сосудистой смертности и основных коронарных событий при 10-летнем наблюдении [37, 105, 117].

Главными целями лечения больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей являются устранение симптомов заболевания, сохранение конечности и улучшение качества жизни пациента, а также для снижения риска развития других сердечно-сосудистых заболеваний. По статистическим данным, только половине пациентов с ОААНК оперативное вмешательство проводится в сроки наиболее благоприятные для наилучшего прогноза, лечение 25% пациентов ограничивается консервативными методами, 25% выполняют первичную ампутацию. В большинстве случаев исключительно консервативное лечение КИНК приводит к ампутации конечности в течение 6

месяцев от начала проявления симптомов. К завершению первого года, из всех пациентов с подтверждённым диагнозом критической ишемии нижних конечностей, у 45% удастся сохранить конечность, 30% продолжают жить после ампутации, а в 25% случаев наступит летальный исход [14]. Развитие эндоваскулярных методов лечения существенно расширяет возможности по сохранению конечности при сосудистых патологиях. Тем не менее, проблема рестеноза остаётся одним из ключевых вызовов после проведения чрескожной реваскуляризации у пациентов с поражением периферических артерий. Несмотря на применение консервативной терапии, включающей низкомолекулярные гепарины, ацетилсалициловую кислоту, ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов тромбоцитов и другие медикаментозные средства, её эффективность в снижении риска возникновения этого осложнения остаётся ограниченной [98, 115].

1.2 Консервативное лечение пациентов с ОААНК

В настоящее время существует большое количество препаратов, используемых для консервативной терапии больных с ОААНК. К основным группам относятся статины, антиагреганты, наряду с ними применяются вазоактивные препараты, и антикоагулянты.

Терапия статинами необходима всем пациентам с атеросклерозом, применение препаратов данной группы снижает риск летального исхода у пациентов с ОААНК на 25% в сравнении с пациентами получающими плацебо [79]. Помимо статинов высокую эффективность в развитии неблагоприятных исходов со стороны сердечно-сосудистой системы доказали антиагреганты (аспирин и клопидогрел) [26].

Помимо снижения риска неблагоприятных исходов, современная терапия пациентов с ОААНК направлена в том числе и на улучшение качества жизни, путём увеличения дистанции безболевого ходьбы, по данным мета-анализа, 11 рандомизированных слепых исследований с плацебо-контролем свою эффективность в увеличении данного критерия доказал препарат сулодексид

[132]. Данный препарат широко используется в клинической практике для лечения различных заболеваний, связанных с артериальной патологией и венозной недостаточностью. Механизм действия данного препарата включает антикоагулянтные, антиагрегантные и ангиопротекторные свойства, что делает его объектом изучения в контексте влияния на сосудистый эндотелий. Сулодексид относится к группе гликозаминогликанов (ГАГ), состоящего из гепариноподобной фракции (80%) и дерматансульфата (20%). Препарат обладает ангиопротективным действием – имеет высокий тропизм к сосудистой стенке. До (90%) основного действующего вещества поглощается эндотелием. Препарат восстанавливает плотность отрицательного электрического заряда базальной мембраны и целостность сосудистой стенки. Сулодексид обладает антитромботическим действием, препарат подавляет активированный фактор Ха, тромбин, стимулирует синтез и секрецию простагландина I₂. Сулодексид имеет фибринолитическое свойство, он провоцирует выделение тканевого активатора плазминогена (t-PA) и уменьшает содержание в крови ингибитора тканевого активатора плазминогена. Учитывая высокую тропность данного препарата к эндотелию и высокую частоту назначения для консервативного лечения пациентов с ОААНК, а также отсутствие *in vitro* исследований на культуре клеток HUVEC существует потребность в подробном изучении влияния данного препарата на эндотелий человека в условиях *in vitro* [41, 131, 141].

1.3 Рестеноз при эндоваскулярных вмешательствах

Проблема развития рестеноза после баллонной ангиопластики появилась одновременно с внедрением данного метода лечения пациентов с ОААНК в клиническую практику. Периферический стент по аналогии с коронарным, являющийся по своей сути внутрисосудистым протезом, частично решил проблему эластического спадания стенок сосуда, однако, помимо этого, была выявлена новая проблема – рестеноз внутри стента, возникающий преимущественно из-за разрастания неоинтимы, состоящей в основной своей

массе из гладкомышечных клеток (ГМК) и межклеточного матрикса [45]. В настоящее время выделяются четыре основные стадии формирования рестеноза, характеризующие процессы восстановления сосудистой стенки после полученного механического повреждения. Первая стадия, тромботическая (1–2 сутки), связана с формированием тромба в области проведения баллонной ангиопластики или установки стента. Вторая стадия, этап пролиферации и миграции гладкомышечных клеток сосудистой стенки в интиму, охватывает временной интервал от 1–7 дней до примерно трех месяцев. Третья стадия сопровождается процессами эндотелиально-мезенхимального перехода и формированием неоинтимы, которая представляет собой фиброзную оболочку, возникающую на внутренней поверхности установленного стента, либо в зоне ангиопластики, вследствие пролиферации измененного эндотелия в просвет артерии или стента. Наконец, четвертая стадия характеризуется развитием самого рестеноза, обусловленного комплексом морфологических изменений в стенке артерии; этот процесс продолжается в диапазоне от 7 дней до 3–6 месяцев [25]. Частота возникновения рестенозов в области хирургического вмешательства на артериях бедренно-подколенного сегмента в течение первого года составляет от 35 до 42%, а за период в три года увеличивается до диапазона от 37 до 44% [11]. Согласно данным ретроспективного исследования, проведенного Conrad M., эндоваскулярные вмешательства на артериях бедренно-подколенного сегмента позволили достигнуть оптимальных результатов реваскуляризации в 97% случаев. При хронической ишемии 2Б степени тяжести стадии по классификации Покровского-Фонтейна показатели первичной проходимости составили 54,3%, вторичной проходимости — 92,6%, а сохранение конечности отмечалось в 95,4% случаев. Для пациентов с ишемией тяжелее стадии 2Б первичная проходимость через три года составила 40,8%, вторичная проходимость оставалась на уровне 92,6%, а сохранение конечностей фиксировалось в 89,7% случаев. Однако, за счет постепенного развития коллатералей в большинстве случаев у пациентов после эндоваскулярного лечения удавалось избежать высоких ампутаций, что позволяло сохранить опорную функцию конечности [38]. На данный момент

осуществляются попытки фармакологически влиять на развитие рестеноза, однако пероральное применение препаратов способно в достаточной мере влиять на механизмы развития рестеноза. Данное явление связывают невозможностью достижения терапевтической концентрации препарата в зоне оперативного вмешательства [76].

В настоящее время существует три основных способа доставки препарата к зоне баллонной ангиопластики либо стентирования. Наибольшее распространение получил способ нанесения препарата на поверхность стента либо баллона; второй – включение препарата в состав биodeградируемого стента, третий – нанесение препарата совместно с полимером на поверхность стента либо баллона. В состав препарата, покрывающего стенты, и баллоны входят антимикотики (актиномицин); стероидные противовоспалительные препараты (дексаметазон); препараты, улучшающие репарацию тканей (17 β -эстрадиол и суспензии клеток-предшественников эндотелия); иммуносупрессоры (сиролимус, такролимус, эверолимус, микофеноловая кислота). Были созданы стенты, содержащие гены с нативной плазмидной ДНК, благодаря которым удалось существенно замедлить формирование неоинтимы и ускорить процесс реэндотелизации. Использование стентов и баллонов с лекарственным покрытием позволяет в значительной мере снизить частоту развития рестеноза [4]. Снижение риска развития рестеноза приводит к снижению частоты повторных вмешательств, что улучшает качество жизни пациентов, снижает экономическую нагрузку на здравоохранение. Исследования показали, что не рекомендовано применять БЛП при поражениях артерий нижних конечностей более 25 см [29].

Однако, группа авторов, проводя анализ исследований, направленных на изучение влияния баллонов с лекарственным покрытием на процессы развития рестеноза, не получила достоверных ассоциаций применения баллона с лекарственным покрытием и риском развития рестеноза. Помимо этого, в полной мере не изучены механизмы влияния препаратов применяемых для покрытия баллонов на факторы, предрасполагающие к развитию рестеноза [3].

1.4 Причины развития рестеноза

Выделяют несколько потенциальных причин развития рестеноза, внешние (механическое воздействие на артерию в результате оперативного лечения либо травмы) и внутренние (каскад биохимических реакций в ответ на внешнее воздействие), в результате этих причин развивается воспаление, тромбообразование с последующей пролиферацией ГМК и фиброзом повреждённого места [19].

В настоящее время выявлено множество генов, связанных с развитием атеросклероза, которые также оказывают влияние на частоту возникновения и степень тяжести рестеноза. Первая категория генов кодирует белки, участвующие в регуляции метаболизма и транспорта липидов. Вторая категория включает гены, которые контролируют регуляцию уровня артериального давления. Третья группа объединяет гены, кодирующие белки, участвующие в процессах воспаления, апоптоза и клеточной пролиферации [24]. Степень прогрессирования рестеноза во многом зависит от протяженности повреждения артерии; ещё одним неблагоприятным фактором является избыточное растяжение артериальной стенки при ангиопластике. В свою очередь повреждение внутренней стенки запускает целый каскад процессов, ключевое место в котором занимает эластическое ремоделирование, активирующее пролиферацию гладкомышечных клеток (ГМК) в артериальной стенке. Утолщение комплекса «интима-медиа» связано с активацией, пролиферацией и миграцией гладкомышечных клеток, а также с перестройкой клеточных структур и экстрацеллюлярного матрикса сосудистой стенки. В ходе этого процесса толщина артериальной стенки увеличивается, её эластичность уменьшается, и стенка приобретает ригидность. Одновременно гибель мигрировавших гладкомышечных клеток ослабляет фиброзное покрытие атеросклеротической бляшки из-за сокращения синтеза внеклеточного матрикса, что в итоге приводит к разрыву этой бляшки [1, 36, 88, 91, 106].

В современном понимании ключевым патогенетическим механизмом,

ответственным за развитие рестеноза после эндоваскулярных оперативных вмешательств на артериях нижних конечностей, является эндотелиально-мезенхимальный переход (endothelial mesenchymal transition EndMT). Углубленное изучение механизмов этого процесса и разработка способов его предотвращения способны значительно сократить частоту случаев рестеноза, повысить эффективность долгосрочных результатов эндоваскулярного лечения, улучшить качество жизни пациентов, а также уменьшить финансовые затраты, связанные с проведением повторных вмешательств [20].

1.5 Эндотелиально-мезенхимальный переход

EndMT является одним из наиболее изучаемых феноменов сосудистой и, в частности, эндотелиальной биологии. С одной стороны, данный процесс играет важную физиологическую роль в биологии индивидуального развития, с другой – обладает несомненной патофизиологической значимостью в развитии атеросклероза, рестеноза и фиброза.

Эндотелиально-мезенхимальный переход— это динамический процесс, в котором эндотелиальные клетки подавляют составляющие эндотелиальные свойства и принимают поведение мезенхимальных клеток. В начале данного процесса ослабляются межклеточные контакты эндотелиальных клеток, разрушается базальная мембрана, и мигрируют в периваскулярное окружение. Это первоначальное поведение эндотелия отражает временную модуляцию клеточного фенотипа, то есть фенотипическую модуляцию, которую иногда называют частичным переходом эндотелиальных клеток в мезенхимальные гладкомышечные клетки. Ослабление эндотелиальных соединений и миграция также наблюдаются в условиях воспаления и неоангиогенеза, так что эндотелиальные клетки, инициирующие переход из эндотелия в мезенхиму, имеют перекрывающееся поведение и экспрессию генов с эндотелиальными клетками, реагирующими на воспалительные сигналы или, образующими новые кровеносные сосуды [22, 65].

При различных патофизиологических условиях эндотелиальные клетки теряют экспрессию маркеров, специфичных для эндотелиальных клеток, таких как молекула адгезии тромбоцитов к эндотелиальным клеткам CD31 (PECAM 1) /тромбоцитарно-эндотелиальная клеточная молекула, фактор фон Виллебранда (vWF) и сосудисто-эндотелиальный кадгерин, и приобретают экспрессию маркеров мезенхимальных клеток, таких как α -гладкомышечный актин, N-кадгерин, виментин (VIM), фибробластспецифический белок-1 и коллагены. EndMT индуцируется многочисленными различными путями, запускаемыми и модулируемыми множеством различных и часто избыточных механизмов в зависимости от патофизиологического статуса клетки. EndMT играет важную роль в эмбриональном развитии. Среди сердечно-сосудистых заболеваний помимо атеросклероза, аберрантный EndMT наблюдается при, легочной гипертензии, клапанных заболеваниях и фиброзе миокарда [64, 96, 116].

В процессе EndMT наблюдается уменьшение экспрессии эндотелиальных маркеров, включая VE-кадгерин и CD31, одновременно с увеличением экспрессии мезенхимальных маркеров, таких как α SMA, N-кадгерин, кальпонин, VIM, коллаген I типа и фибронектин [46, 68, 70, 92].

Существует несколько сигнальных путей, задействованных в процессе эндотелиально-мезенхимального перехода (EndMT). Наиболее значимыми среди них являются Gata4 – Twist1 – Snail1, а также пути Snail2, Wnt, Notch и TGF- β . Ключевую роль в управлении EndMT во время эмбрионального развития играют транскрипционные факторы Gata4, Twist1, Snail1 и Slug (Snail2). Интересно, что именно Snail, Slug и Twist1 регулируют этот процесс в ходе формирования эндокардиальных подушек в атриовентрикулярном канале сердца [46, 70, 92]. Slug и Twist подавляют экспрессию эндотелиальных маркерных генов, включая VE-cadherin, CD31 и Claudin-5, одновременно усиливая экспрессию мезенхимальных генов. Более того, присутствие Snail1 обнаружено в эндотелиальных клетках, покрывающих бляшки коронарных артерий у человека, тогда как Gata4, Twist1 и Snail1 экспрессируются в эндотелиальных клетках аорты у мышей. Показано, что Gata4 регулирует экспрессию Twist1, который, в свою

очередь, запускает активацию Snail1 в данных клетках. Однако механизмы работы вышестоящих регуляторов и точно определенные мишени этого сигнального пути пока остаются недостаточно изученными. Предполагается, что они могут включать сигнальные каскады TGF- β , Notch или Wnt. Исследования показали, что удаление Gata4 или Twist1 из эндотелиальных клеток у мышей приводит к уменьшению площади атеросклеротических поражений в сосудах. Это подчеркивает важность пути Gata4–Twist1–Snail1 в развитии данной патологии. В связи с этим углубленное изучение EndMT в эндотелиоцитах человеческих артерий имеет ключевое значение для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе атеросклероза. [90, 100, 101].

Сигнальный путь Notch активирует процесс EndMT как *in vivo*, так и *in vitro* посредством действия гена Notch1. Основой этого процесса служит каноническая сигнализация Notch, при которой NICD1 перемещается в ядро клетки, где регулирует транскрипцию соответствующих целевых генов, таких как SLUG из семейства SNAIL и нижестоящий эндотелиальный белок клеточной адгезии (VE-кадгерин), работая синергически с сигнальными путями BMP и TGF- β . Однако его роль в митохондриях остается неизвестной. Интересно, что помимо своей канонической роли в определении судьбы клетки, Notch передает метаболические сигналы окружающей среды, такие как уровень глюкозы в плазме и количество липидов низкой и очень низкой плотности, для регулирования внутриклеточного метаболизма питательных веществ и перепрограммирования клеточного энергетического метаболизма [113].

Сигнальный путь TGF- β является наиболее изученным, который, как известно, индуцирует EndMT и действует через различные внутриклеточные контакты. Сигнальный путь обычно активируется суперсемейством лигандов TGF- β , которые включают, три изоформы TGF- β (TGF- β 1, 2 и 3) и шесть изоформ BMP (BMP2 через BMP7). Данные изоформы принимают участие в EndMT, включая онкологические процессы и развитие фиброза, регулируются посредством TGF- β , тогда как TGF- β 2 в первую очередь контролирует EndMT в эмбриогенезе сердца, а TGF- β 3 опосредует эпителиально-мезенхимальный (ЭМП)

переход в эмбриогенезе неба. BMP4 индуцируют ЭМП при раке и EndMT в эмбриогенезе сердца. Передача сигналов TGF- β происходит посредством образования гетеротетрамерного рецепторного комплекса, состоящего из рецепторов TGF- β типа I и типа II (TGF- β RI и TGF- β RII) [55, 56, 136].

Сигнальный путь Wnt осуществляет передачу через плазматическую мембрану благодаря рецепторам Frizzled и белка, связанного с рецепторами липопротеинов низкой плотности. При отсутствии сигнализации β -катенин фосфорилируется комплексом GSK-3 β , Axin и супрессором опухолей adenomatous polyposis coli, который изолирует β -катенин в цитоплазме и помечает его для протеасомной деградации. Активация рецепторов Frizzled лигандами Wnt приводит к фосфорилированию GSK-3 β и привлечению Dishevelled и Axin к плазматической мембране. Неспособный образовать комплекс с Axin, GSK-3 β не может затем фосфорилировать β -катенин, что позволяет ему перемещаться в ядро. Ограничение GSK-3 β цитоплазмой после активации Wnt- β -катенина также предотвращает дестабилизирующее фосфорилирование Snail1. Все пути EndMT тесно связаны друг с другом, однако каждому отведена определённая роль [58, 75, 147].

1.6 Эндотелиально-мезенхимальный переход при атеросклерозе и рестенозе

Одно из ключевых значений в развитии атеросклероза отводится накоплению мезенхимальных клеток в интима артерии. Мезенхимальные клетки секретируют провоспалительные молекулы и синтезируют белки внеклеточного матрикса и металлопротеазы, которые способствуют росту атеросклеротических бляшек и оказывают влияние на морфологию её покрышки [125, 134]. Ряд публикаций отмечает роль мезенхимальных клеток в формировании неоинтимы в зоне анастомозов при открытых оперативных вмешательствах [35, 130]. В рамках современных научных исследований авторы выдвигают гипотезу о значительном участии эндотелиальных клеток в формировании мезенхимальных клеток неоинтимы, выявляемых в области эндоваскулярных вмешательств на

коронарных артериях и артериях нижних конечностей. Установлено, что клетки неинтимы обладают уникальной способностью экспрессировать как эндотелиальные маркеры, такие как PECAM-1, Endocan и VE-кадгерин, так и мезенхимальные белковые маркеры, включая α -SMA, Notch3, Snail, SM22 α , белок, ассоциированный с фибробластами (FAP) и VIM [50, 62, 100, 105]. Помимо прямого механического повреждения интимы, большое влияние на эндотелий оказывает ток крови, обуславливающий напряжение сдвига, которое ориентированно по касательной к интима артерии. Эндотелиоциты воспринимает данное воздействие благодаря механорецепторам, которые преобразуют механические стимулы в биохимические сигналы [78]. Считается, что это напряжение играет решающую роль в адаптации сосудистой стенки, вызывая выработку таких веществ, как эндотелин, простациклин и оксид азота в эндотелиальных клетках [5]. Помимо этого, на сосудистую стенку воздействует осевое напряжение — это сила, которая действует на кровеносные сосуды. Оно описывает перпендикулярную силу, оказываемую на стенку сосуда внутрипросветным давлением. Пролиферация эндотелиальных и сосудистых гладкомышечных клеток происходит в ответ на увеличение осевого напряжения, вызванного растяжением артерий, тогда как напряжение сдвига и окружающая деформация остаются неизменными [89, 145]. Доказано, что вышеуказанные сигнальные пути возникают в эндотелиоцитах в местах изменения тока крови. Это может указывать на то, что изменения кровотока, вызванные атеросклеротическими или механическими повреждениями интимы, способны приводить к эндотелиально-мезенхимальному переходу через активацию сигнальных путей FGF и TGF- β , а также факторов Gata4-Twist1-Snail [101]. Изменение напряжения сдвига способствует не только активации продукции таких факторов, как Snail, Twist1 и Gata4, но также активирует сигнальные пути, связанные с воспалительными процессами, что в свою очередь стимулирует развитие эндотелиально-мезенхимального перехода при атеросклерозе [137].

Повреждение интимы приводит к развитию окислительного стресса в

эндотелиальных клетках вследствие высвобождения активных форм кислорода. Повышенная экспрессия Snail, Twist1 и Gata4 в эндотелиоцитах способствует изменениям их морфологии и активации маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода, сопровождаясь одновременным снижением экспрессии генов, характерных для эндотелиальных клеток. Это свидетельствует о том, что EndMT инициируется окислительным стрессом, вызванным изменениями напряжения сдвига, что в свою очередь усиливает сосудистое воспаление, стимулирует пролиферацию и вызывает апоптоз эндотелиальных клеток [63, 66]. Помимо этого, провоспалительных цитокины, такие как TNF- α , IL-1 β и их комбинации индуцируют процессы эндотелиально-мезенхимального перехода. EndMT индуцированный провоспалительными цитокинами, характеризуется потерей эндотелием белков-маркеров PECAM-1, Endocan и VE-кадгерин и индукцией мезенхимальные белков-маркеров: α SMA, Notch3, Snail, SM22 α . Данный процесс контролируется медиаторами EndMT, такими как zinc-finger E-box binding homeobox 1, β -катенин, Akt / NF- κ B, Notch1, BMP-4, Sp1, фосфоинозитид-3-киназа [99]. Проведенные исследования выявили, что фактор некроза опухоли- α (TNF- α) регулирует процесс эндотелиально-мезенхимального перехода (EndMT) через активацию сигнального каскада Akt/NF- κ B как в эмбриональном, так и в постнатальном эндотелии клапанов сердца. Установлено, что экспрессия белка EndMT, связанного с α -SMA, значительно усиливается под действием TNF- α , в то время как уровень VE-кадгерина существенно снижается в эндотелиальных клетках аортального клапана свиньи, но не в эндотелиоцитах аорты этой же модели. Эти результаты подчеркивают важность изучения молекулярного механизма EndMT с учетом гетерогенности эндотелиальных клеток в условиях воспалительного ответа. Известно, что клетки аортального клапана свиньи характеризуются различной степенью чувствительности к EndMT при воздействии TNF- α . В частности, была выявлена способность отличать две популяции клеток: те, которые сохраняют типичные эндотелиальные маркеры, и те, которые претерпевают трансформацию, характеризующуюся экспрессией мезенхимальных маркеров. С использованием трёхмерных систем

культивирования на базе мембран удалось оценить эти различия. Трансформирующиеся клетки демонстрировали изменённую экспрессию эндотелиальных маркеров, таких как VE-кадгерин и эндотелиальная NO-синтаза, а также приобретали мезенхимальные маркеры, включая α -SMA, Notch1, MMP-9, BMP-4 и TGF β . Эти изменения подчеркивают сложный характер молекулярных процессов, управляющих EndMT в PAVEC и их реакцию на провоспалительные стимулы [42, 69, 112, 124].

Недавние исследования установили, что эндотелиальная дисфункция, вызванная метаболическими нарушениями, включая ожирение, гипергликемию и дислипидемию, играет критическую роль в индукции эндотелиально-мезенхимального перехода (EndMT). Ряд научных работ продемонстрировал, что повышенная концентрация глюкозы способствует активации EndMT, что, в свою очередь, сопровождается увеличением экспрессии мезенхимальных маркеров, таких как α -SMA, FSP-1, коллаген I типа, фибронектин, виментин и MMP-2. Одновременно наблюдается снижение уровня экспрессии эндотелиальных маркеров, таких как CD31 и VE-кадгерин, что отмечается в различных типах эндотелиальных клеток [74, 80, 129, 135]. Исследования показали, что эндотелиально-мезенхимальный переход, вызванный повышенным уровнем глюкозы, происходит с участием таких сигнализующих молекул, как Smad2/3, Snail, Rho-ассоциированная киназа 1 (ROCK1), сывороточный фактор ответа (SRF), а также белки NOD2 и ERK в клетках эндотелия клубочков. Дополнительно установлено, что в эндотелиальных клетках аорты человека (HAEC) и эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC) гипергликемия также стимулирует EndMT путем активации регуляторных механизмов, включая ангиотензин II, поли(АДФ-рибозо)полимеразу 1 (PARP-1), эндотелин-1 (ET-1), Smad-, Akt-, p38- и ERK-зависимые пути. Кроме того, было выявлено, что окисленные липопротеины низкой плотности (ЛПНП) усиливают процессы EndMT в клетках HAEC, способствуя развитию атеросклероза. Напротив, липопротеины высокой плотности (ЛПВП) подавляют EndMT, индуцированный TGF β 1, что указывает на их возможные антифиброзные

свойства [74, 111, 123, 129].

1.7 Эндотелиальные маркеры EndMT

Учитывая вышесказанное, ряд эндотелиальных и мезенхимальных маркеров могут быть связаны как непосредственно с EndMT, так и косвенно. Рассмотрим ряд эндотелиальных маркеров, таких как CD31, vWF.

Молекулы клеточной адгезии-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1 или CD 31) участвуют в образовании межклеточных контактов, трансэндотелиальной миграции лейкоцитов, ангиогенезе и активации интегринов. Данная молекула была первоначально описана в середине 1980-х годов как дифференцированный антиген CD31, экспрессируемый на поверхности гранулоцитов, моноцитов и тромбоцитов человека [32, 39, 49, 83]. В то же время несколько других групп независимо сообщили о наличии антигена поверхности эндотелиальных клеток, известного также как гликопротеин (GP) IIa, GPIIa', антиген *hsc7* и EndoCAM, который сильно обогащался в межклеточных соединениях. Скрининг библиотеки экспрессии к ДНК эндотелиальных клеток с помощью антитела, специфичного для интегральных мембранных белков тромбоцитов, привел к клонированию белка массой 130 кДа, имеющего гомологию с недавно клонированными фрагментами молекул клеточной адгезии суперсемейства генов иммуноглобулинов (Ig), полученный белок был назван молекулой адгезии тромбоцитов / эндотелиальных клеток - 1 (PECAM-1/CD31), чтобы обозначить его происхождение путём клонирования, принадлежность к семейству и его вероятную функцию [30, 60, 84, 114].

Иммунохимическая и биохимическая характеристика вместе с его последующим клонированием из двух различных библиотек лейкоцитов установили, что соединительный белок эндотелиальных клеток, антиген гематопоетической дифференцировки CD31 и тромбоцитарный PECAM-1 являются идентичными образованиями, что облегчает исследование роли, которую эта молекула клеточной адгезии и сигнализации играет в биологии

клеток крови и сосудов человека [103, 104]. Существует ряд превосходных обзоров о функции CD31 в биологии тромбоцитов о его сигнальных функциях и о его роли в трансэндотелиальной миграции лейкоцитов и воспалении [85, 108, 109, 118, 148]. CD31 оказывает воздействие на эндотелиальные клетки, за счёт гомофильных адгезивных свойств внеклеточного домена CD31, а также влияет на регуляцию барьера проницаемости сосудов воздействуя на эндотелиальные клетки [48].

Фактор фон Виллебранда (vonWillebrand factor, vWF) – это гликопротеин, имеющий решающее значение для первичного гемостаза посредством адгезии тромбоцитов, субэндотелиального коллагена и внутреннего каскада коагуляции посредством стабилизации фактора VIII. Он находится в плазме, субэндотелиальном матриксе и гранулах хранения внутри эндотелиальных клеток и тромбоцитов. Эндотелиоциты экспрессируют данный белок в форме ультракрупных мультимерных структур, которые состоят из мономерных единиц, длина каждой из которых может достигать 40000 кДа. Эти мультимеры накапливаются в специализированных органеллах, называемых тельцами Вейбеля-Паладе (Weibel-Palade) [128]. В данных тельцах помимо vWF находятся белки, контролирующие тонус артериальной стенки [71, 110]. vWF связывает тромбоциты в месте повреждения сосудов, является носителем фактора VIII (FVIII), регулирует его уровень в крови [93]. Существует две основные формы vWF, в нормальных условиях, данный белок находится в глобулярной форме, при такой форме практически невозможна адгезия тромбоцитов. При патологических состояниях, когда происходит повреждение стенки артерии, глобулярная структура vWF мгновенно расправляется, превращаясь в платформу для прикрепления тромбоцитов. В раскрытой форме vWF становится субстратом для металлопротеазы ADAMTS-13, основная задача которой заключается в расщеплении гигантских мультимеров vWF [54]. Регуляция уровня антигена плазмы vWF (vWF: Ag) через процессы секреции и протеолиза, опосредованные ADAMTS-13, играет ключевую роль в контроле мультимерного распределения этого фактора и обеспечении его гемостатической активности. Повышенная

концентрация vWF в плазме крови связана с повышенным риском тромбозов различной локализации [59, 81, 82].

1.8 Мезенхимальные маркеры EndMT

Рассмотрим ряд мезенхимальных маркеров EndMT. Vimentin представляет собой белок цитоскелета различных типов клеток, включая эндотелиоциты, фибробласты, хондроциты, остециты. Этот белок используется как маркер мезодермальных тканей [142]. Во время EndMT эндотелиальные клетки претерпевают функциональные и поведенческие изменения, чтобы дифференцироваться в мезенхимальные клетки [15, 17]. Это событие имеет решающее значение для эмбрионального развития, регенерации тканей, гомеостаза и заживления ран. Эти изменения отмечены ключевыми событиями, включая потерю эпителиальных клеточных соединений, переключение с апикально-базальной полярности на переднезаднюю, морфологические изменения формы клеток и реорганизацию клеточного цитоскелета. Повышение уровня виментина является каноническим маркером EndMT, поскольку в мезенхимальных клетках доминирует виментин, а экспрессия виментина способствует трансформации клеток в более плоскую, удлиненную, мезенхимальную форму. Кроме того, виментин взаимодействует с микротрубочками и связанными с ними моторными белками, что может способствовать подвижности клеток. Фосфорилирование виментина также секвестрирует членов семейства 14-3-3 σ , которые являются важными факторами в EndMT из-за их контроля фосфорилирования Akt. Активная форма Akt фосфорилирует виментин в Ser39 и повышает уровень виментина, способствуя дальнейшему подвижному и инвазивному поведению [28, 34, 43, 77, 95, 140, 144]. Например, EndMT наблюдался при атеросклеротических поражениях и, как предполагается, связан с повышенным уровнем виментина [102]. Кроме того, мыши с нулевым уровнем виментина демонстрируют дефектную способность к ремоделированию артерий, повышенную жесткость артериальной стенки, и

эндотелиальную дисфункцию. Хотя повышенная жесткость артериальной стенки у мышей, лишенных виментина, вероятно, зависит от реорганизации эндотелиальной базальной мембраны, возможно, что виментин способствует фенотипическим изменениям во время EndMT [143].

Гладкомышечный актин (α -SMA) представляет собой изоформу актина, которая преобладает в гладкомышечных клетках сосудов и играет важную роль в фиброгенезе. α -SMA используется в качестве маркера для подгруппы активированных фиброгенных клеток, миофибробластов, которые считаются важными эффекторными клетками фиброгенеза тканей. Миофибробласты традиционно идентифицируются по совместной экспрессии коллагена I и α -SMA [57, 94, 127, 146]. α SMA не просто маркер миофибробластов, он также может увеличивать сократительную активность миофибробластов [122]. Было показано, что сократительная сила, генерируемая миофибробластами, способствует активации связанного с интегрином латентного трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF β 1), который является мощным фиброгенным фактором роста [107, 138]. Таким образом, миофибробласты считаются ключевыми активированными фиброгенными клетками для нормального заживления ран и аномального фиброгенеза тканей, а α SMA используется в качестве маркера фиброгенной активности активированных фиброгенных клеток тканей [149]. Однако недавнее исследование показало, что α -SMA является непоследовательным маркером фиброгенной функции [41]. Помимо эндотелиальных и мезенхимальных маркеров большую роль в развитии рестеноза в местах ангиопластики отводят трансформирующему фактору роста-бета (TGF β) [119].

Эндотелиально-мезенхимальный переход (EndMT) представляет собой потенциальный патогенетический механизм, который играет ключевую роль в развитии и прогрессировании атеросклероза, а также в формировании рестеноза. Этот процесс отличается сложностью и многогранностью, находясь под влиянием различных факторов и реализуясь через множество сигнальных путей и каскадов.

Заключение

Развитие рестеноза при заболеваниях артерий нижних конечностей, особенно после эндоваскулярных вмешательств, остается одной из актуальных проблем современной сердечно-сосудистой хирургии. Основной целью лечения пациентов с периферическим атеросклерозом является минимизация числа осложнений и сокращение количества повторных операций, что, в конечном итоге, способствует улучшению прогноза заболевания и снижению частоты инвалидизирующих высоких ампутаций. Среди множества изучаемых механизмов развития рестеноза одним из наиболее сложных считается процесс эндотелиально-мезенхимального перехода (EndMT). Дальнейшие исследования этого процесса и поиски способов воздействия на него позволяют углубить понимание патогенеза атеросклероза и связанных с ним осложнений, включая рестеноз. Это открывает перспективы для совершенствования диагностики и лечения больных с патологией периферических артерий, особенно в случае проведения эндоваскулярных оперативных вмешательств.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

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

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

2.1 Материалы и методы экспериментальной части исследования

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

В рамках диссертационного исследования *in vitro* на первичной культуре HUVEC производилась оценка метаболической и миграционной активности

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

2.1.1 Выделение первичных культур HUVEC

Для проведения эксперимента, предусмотренного диссертационным исследованием, использовались следующие материалы и оборудование:

- Лабораторные пластиковые изделия: культуральные флаконы размером 25 см² (Corning, арт. 430639) и 75 см² (Corning, арт. 430725), 12-луночный планшет (Corning, арт. 3512) с мембранными вставками Transwell (диаметр 6,5 мм, площадь роста 0,33 см², поры 0,4 мкм; арт. 3413);
- Питательная среда для эндотелиальных клеток ECGM (Cell Applications Sigma/Aldrich, арт. 211-500);
- Желатин для покрытия 12-луночных планшетоов (Stemcell Technologies, арт. 07903);
- Коллагеназа I типа (ThermoFisher, арт. 17100017);
- Трипсин-ЭДТА 0,25% (Stemcell Technologies, арт. 07901);
- Фосфатно-солевой буфер Дульбекко (DPBS) (Gibco, арт. 14190086);
- Антибиотик пенициллин-стрептомицин 1% (ПанЭко, арт. А063);
- Набор антител для иммуноцитохимических исследований: анти-vWF (Affinity, арт. AF3000, Китай), анти-CD31 (Affinity, арт. AF6191, Китай), анти-VIM (Affinity, арт. AF0292, Китай) и анти-TGF β 1 (Affinity, арт. AF1027, Китай);
- Лабораторное оборудование: ламинарный шкаф II класса защиты Mars 1200

ScanLaf (Дания), CO₂-инкубатор WS-180CS World Science (Корея), инвертированный микроскоп CKX41 Olympus (США), автоматический счетчик клеток Countess (Thermo Fisher, США).

Первичные культуры эндотелиальных клеток (HUVEC) были получены в соответствии с модифицированным методом, основанным на протоколе, предложенном Crampton et al., 2007 [53]. Пуповинная вена была очищена от тромбов с использованием раствора DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), после чего в её просвет вводился 0,1%-й раствор коллагеназы. Затем вена пережималась зажимами и инкубировалась в течение 20 минут при температуре 37 °C в среде с 5% CO₂. После завершения инкубации содержимое вены извлекалось и помещалось в центрифужную пробирку. Этот процесс сопровождался интенсивным массажем пуповины и дополнительным введением DPBS в её венозный просвет. Процесс центрифугирования проводился при скорости 500g в течение 5 минут, после чего супернатант удалялся, а клеточный осадок ресуспендировался в свежем растворе DPBS и подвергался повторному центрифугированию на тех же параметрах, чтобы окончательно удалить следы коллагеназы. Снова удалив супернатант, осадок ресуспендировали в культуральную среду ECGM (Endothelial Cell Growth Medium) и аккуратно гомогенизировали способом пипетирования. Затем клетки засевались в фласки площадью 25 см², предварительно обработанные 0,1%-м раствором желатина для повышения адгезии. Фласки помещали на инкубацию в среду с температурой 37 °C и концентрацией CO₂ 5% на 24 часа. По истечении этого времени проводились замена культуральной среды и микроскопический анализ клеточной культуры. В дальнейшем среду заменяли с интервалом каждые 48 часов. Когда плотность клеточного монослоя достигала 80–90% (степень конфлюэнтности), клетки пересеивались на более крупные лабораторные пластиковые поверхности для увеличения их количества. Перед пассированием использовали раствор 0,25%-го трипсина-ЭДТА для отделения клеток, при этом их количество и жизнеспособность контролировались с помощью автоматического счётчика клеток.

2.1.2 Верификация принадлежности культур к эндотелиальным

Верификация принадлежности выделенных культур клеток к эндотелиальным проводилась методом иммуноцитохимии с использованием антител к CD31 (Рисунок 1) и vWF (Рисунок 2) согласно протоколам, изложенным в инструкции производителей реагентов (Affinity, KHP).

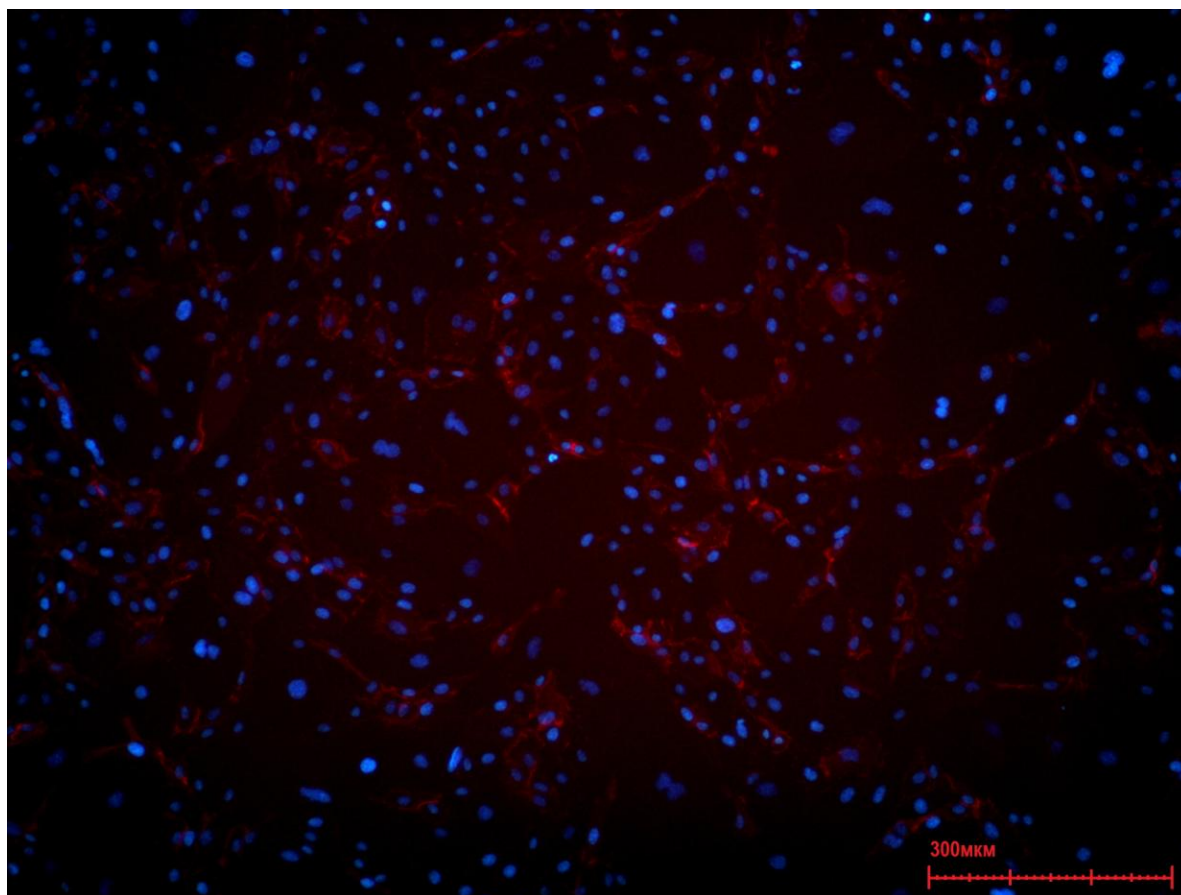


Рисунок 1— CD31 на мембранах культуры первичных эндотелиоцитов HUVEC, ядра окрашены DAPI. Ув x200

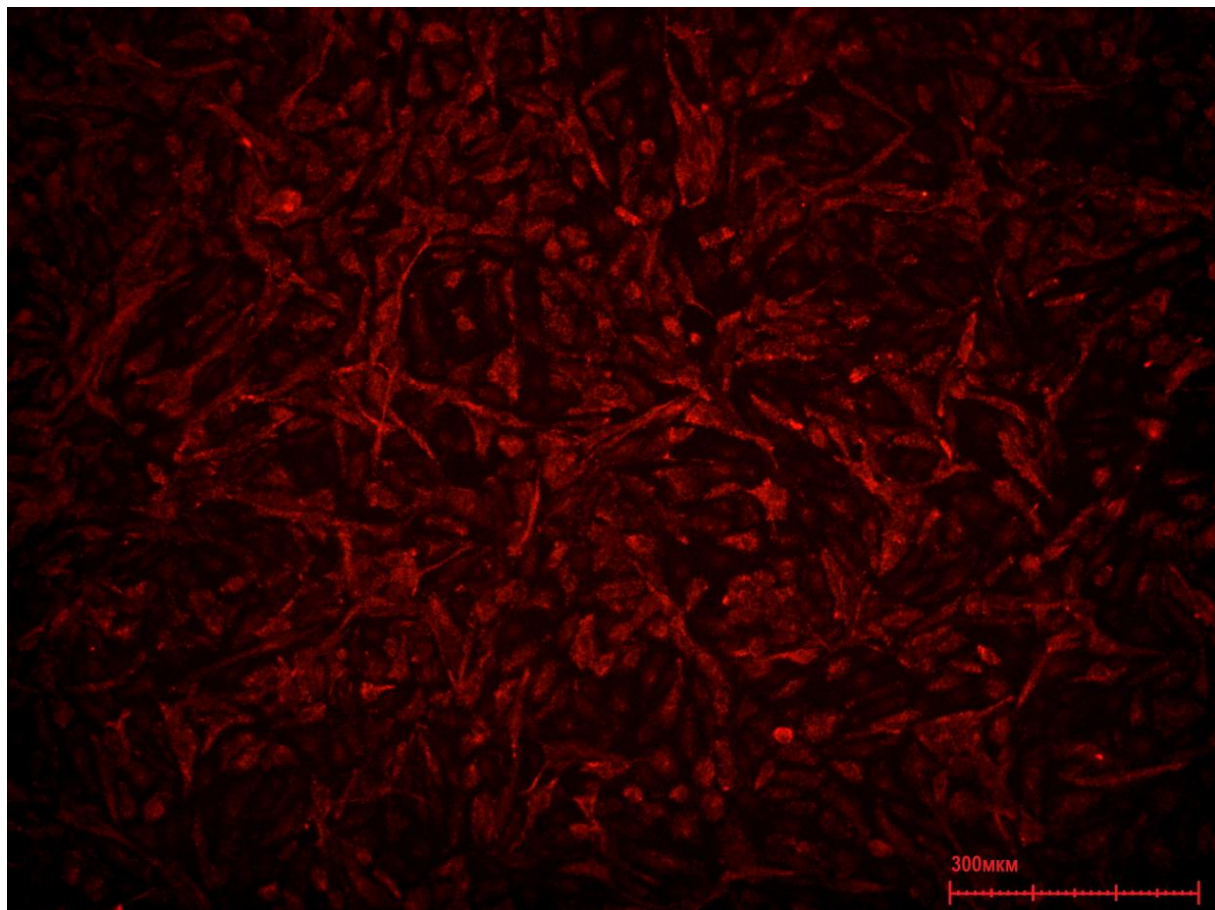


Рисунок 2 – Фактор фон Виллебранда (vWF) в цитоплазме культуры первичных HUVEC. Ув x200

2.1.3 Моделирование баллонной ангиопластики

Протокол эксперимента

1. После подписания донором информированного согласия участки пуповины длиной 12-15см забирались в стерильную транспортную среду, содержащую 100ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (каталожный номер А073п39).
2. Пуповина обрабатывалась 70% спиртом и подготавливалась к дальнейшей работе.
3. Выполнялась катетеризация пуповинной вены, последняя трижды промывалась DPBS (каталожный номер Р061Е).
4. Проводилось моделирование баллонной ангиопластики:

- в пуповинную вену устанавливался гидрофильный проводник
- по проводнику заводился баллонный катетер
- пуповинная вена расширялась под давлением 10 атмосфер баллонным катетером для дилатации (Mustang Balloon Dilatation Catheter, Boston Scientific) (Рисунок 3).

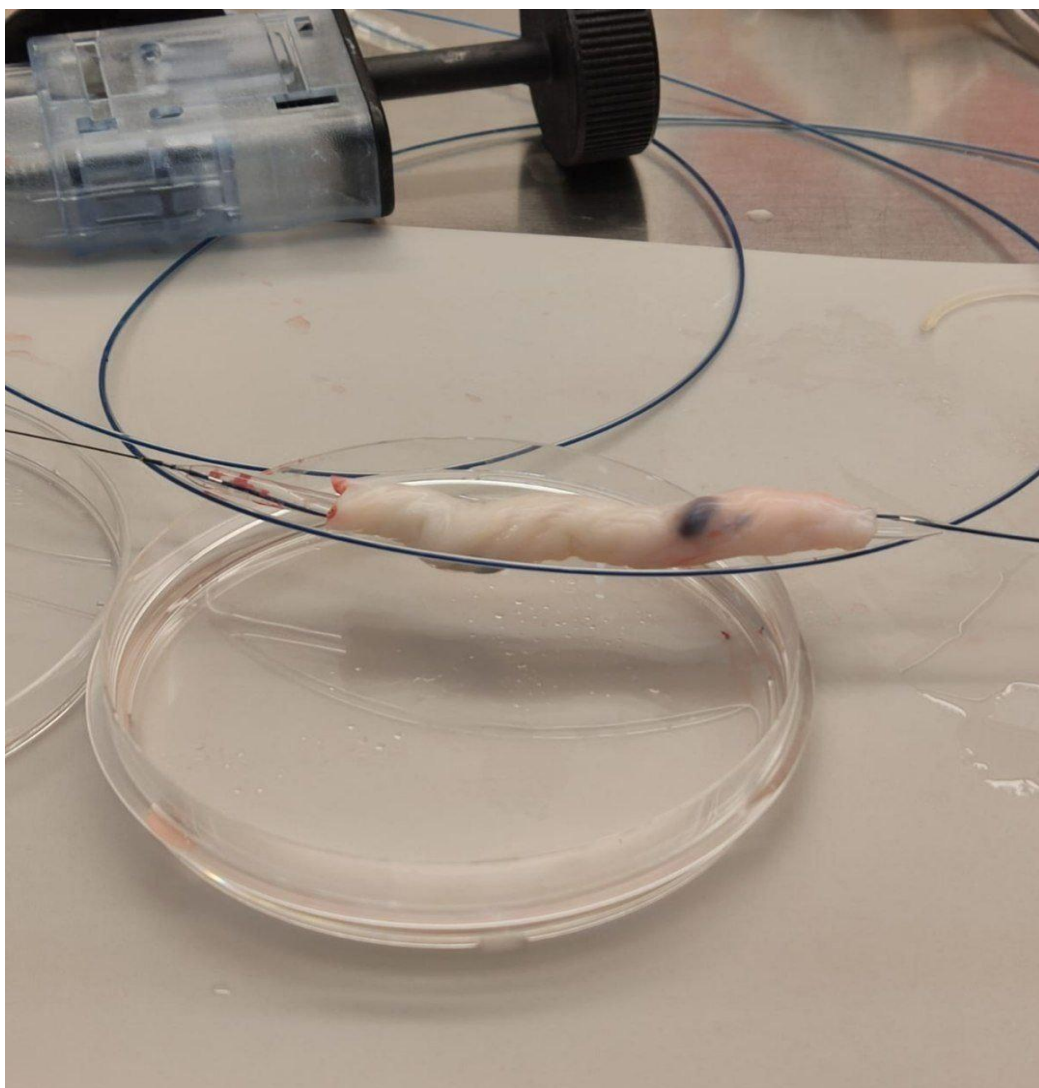


Рисунок 3 – Раздувание баллона в пупочной вене

Поскольку в среднем диаметр пуповинной вены составил от 4 до 6,5 мм, что соответствует данным литературы. Был использован баллонный катетер диаметром 6 мм [87]. Катетер раздували до номинального давления в связи с тем, что в вене отсутствует развитый мышечный слой, для которого было бы необходимо использовать некомплаентный баллон или большее давление в

комплаентном баллоне, который был использован. Кроме того, давление, близкое к давлению разрыва, согласно инструкции, повышало бы риск разрыва стенки вены.

5. После моделирования баллонной ангиопластики, первичные культуры эндотелиоцитов HUVEC выделяли по методике, описанной в п. 2.1.1. Выделение первичных культур HUVEC.

2.1.4 Изучение метаболической (митохондриальной) активности первичной культуры HUVEC в условиях моделирования баллонной ангиопластики и добавления различных концентраций сулодексида

В рамках экспериментальной части исследования проведено *in vitro* изучение метаболической (митохондриальной) активности первичной культуры HUVEC в условиях моделирования баллонной ангиопластики с добавлением сулодексида различных его концентрациях (0,1 ЛЕ/мл, 0,25 ЛЕ/мл, 0,5 ЛЕ/мл, 1 ЛЕ/мл, 5 ЛЕ/мл).

Протокол эксперимента

В рамках данного эксперимента были использованы нативные первичные культуры HUVEC третьего пассажа и первичные культуры HUVEC третьего пассажа после моделирования баллонной ангиопластики в количестве трёх линий. Эксперимент проводился на 96 луночном планшете двухкратно. В 36 лунок планшета были засеяны нативные первичные культуры HUVEC, а в другие 36 лунок культуры HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики (Рисунок 4). Далее по 6 лунок были использованы как контрольные, а в 60 других были добавлены различные концентрации сулодексида. По данным литературы большинство авторов использует концентрацию сулодексида 0,5ЛЕ/мл в кондиционной среде, что в среднем соответствует терапевтической концентрации препарата в крови *in vivo* [72]. Нами в рамках эксперимента были использованы

следующие концентрации: 0,1 ЛЕ/мл, 0,25ЛЕ/мл, 0,5ЛЕ/мл, 1ЛЕ/мл, 5ЛЕ/мл (Рисунок 4).

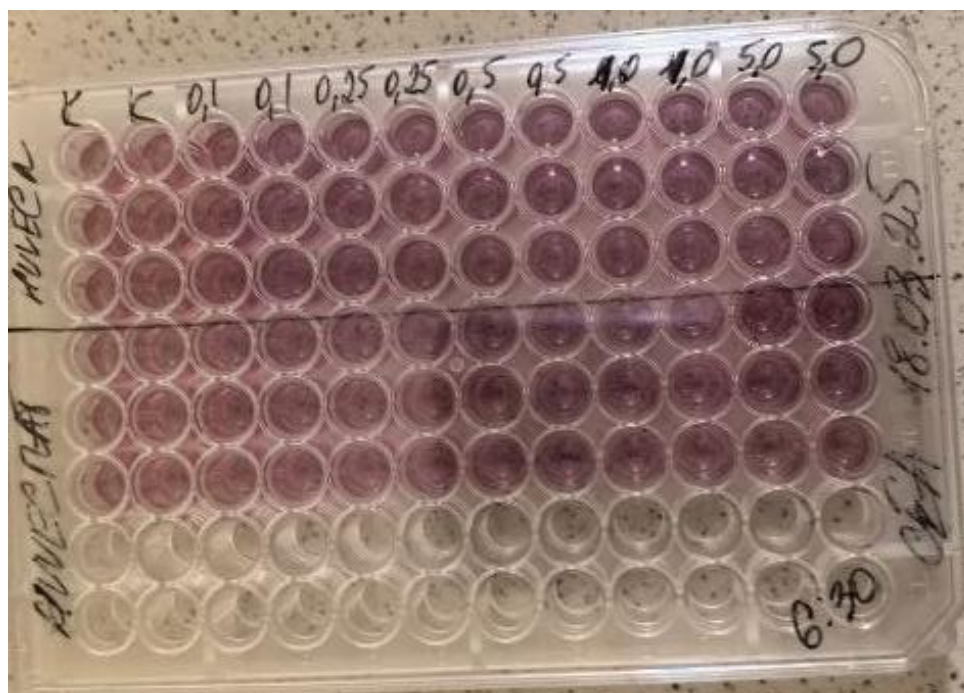


Рисунок 4 – МТТ-тест

После добавления сулодексида в вышеуказанных концентрациях в кондиционную среду культуры клеток инкубировались с сулодексидом в течение 6 часов, что соответствует публикациям других авторов, проводивших *in vitro* исследования с сулодексидом [133]. После этого выполнялся МТТ-тест, в ходе которого производилась экспозиция с реагентами MTS/PMS (Abcam, каталожный номер ab223881) в течение 1,5 часов при 37°C с содержанием 5% CO₂. По прошествии указанного времени полученные растворы (клеточный супернатант) с разной степенью окраски переносились в 96-луночные планшеты (Corning, каталожный номер 3599) для оценки оптической плотности на анализаторе (Stat Fax 3200 (microplate reader), Awareness technology Inc. Palm City Fl., США) при 630 нм; бралось не менее 5 проб из каждой лунки для исключения погрешности измерения.

2.1.5 Изучение миграционной активности первичной культуры HUVEC в условиях моделирования баллонной ангиопластики

С первичными культурами HUVEC третьего пассажа в количестве двух линий проводили анализ миграционной активности в условиях моделирования баллонной ангиопластики и добавления в кондиционную среду препарата сулодексид в различных его концентрациях (0,1 ЛЕ/мл, 0,25 ЛЕ/мл, 0,5 ЛЕ/мл, 1,0 ЛЕ/мл, 5,0 ЛЕ/мл), при помощи теста заживления царапины (scratch – тест). В ходе эксперимента первичные нативные культуры эндотелиоцитов и эндотелиоцитов после моделирования баллонной ангиопластики инкубировали в 12-луночном планшете (Corning, каталожный номер 353846) до формирования монослоя. После этого в каждой лунке с помощью микронаконечника 1000 мкл проводили царапину («scratch») с последующим трехкратным промыванием клеточного слоя питательной средой для удаления мусора и сглаживания краев царапины, после чего в кондиционную среду в рамках эксперимента были добавлены следующие концентрации препарата сулодексид: 0,1 ЛЕ/мл, 0,25 ЛЕ/мл, 0,5 ЛЕ/мл, 1,0 ЛЕ/мл, 5,0 ЛЕ/мл. После добавления сулодексида в вышеуказанных концентрациях клетки инкубировались с препаратом в течении 6 часов. В качестве контроля использовались интактные первичные культуры HUVEC.

Затем выполнялись микроскопия и фотодокументирование не менее чем в 2 полях зрения в контрольной точке 12 часов.

Степень закрытия промежутков в результате миграции клеток анализировали путем сравнения с первоначальной шириной нанесенного повреждения, при помощи программы ImageJ 1.48v.

2.1.6. Оценка относительного количества маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода в первичных культурах эндотелиоцитов

Оценка относительного количества маркеров эндотелиально-

мезенхимального перехода в первичных нативных и полученных в условиях моделирования баллонной ангиопластики культурах HUVEC проводилась при помощи методики Вестерн блот, в том числе при инкубации культур клеток с сулодексидом в различных его концентрациях (0,1 ЛЕ/мл, 0,25 ЛЕ/мл, 0,5 ЛЕ/мл, 1,0 ЛЕ/мл, 5,0 ЛЕ/мл).

Культуры клеток засеивались в лунки 12-луночных планшетов. После достижения монослоя к культурам клеток добавляли сулодексид в вышеуказанных концентрациях в кондиционную среду, время экспозиции составило 6 часов. В качестве контроля использовалась инкубация культур клеток в стандартной культуральной среде. Клеточные культуры обрабатывали раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсин и 0,2% ЭДТА, Sigma-Aldrich, Германия) для снятия клеток с лунок. После завершения эксперимента клетки трижды промывали фосфатным буфером с pH 7,4 и подвергали лизированию в буфере NP40 Cell Lysis Buffer Thermo с добавлением смеси ингибиторов протеаз (включая аминокислоты AEBSF 2 мМ, апротинин 0,3 мкМ, бестатин 130 мкМ, ЭДТА 1 мМ, E-64 14 мкМ, лейпептин 1 мкМ). Лизирование проводили в течение 30 минут при +4°C с постоянным перемешиванием в расчете на 10⁷ клеток на 100 мкл буфера. Полученные лизаты центрифугировали при 13000 об/мин на протяжении 10 минут. В образованном супернатанте с помощью метода Бредфорда определяли концентрацию белка. Затем 20 мкг белков подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле при напряжении 100 В на протяжении 90 минут. До загрузки в гель образцы смешивали с 4-кратным буфером, содержащим 10% β-меркаптоэтанола, в соотношении 3:1, после чего нагревали до 95°C в течение 5 минут. Перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану выполняли с применением системы Trans-Blot Turbo Transfer System за 10 минут при напряжении 25 В и силе тока 1,3 А. Мембраны блокировали в 1%-ном растворе Casein Blocker с добавлением 0,5% Tween-20, затем инкубировали при комнатной температуре (21°C) в течение часа. Детекцию белков осуществляли при помощи антител к CD31 (кат номер AF6191), vWF (кат номер AF3000), VIM (кат номер AF0292), αSMA (кат номер AF1032), TGFβ1 (кат номер AF1027). Для

визуализации первичных антител использовали вторичные антитела козлиного происхождения (каталожный номер S0013) в разведении 1:5000, разведенные в блокирующем растворе. Инкубация проводилась при комнатной температуре в течение одного часа. После этого образцы подвергались интенсивному трехкратному промыванию с использованием TBS-T, длительностью по 10 минут каждое промывание. Молекулярные массы белков CD31 (130 кДа), vWF (500 кДа), VIM (25 кДа), α SMA (42 кДа) и TGF β 1 (14 кДа) подтверждали сравнением с предварительно нанесенными маркерами молекулярного веса. Визуализация белков проводилась методом хемилюминесценции с использованием прибора ChemiDoc XRS+ от компании Bio-Rad. Интенсивность полученных полос (бэндов) оценивали денситометрическим методом с применением программного обеспечения ImageLab, также разработанного Bio-Rad. Содержание исследуемых белков анализировалось относительно уровня экспрессии белка домашнего хозяйства GAPDH. [12].

2.2 Материалы и методы клинической части исследования

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

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

остаточного стеноза более 50%. Операции проводились командой хирургов, состоящей из четырёх человек, включая автора исследования, на ангиографических установках Philips Azurion 3 и Canon Alphenix.

В ходе клинической части исследования использованы следующие методики: Физикальный осмотр пациентов, сбор анамнеза; ультразвуковые виды исследования, включая ультразвуковую доплерографию с определением лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ) и дуплексное сканирование артерий нижних конечностей, а также ангиография при наличии показаний для хирургического исследования и/или оценки рестеноза области выполнения эндоваскулярных вмешательств; иммуноферментный анализ (ИФА) для оценки уровня маркеров EndMT (эндотелиальных - CD31, vWF, мезенхимальных – VIM, α SMA, интегрального маркера EndMT – TGFb1) в сыворотке/плазме пациентов на фоне эндоваскулярного или консервативного лечения.

Группа I: 40 пациентов с эндоваскулярной реконструкцией артерий нижних конечностей (баллонная ангиопластика либо баллонная ангиопластика в сочетании со стентированием); Группа II (группа сравнения): 40 пациентов, которым проводилось консервативное лечение согласно действующим клиническим рекомендациям с применением препарата сулодексид 600 ЛЕ внутривенно капельно 1 раз в день в течение 14 дней с последующим приёмом препарата внутрь в дозировке 250 ЛЕ 2 раза в день в течение 1 месяца, согласно инструкции по применению. Пациентам с IIб-IV стадиями ХИНК, вошедшим в группу сравнения, была осуществлена терапия сулодексидом ввиду отказа пациентов от предложенного хирургического (эндоваскулярного) лечения либо наличия распространенного поражения дистального русла согласно данным инструментальных методов обследования (Рисунок 5).

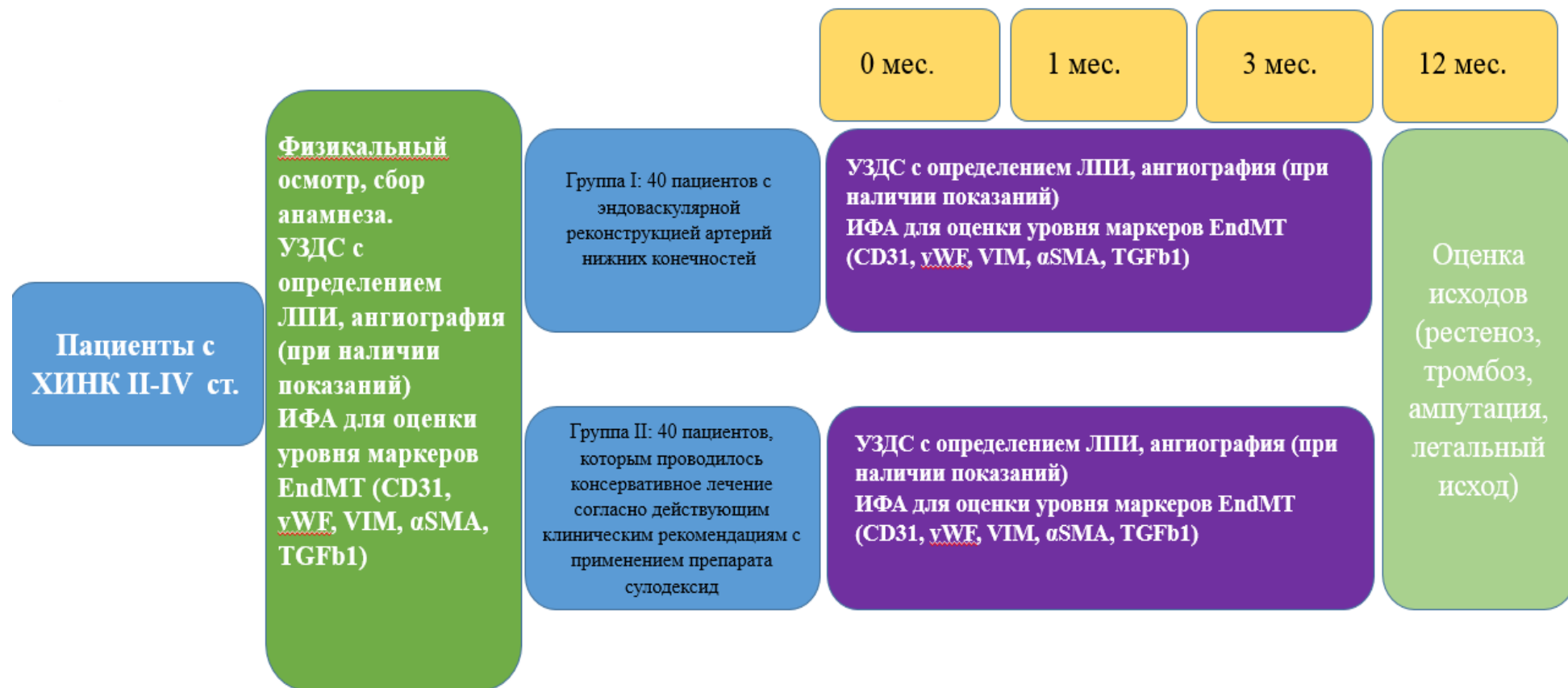


Рисунок 5 – Дизайн клинической части исследования

От введения дополнительной группы сравнения, в которой пациенты после баллонной ангиопластики либо баллонной и стентирования дополнительно получали сулодексид по схеме было решено воздержаться ввиду того, что пациентам после эндоваскулярного лечения в течение не менее 1 месяца требуется двойная дезагрегантная терапия, что в сочетании с применением сулодексида могло бы повысить риск геморрагических осложнений.

Пациенты I и II групп получали оптимальную медикаментозную терапию согласно клиническим рекомендациям, включая антиагрегантную и гиполипидемическую терапию.

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

Пациенты находились под наблюдением в течение 1 года; контрольные точки: включение в исследование, через 1, 3 месяцев после включения в исследование и 1 год для оценки выживаемости и сохранения конечности.

Пациентам I группы при включении в исследование, через 1, 3 месяца после эндоваскулярного лечения был произведен забор периферической венозной крови для оценки уровня маркеров EndMT (эндотелиальных - CD31, vWF, мезенхимальных – VIM, α SMA, интегрального маркера EndMT – TGF β 1) методом ИФА: набор для определения CD31 кат. номер SEA36Hu (KHP), набор для определения уровня vWF кат. номер SEA833Hu (KHP), набор для определения уровня VIM кат. номер SEB040Hu (KHP), набор для определения уровня AntiACTIN (α SMA) кат. номер SEA124Hu (KHP), набор для определения уровня TGF β 1 кат. номер AES097Hu (KHP). Помимо этого, всем пациентам I группы в аналогичные сроки проводиться вышеуказанные инструментальные исследования.

Больным II группы аналогичная оценка маркеров EndMT и инструментальные исследования проводились при включении в исследование и в

срок 3 месяца.

В группе здоровых добровольцев производился забор венозной крови единожды при включении в исследование с дальнейшим ИФА для определения уровня изучаемых маркеров.

Первичной конечной точкой исследования развитие рестеноза зоны эндоваскулярного вмешательства. Вторичными конечными точками исследования стали: тромбоз зоны реконструкции, прогрессирование стадии заболевания (хронической ишемии), ампутация конечности, летальный исход (Таблица 1).

Таблица 1 – Дизайн исследования

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

Критерии включения в исследование

Мужчины или женщины от 50 до 80 лет с хронической ишемией нижних конечностей атеросклеротической этиологии II - IV стадий заболевания по А.В. Покровскому-Фонтейну.

Критерии невключения в исследование

Мужчины или женщины младше 50 лет; активный онкологический процесс

или период ремиссии менее 5 лет; декомпенсированная соматическая патология, включая декомпенсацию сахарного диабета; наличие хронических инфекционных заболеваний.

В качестве здоровых добровольцев выступили лица без клинических или инструментальных признаков атеросклероза, а также задокументированных прочих заболеваний.

Статистические методы обработки информации

В ходе проведенного статистического анализа данных, полученных в рамках клинических и экспериментальных исследований, использовалось программное обеспечение STATISTICA 16,0 либо его аналоги. Для обработки данных применялись методы, относящиеся к основным направлениям математической статистики: предварительная обработка, описательная статистика (включая графический анализ, изучение распределения данных и вычисление ключевых статистических характеристик), проверка статистических гипотез и корреляционный анализ.

Для проверки нормальности распределения данных применялся критерий Шапиро-Уилка (W-критерий). При наличии нормального распределения для оценки межгрупповых различий использовались t-критерии Стьюдента: один для зависимых выборок и другой для независимых. В случаях ненормального распределения переменных для анализа различий между двумя независимыми выборками применялся U-тест Манна-Уитни, а для зависимых выборок использовался W-критерий Уилкоксона. Множественные сравнения осуществлялись на основе критериев Фридмана или Краскела-Уоллиса в зависимости от типа распределения и характера анализируемых данных. Во всех случаях различия считались статистически значимыми при уровне $p \leq 0,05$.

Дополнительно, при построении модели логистической регрессии выполнялся анализ ROC-кривых (Receiver Operating Characteristic). Этот метод использовался для определения оптимального порогового значения вероятности,

позволяющего классифицировать данные наиболее эффективно. ROC-анализ обеспечивал визуализацию результатов бинарной классификации, а также оценку её точности. Анализ чувствительности и специфичности критериев проводился с использованием ROC-кривых и анализа четырёхпольных таблиц. Уровень $p \leq 0,05$ рассматривался как признак статистически достоверных результатов.

Метод бинарной логистической регрессии применялся для изучения зависимости дихотомических переменных (принимающих два значения) от независимых переменных различного масштаба. В контексте исследования под дихотомическими переменными понимались события, которые могли как произойти, так и не произойти, например, развитие рестеноза или тромбоза в рамках клинического исследования. Этот метод позволил рассчитывать вероятность наступления событий в зависимости от значений независимых переменных, таких как относительное количество маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода (EndMT).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты экспериментального исследования

3.1.1 Оценка метаболической активности HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики

Согласно результатам МТТ-теста были выявлены статистически значимые различия в метаболической (митохондриальной) активности интактных первичных культур HUVEC и культур, полученных после моделирования баллонной ангиопластики *in vitro*. По результатам МТТ-теста метаболическая активность первичных культур клеток HUVEC в модели баллонной ангиопластики была в целом ниже по сравнению с интактными первичными культурами HUVEC ($p=0,025$) (Таблица 2).

Таблица 2 – Сравнение показателей метаболической активности интактных первичных клеток HUVEC (нативных) и культуры клеток HUVEC в модели баллонной ангиопластики (патологических) без учета концентрации сулодексида

Показатель	Нативные клетки (интактные первичные культуры HUVEC) (mean±SD)	Патологические клетки (культуры клеток HUVEC в модели баллонной ангиопластики) (mean±SD)	p
Оптическая плотность кондиционной среды, ед.опт.пл.	0,49 ±0,03	0,48±0,03	0,025

Межгрупповой анализ не выявил наличия статистически значимых различий в показателях метаболической активности интактных первичных клеток HUVEC (нормальных) и культуры клеток HUVEC в модели баллонной ангиопластики (патологических) при инкубации с сулодексидом в различных

концентрациях ($p>0,05$), что свидетельствует об отсутствии цитотоксичности сулодексида в широком диапазоне концентраций (Рисунок 6).

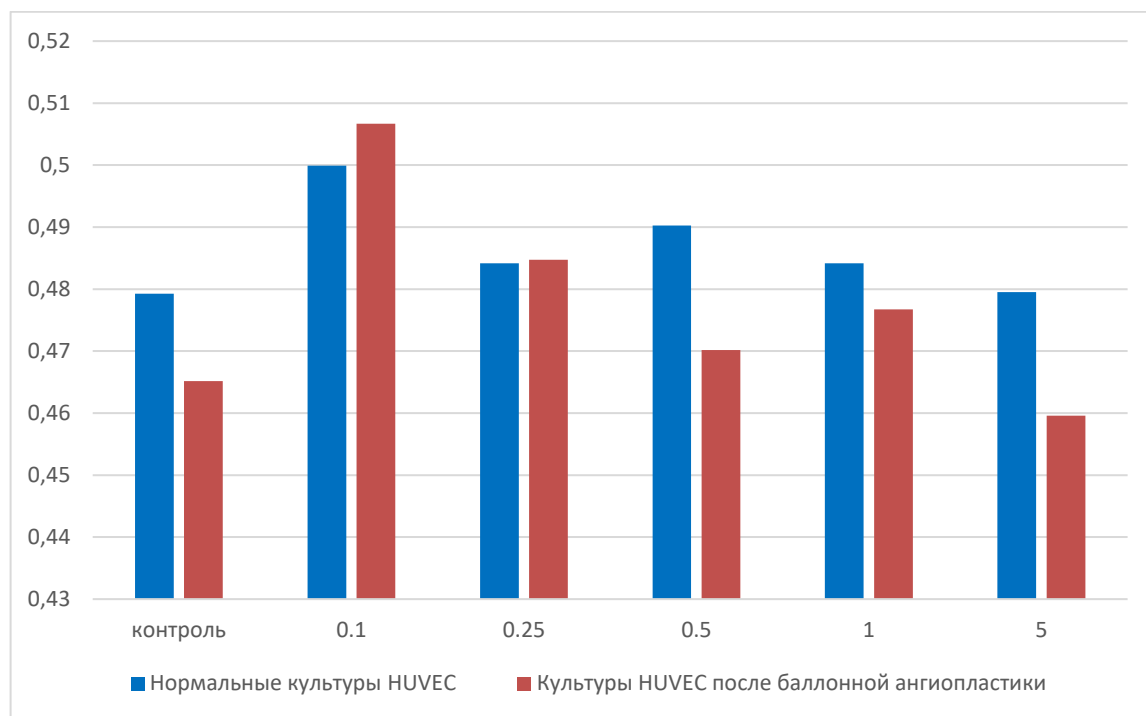


Рисунок 6 – Сравнение показателей метаболической активности интактных первичных клеток HUVEC (нативных) и культуры клеток HUVEC в модели баллонной ангиопластики (патологических) без учета концентрации сулодексида

3.1.2 Внутригрупповое сравнение среди интактных первичных клеток HUVEC (нормальных) показателей оптической плотности при различных концентрациях сулодексида

При проведении МТТ-теста метаболическая активность интактных (нативных) первичных культур клеток HUVEC статистически значимо не изменялась при инкубации в культуральной среде с различными концентрациями сулодексида ($p=0,628$), таким образом, можно судить о том, что сулодексид не обладает цитотоксическим воздействием на первичные культуры HUVEC в выбранных концентрациях (Рисунок 7).

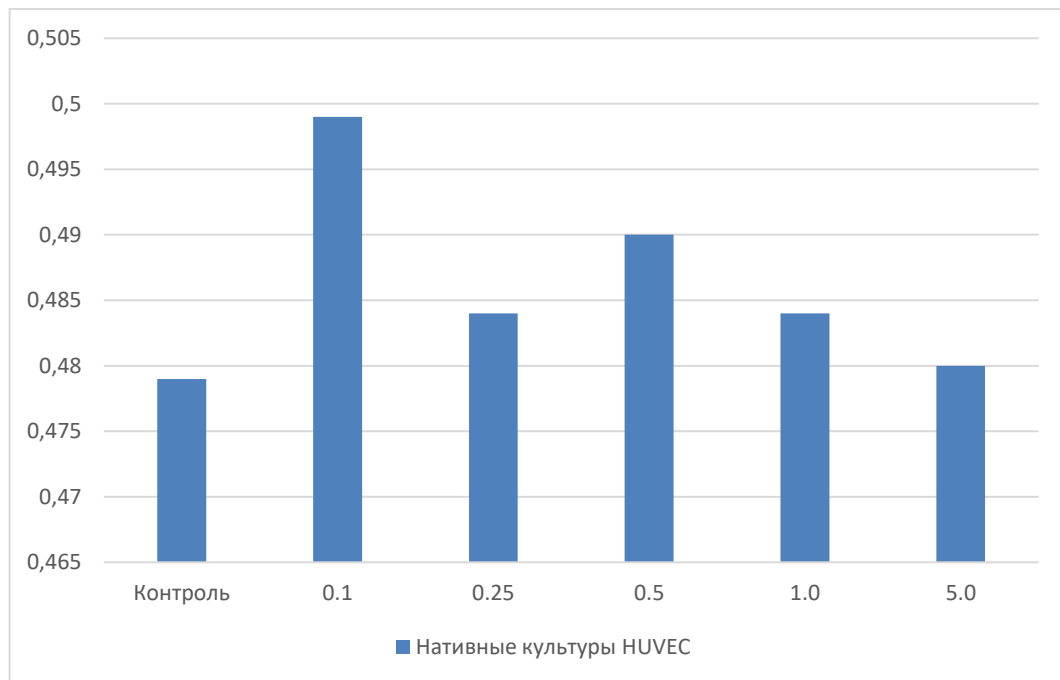


Рисунок 7 – Внутригрупповое сравнение среди интактных первичных клеток HUVEC (нативных) показателей оптической плотности при различных концентрациях сулодексида

3.1.3 Внутригрупповое сравнение среди патологических клеток (первичные культуры клеток HUVEC в модели баллонной ангиопластики) показателей оптической плотности при различных концентрациях сулодексида

Внутригрупповой анализ показал, что при проведении МТТ-теста метаболическая активность первичных культур клеток HUVEC в модели баллонной ангиопластики были выявлены статистически значимые различия в метаболической активности HUVEC при инкубации в культуральной среде с добавлением сулодексида в концентрации 0,1 ЛЕ/мл по сравнению с контролем (инкубация только в культуральной среде) $0,51 \pm 0,03$ ед.опт.пл. и $0,49 \pm 0,03$ ед.опт.пл., соответственно ($p=0,034$), а также при инкубации патологических культур HUVEC в культуральной среде с добавлением сулодексида в концентрации 0,1 ЛЕ/мл и в концентрации 5,0 ЛЕ/мл $0,49 \pm 0,03$ ед.опт.пл. и $0,46 \pm 0,04$ ед.опт.пл., соответственно ($p=0,004$). Следовательно, добавление в

культуральную среду сулодексида в концентрации 0.1 ЛЕ/мл статистически значимо повышает метаболическую активность первичных культур клеток HUVEC в модели баллонной ангиопластики ($p=0,034$). При повышении концентрации до 5 ЛЕ/Мл эффект нивелируется (Рисунок 8).

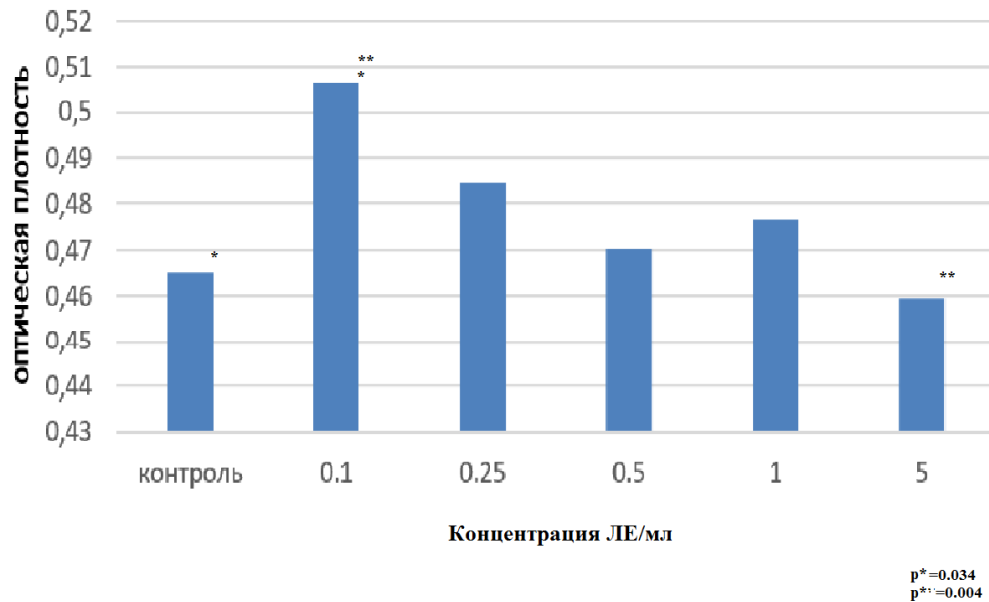


Рисунок 8 – Внутригрупповое сравнение среди патологических клеток (первичные культуры клеток HUVEC в модели баллонной ангиопластики) показателей оптической плотности при различных концентрациях сулодексида

Таким образом, представленный метод моделирования баллонной ангиопластики позволяет при помощи рутинно доступных инструментов и методов, в короткие сроки получать первичные культуры эндотелиоцитов с измененной метаболической активностью. Таким образом, полученные при моделировании баллонной ангиопластики культуры HUVEC могут использоваться при лабораторных доклинических исследованиях.

Инкубация как нативных, так и полученных в модели баллонной ангиопластики первичных культур HUVEC с сулодексидом в различных концентрациях показала отсутствие у последнего цитотоксического воздействия. Кроме того, инкубация патологических культур HUVEC (после баллонной ангиопластики) с сулодексидом в концентрации 0,1 ЛЕ/мл характеризуется

статистически значимым повышением метаболической (митохондриальной) активности культур клеток по сравнению с инкубацией в стандартной эндотелиальной среде ($p=0.034$). При этом повышение концентрации сулодексида до 5,0 ЛЕ/мл характеризуется снижением метаболической активности первичных культур патологических HUVEC по сравнению с концентрацией 0,1 ЛЕ/мл ($p=0,004$).

3.1.4 Оценка миграционной активности культур HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики

В рамках экспериментальной части исследования проводилась оценка миграционной активности культур эндотелиоцитов (тест заживления царапины), по результатам которой получены следующие данные.

Анализ миграционной активности культур клеток показал, что в сроки 12 часов скорость застания повреждения первичных нативных культур HUVEC была статистически значимо выше, чем в первичных культурах клеток HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики (патологические) на 23,96% и составила $26,71 \pm 3,57$ мкм/ч и $21,55 \pm 7,64$ мкм/ч соответственно. Таким образом моделирование баллонной ангиопластики способствует снижению миграционной активности культур эндотелиоцитов в срок 12 часов $p < 0,001$.

Инкубация первичных нативных культур HUVEC с добавлением сулодексида в концентрации 0,1 ЛЕ/мл к культуральной среде характеризовалась увеличением миграционной активности культур клеток на 19,25% по сравнению с контролем, то есть инкубацией нативных культур HUVEC со стандартной эндотелиальной средой: скорость застания повреждения в срок 12 часов составила $31,85 \pm 4,99$ мкм/ч и $26,71 \pm 3,57$ мкм/ч, соответственно ($p=0,002$). Помимо этого, статистически значимое увеличение скорости заживления повреждения на 33,18% было достигнуто в срок 12 часов при добавлении сулодексида в концентрации 5,0 ЛЕ/мл по сравнению с аналогичным контролем, $35,57$ мкм/ч и $26,71$ мкм/ч, соответственно ($p < 0,001$).

Результаты проведенного анализа миграционной активности первичных культур HUVEC, как нативных, так и патологических после моделирования баллонной ангиопластики, представлены на Рисунках 9, 10 и в Таблицах 3 и 4.

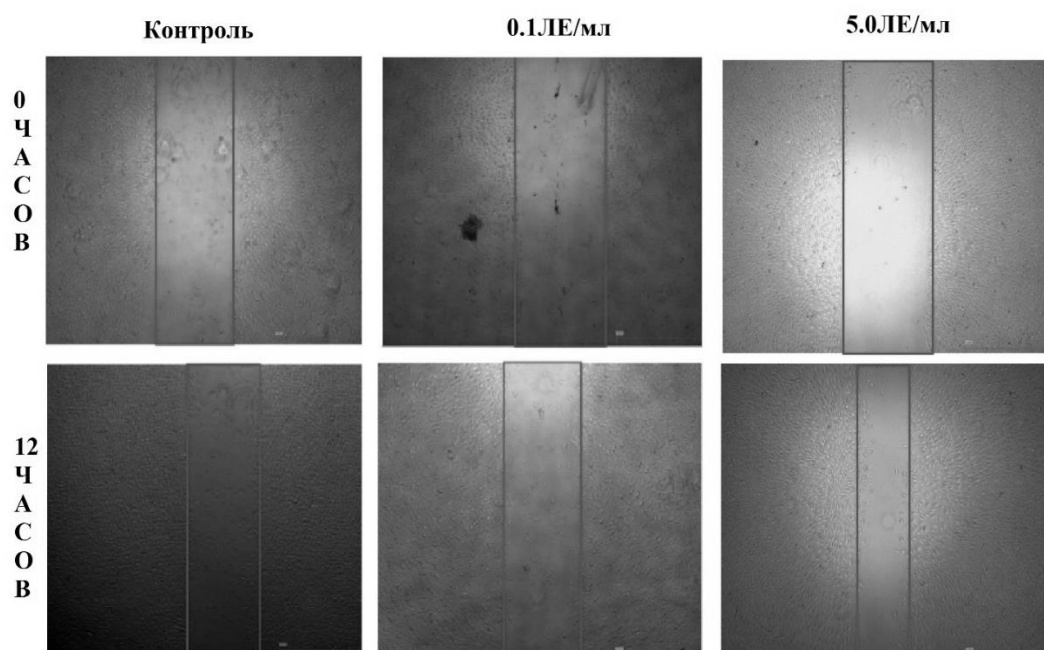


Рисунок 9 – Скретч-тест, нативные HUVEC с добавлением 0,1 ЛЕ/мл, 5,0 ЛЕ/мл сулодексида

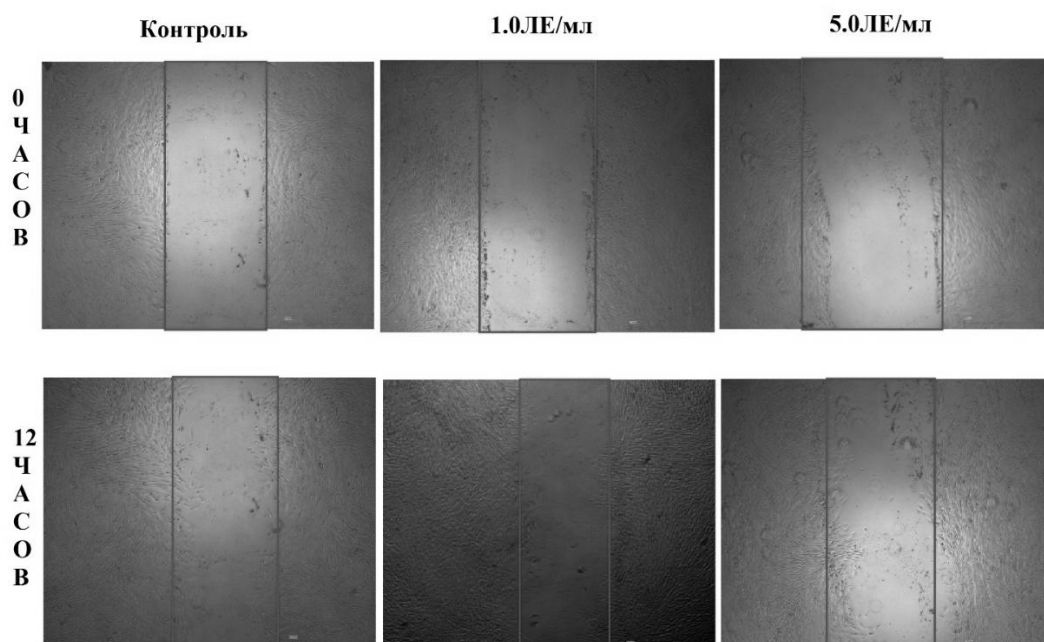


Рисунок 10 – Скретч-тест, патологические (после моделирования баллонной ангиопластики культуры HUVEC с добавлением 1,0 ЛЕ/мл, 5,0 ЛЕ/мл сулодексида

Таблица 3 – Нативные первичные культуры HUVEC, инкубация 12 часов

контроль	0,1 ЛЕ/мл	0,25 ЛЕ/мл	0,5 ЛЕ/мл	1 ЛЕ/мл	5 ЛЕ/мл	Р
26,71±3,57 (m=±1,26) мкм/ч	31,86± 4,989 (m=±1,76) мкм/ч	29,05±2,5 (m=±0,88) мкм/ч	32,05±9,24 (m=±3,27) мкм/ч	28,11±4,42 (m=±1,56) мкм/ч	35,58±2,81 (m=±0,99) мкм/ч	рк-0,1=0,002 рк-0,25=0,213 рк-0,5=0,254 рк-1,0=0,534 рк-5,0<0,001

Таблица 4 – Патологические (после моделирования баллонной ангиопластики) первичные культуры HUVEC, инкубация 12 часов

контроль	0,1 ЛЕ/мл	0,25 ЛЕ/мл	0,5 ЛЕ/мл	1 ЛЕ/мл	5 ЛЕ/мл	Р
21,55±7,82 (m=±2,77) мкм/ч	20,7±10,58 (m=±3,74) мкм/ч	19,32± 11,35 (m=±4,01) мкм/ч	10,54±8,02 (m=±2,84) мкм/ч	73,694± 7,86 (m=±2,78) мкм/ч	60,24±32,87 (m=±11,62) мкм/ч	рк-0,1=0,785 рк-0,25=0,706 рк-0,5=0,37 рк-1,0<0,001 рк-5,0=0,010

Инкубация первичных патологических культур HUVEC (после моделирования баллонной ангиопластики) с добавлением сулодексида в концентрации 1,0 ЛЕ/мл к культуральной среде характеризовалась увеличением миграционной активности культур клеток на 242% по сравнению с контролем, то есть инкубацией патологических культур HUVEC со стандартной эндотелиальной средой: скорость заращения повреждения в срок 12 часов составила 73,69±7,85 мкм/ч и 21,54±7,82 мкм/ч, соответственно ($p<0,001$). Помимо этого, статистически значимое увеличение скорости заживления повреждения на 179,53% было достигнуто в срок 12 часов при добавлении сулодексида в концентрации 5,0 ЛЕ/мл по сравнению с аналогичным контролем, 60,24±32,86 мкм/ч и 21,54±7,82 мкм/ч, соответственно ($p<0,001$).

Таким образом, снижение миграционной активности первичных культур HUVEC при воздействии баллонной ангиопластики можно рассматривать как негативный процесс, связанный с механическим повреждением эндотелиоцитов. Инкубация первичных культур HUVEC с сулодексидом характеризуется увеличением миграционной активности культур эндотелиоцитов, как нативных, так

и полученных в модели баллонной ангиопластики.

3.1.5 Оценка относительного количества белков-маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода при инкубации первичных культур HUVEC с сулодексидом

Результаты оценки относительного количества маркеров EndMT в первичных культурах нативных HUVEC

CD31

По результатам проведения вестерн-блота не было зафиксировано статистически значимого изменения относительного количества CD31 в первичной культуре клеток HUVEC после добавления в кондиционную среду сулодексида в различных концентрациях по сравнению с контролем, однако при добавлении сулодексида в концентрациях 0,5 ЛЕ/мл и 1,0 ЛЕ/мл видна тенденция к росту экспрессии данного маркера при значениях p близких к 0,05 (Рисунок 11).

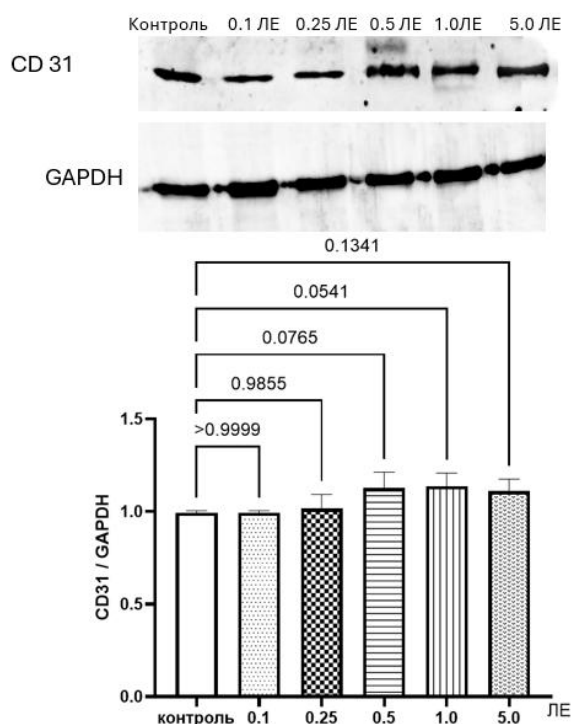


Рисунок 11 – Относительное количество CD31 при добавлении различных концентраций сулодексида в первичной культуре HUVEC в сравнении с белком домашнего хозяйства GAPDH

vWF

По результатам проведения Вестерн-блота было зафиксировано снижение относительного количества vWF в первичной культуре нативных клеток HUVEC после добавления в кондиционную среду сулодексида в концентрациях 0,1 ЛЕ/мл на 47% ($p=0,0001$), 0,25 ЛЕ/мл на 47,3% ($p=0,0001$), 1,0 ЛЕ/мл на 45,6% ($p=0,0002$), 5,0 ЛЕ/мл на 52,7% ($p<0,0001$) по сравнению с контролем, то есть инкубацией со стандартной эндотелиальной средой (Рисунок 12), что может свидетельствовать о положительном влиянии сулодексида на эндотелий-зависимые воспалительные реакции и прокоагуляционную активность эндотелиоцитов.

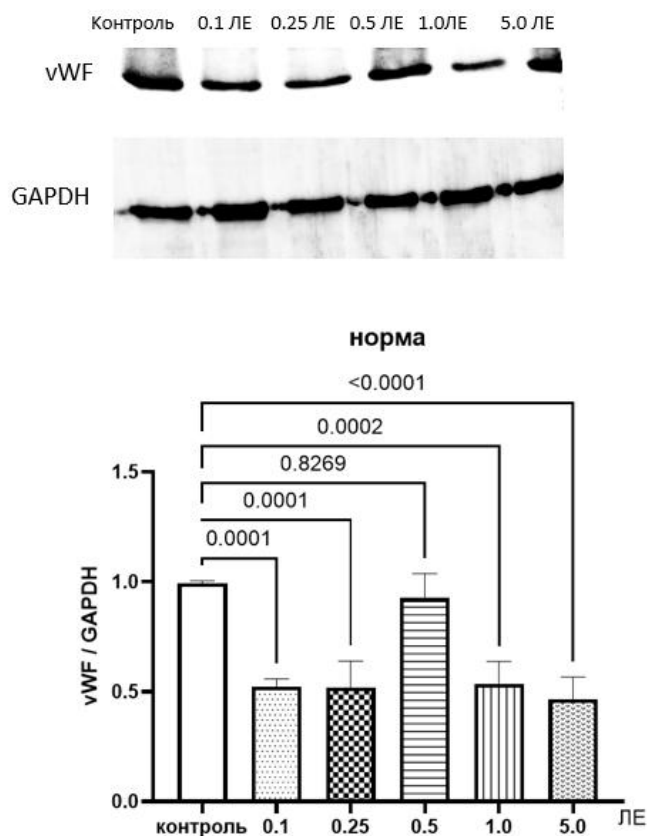


Рисунок 12 – Относительное количество vWF при добавлении различных концентраций сулодексида в первичной культуре HUVEC в сравнении с белком домашнего хозяйства GAPDH

VIM

По результатам Вестерн-блота не было зафиксировано статистически значимого изменения относительного количества VIM в первичных культурах HUVEC после добавления в кондиционную среду препарата сулодексид в различных концентрациях по сравнению с контролем (Рисунок 13). Данные результаты могут свидетельствовать об отсутствии влияния сулодексида на относительное количество данного белка в первичной культуре HUVEC, однако в эксперименте *in vivo* данный показатель снижался. Однако стоит учитывать, что VIM экспрессируется в различных эпителиальных и мезенхимальных клетках, поэтому изменение его уровня *in vivo* может свидетельствовать о роли других клеточных элементов помимо эндотелиоцитов в экспрессии виментина.

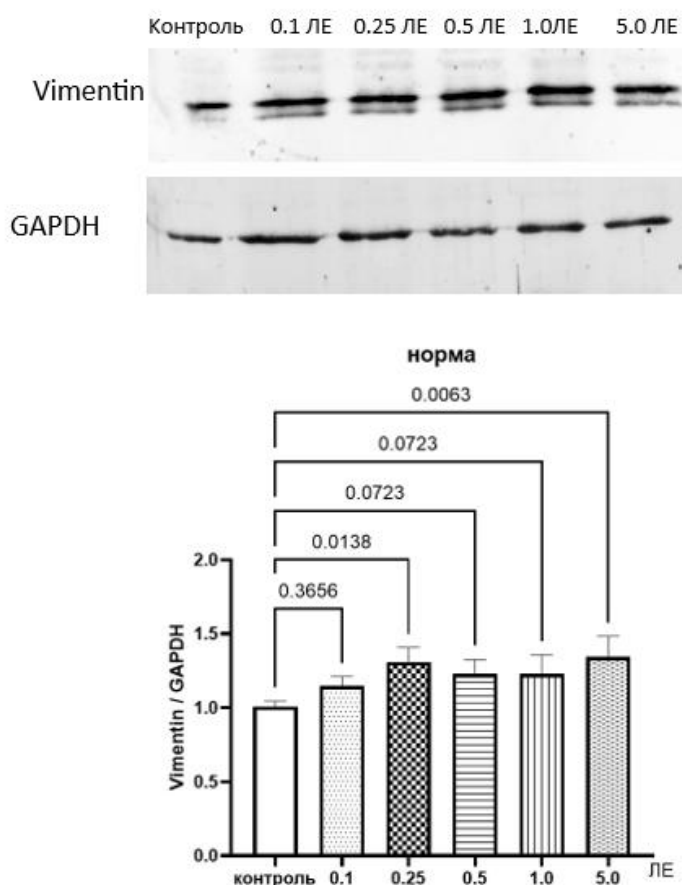


Рисунок 13 – Относительное количество VIM при добавлении различных концентраций сулодексида в первичной культуре HUVEC в сравнении с белком домашнего хозяйства GAPDH

α SMA

В рамках данного исследования в первичных культурах HUVEC был детектирован α SMA, в норме отсутствующий в эндотелиоцитах. Данный феномен может свидетельствовать о пребывании данной клеточной культуры в состоянии EndMT. По результатам Вестерн-блота не было зафиксировано изменения относительного количества α SMA в первичных культурах HUVEC после добавления в кондиционную среду сулодексида в различных концентрациях по сравнению с контролем (Рисунок 14). Данные результаты могут свидетельствовать об отсутствии влияния сулодексида на экспрессию данного белка в культурах HUVEC.

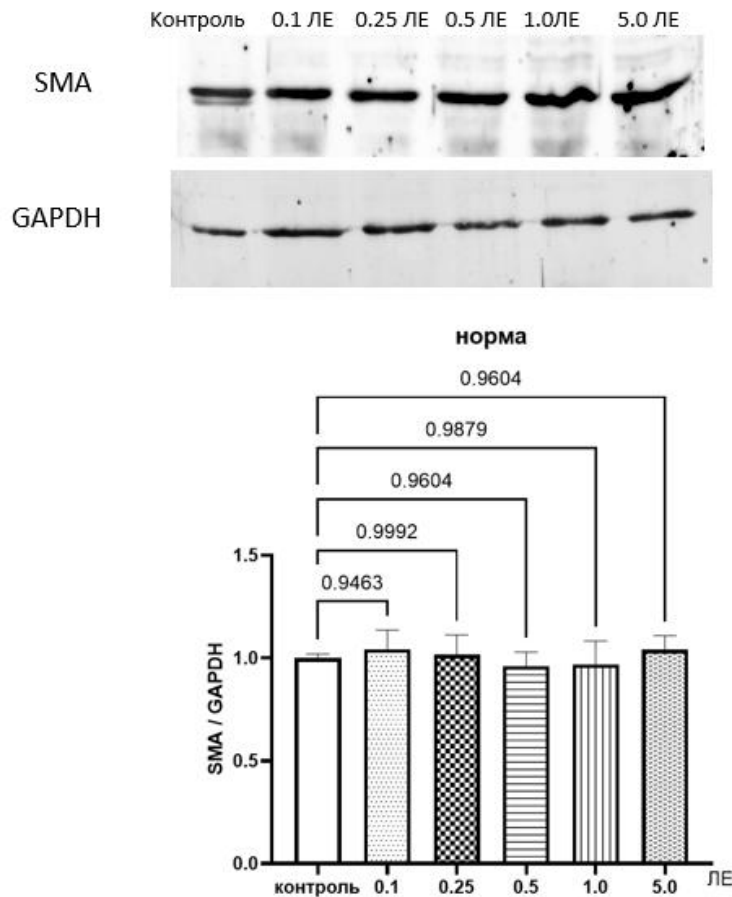


Рисунок 14 – Относительное количество α SMA при добавлении различных концентраций сулодексида в первичной культуре HUVEC в сравнении с белком домашнего хозяйства GAPDH

TGFβ1

При оценке экспрессии TGFβ1 было зафиксировано изменение относительного количества данного белка в первичной культуре клеток HUVEC после добавления в кондиционную среду сулодексида в концентрациях 1,0 ЛЕ/мл (на 14,3%) и при концентрации 5,0 ЛЕ/мл (на 22,7%) по сравнению с контролем (Рисунок 15), что может говорить об ингибирующем влиянии сулодексида на TGFβ1 и, соответственно, EndMT.

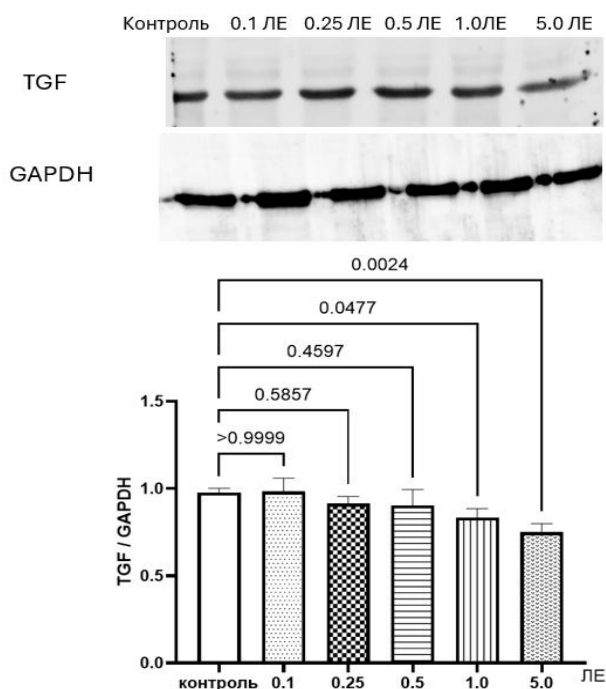


Рисунок 15 – Относительное количество TGFβ1 при добавлении различных концентраций сулодексида в первичной культуре HUVEC в сравнении с белком домашнего хозяйства GAPDH

Результаты оценки относительного количества маркеров EndMT в первичных культурах HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики

CD31

В эндотелиальных клетках HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики было зафиксировано значимое повышение экспрессии CD31 при добавлении сулодексида в концентрации 0,25 ЛЕ/мл (на 28,3%), 0,5 ЛЕ/мл (на 34%) 1,0 ЛЕ/мл (на 37,6%), 5,0 ЛЕ/мл (на 42,6%), данное повышение экспрессии

может свидетельствовать о том, что в нативных эндотелиоцитах и эндотелиоцитах после моделирования баллонной ангиопластики сулодексид способствует повышению основного белка межклеточных контактов данных клеток (Рисунок 16).

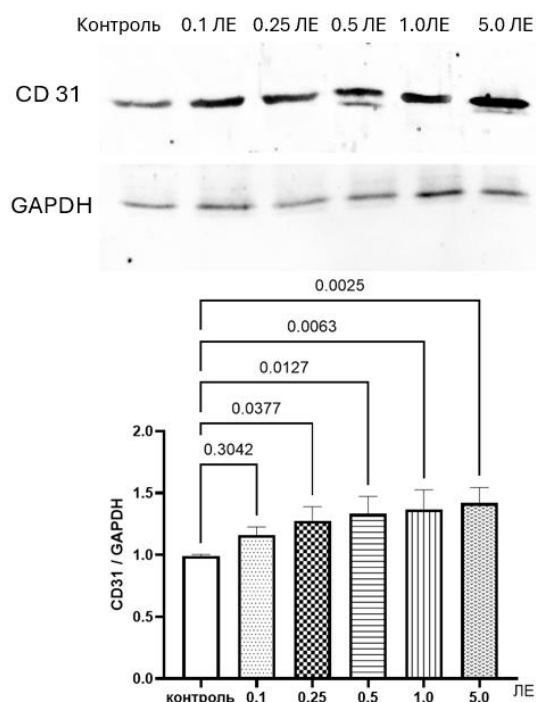


Рисунок 16 – Относительное количество CD31 при добавлении различных концентраций сулодексида в первичной культуре HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики в сравнении с белком домашнего хозяйства GAPDH

vWF

По результатам вестерн-блота было зафиксировано понижение относительного количества vWF в первичной культуре клеток HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики и добавления в кондиционную среду препарата сулодексид в концентрациях 0,25 ЛЕ/мл на 48,6% ($p=0,0039$), 0,5 ЛЕ/мл на 49,0% ($p=0,0037$), 1,0 ЛЕ/мл на 50,0% ($p=0,0032$) 5,0 ЛЕ/мл на 51,6% ($p=0,0025$) по сравнению с контролем (Рисунок 17), что соотносится с данными, полученными в эксперименте с нативными культурами HUVEC. Это может свидетельствовать о положительном влиянии сулодексида на эндотелий-зависимые процессы воспаления и гиперкоагуляции, опосредованные vWF.

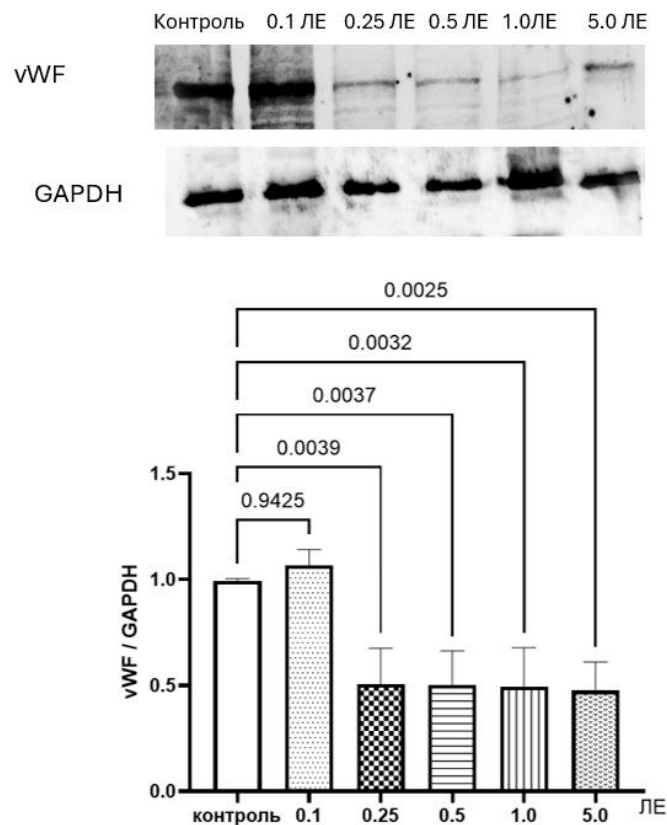


Рисунок 17 – Относительное количество vWF при добавлении различных концентраций сулодексида в первичной культуре HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики в сравнении с белком домашнего хозяйства GAPDH

VIM

По результатам вестерн-блота с культурами HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики было зафиксировано значимое изменение относительного количества VIM в первичных культурах эндотелиоцитов после добавления в кондиционную среду сулодексида в концентрации 0,25 ЛЕ/мл (на 20,3%) ($p=0,0095$), 0,5 ЛЕ/мл (на 34%) ($p=0,0008$), 1,0 ЛЕ/мл (на 37,6%) ($p=0,0046$), 5,0 ЛЕ/мл (на 42,7%) ($p=0,0015$) по сравнению с контролем (Рисунок 18). Данные результаты могут свидетельствовать о влиянии сулодексида на относительное количество данного белка в первичной культуре HUVEC в модели баллонной ангиопластики, и возможном ингибировании EndMT под воздействием данного препарата.

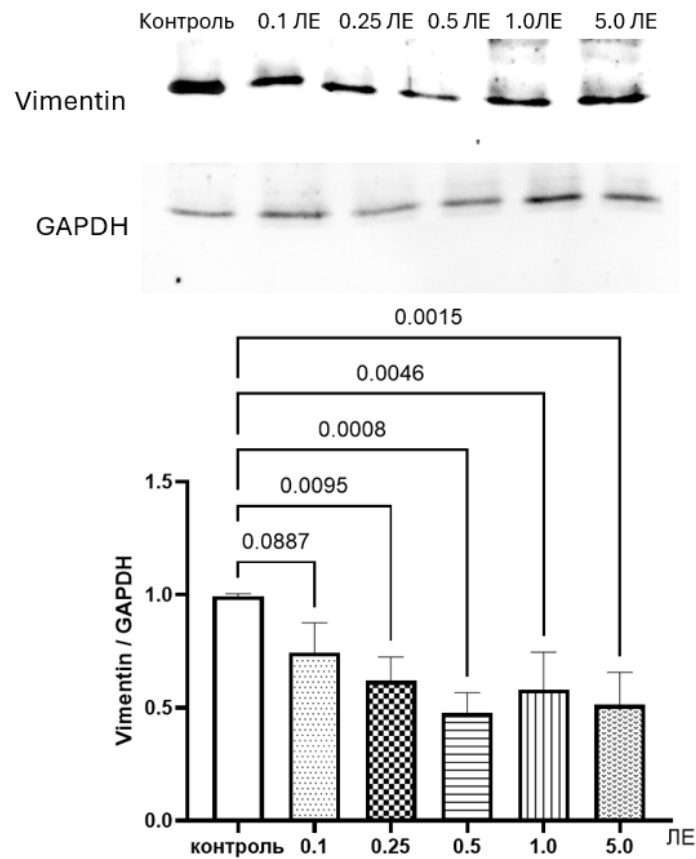


Рисунок 18 – Относительное количество VIM при добавлении различных концентраций сулодексида в первичной культуре HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики в сравнении с белком домашнего хозяйства GAPDH

α SMA

Экспрессия α SMA в эксперименте с первичной культурой HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики и добавлении различных концентраций сулодексида, статистически значимо не изменялась (Рисунок 19).

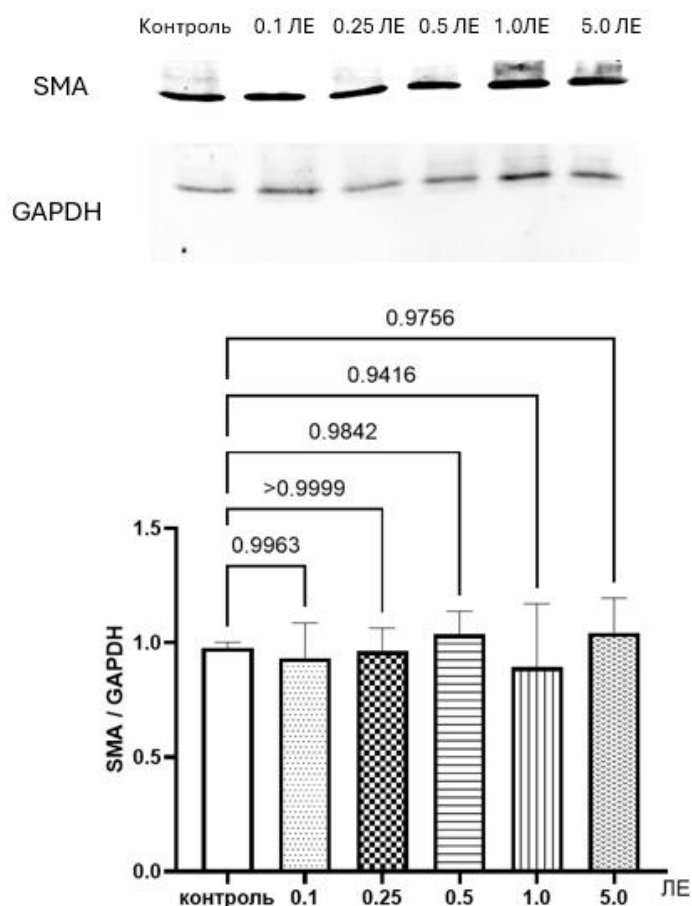


Рисунок 19 – Относительное количество α SMA при добавлении различных концентраций сулодексида в первичной культуре HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики в сравнении с белком домашнего хозяйства GAPDH

TGF β 1

При оценке экспрессии TGF β 1 было зафиксировано изменение относительного количества в первичной культуре HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики и добавления в кондиционную среду сулодексида в концентрациях 0,25 ЛЕ/мл (на 33,3%) ($p=0,0041$), 0,5 ЛЕ/мл (на 27,3%) ($p=0,016$), и при концентрации 5,0 ЛЕ/мл (на 36,6%) ($p=0,0023$), по сравнению с контролем (Рисунок 20). Это может свидетельствовать об ингибирующем влиянии сулодексида на индукцию EndMT.

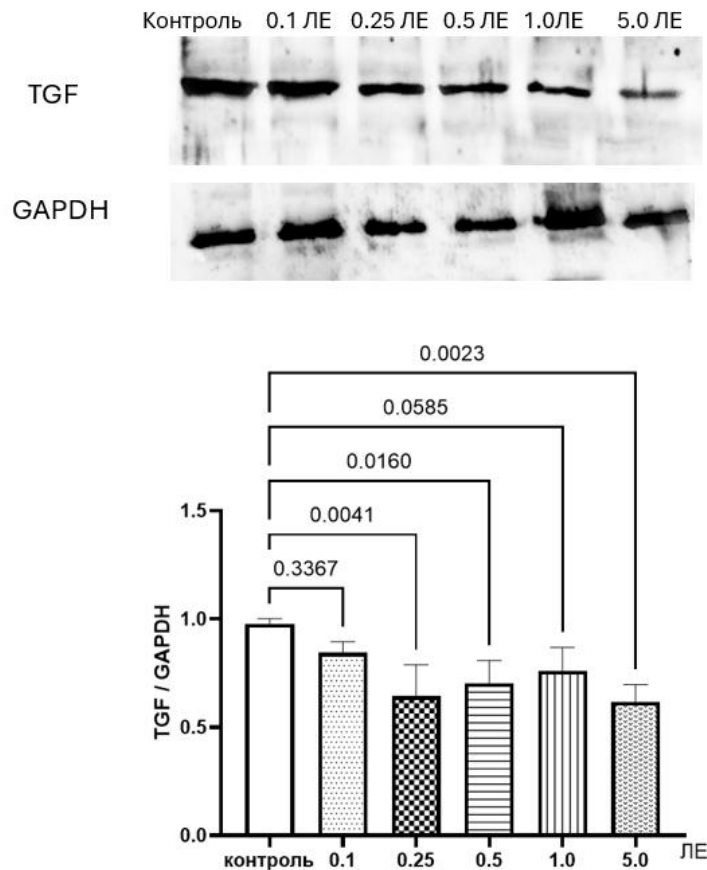


Рисунок 20 – Относительное количество $TGF\beta 1$ при добавлении различных концентраций сулодексида в первичной культуре HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики в сравнении с белком домашнего хозяйства GAPDH

При межгрупповом анализе различий в относительном количестве маркеров EndMT в первичных культурах нативных HUVEC и культурах эндотелиоцитов после моделирования баллонной ангиопластики зафиксировано статистически значимое повышение относительного количества vWF в культурах клеток после моделирования баллонной ангиопластики на 42% ($p=0,0098$) (Рисунок 21), что может быть связано с активацией эндотелиоцитов после механического повреждения сосудистой стенки.

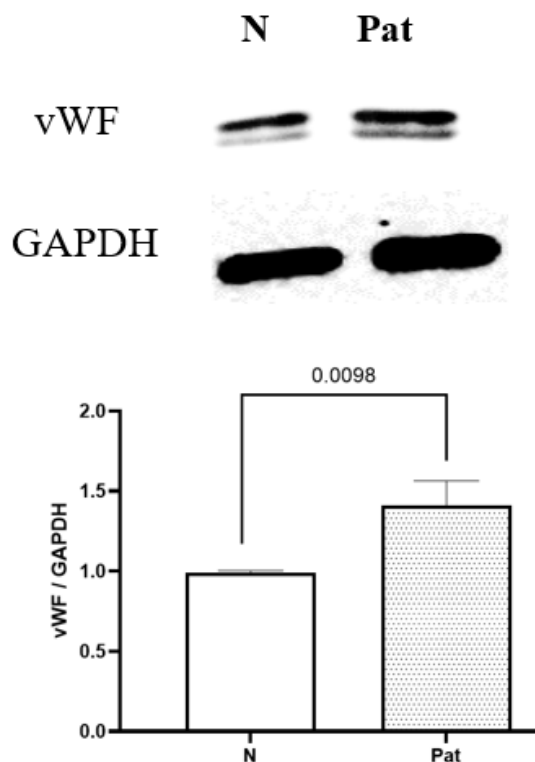


Рисунок 21 – Относительное количество vWF при добавлении различных концентраций сулодексида в первичной нативной культуре HUVEC и в культуре после моделирования баллонной ангиопластики в сравнении с белком домашнего хозяйства GAPDH

Помимо этого, при межгрупповом анализе различий в относительном количестве маркеров EndMT в первичных культурах нативных HUVEC и культур эндотелиоцитов после моделирования баллонной ангиопластики зафиксировано статистически значимое повышение относительного количества VIM в культурах эндотелиоцитов после моделирования баллонной ангиопластики на 60,6% ($p=0,0019$) (Рисунок 22), что может быть связано с процессом эндотелиально-мезенхимального перехода и повышением экспрессии мезенхимальных маркеров после механического повреждения эндотелиоцитов.

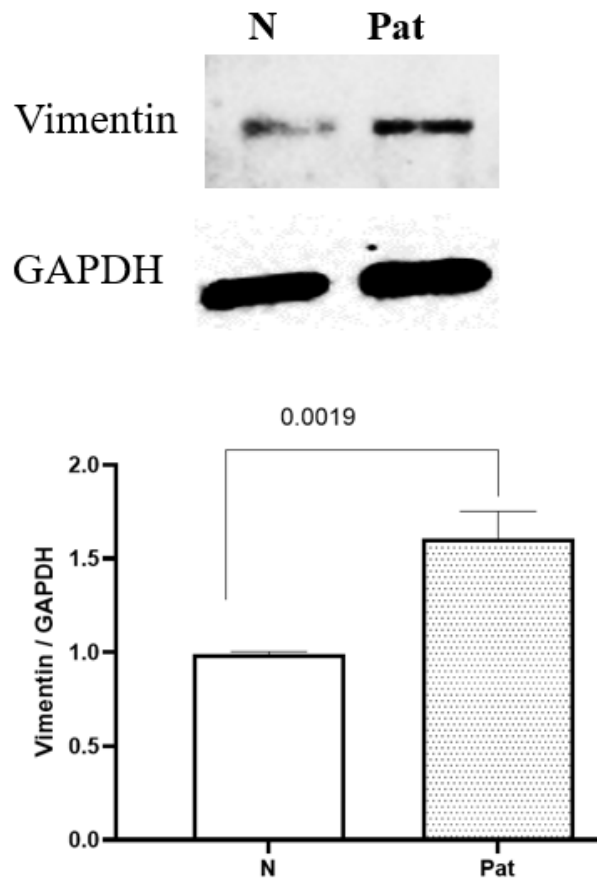


Рисунок 22 – Относительное количество VIM при добавлении различных концентраций сулодексида в первичной нативной культуре HUVEC и в культуре после моделирования баллонной ангиопластики в сравнении с белком домашнего хозяйства GAPDH

Помимо этого, при межгрупповом анализе различий в относительном количестве маркеров EndMT в первичных культурах нативных HUVEC и культур эндотелиоцитов после моделирования баллонной ангиопластики зафиксировано статистически значимое повышение относительной концентрации $TGF\beta 1$ в культурах HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики на 35,3% ($p=0,007$), что может способствовать эндотелиально-мезенхимальному переходу на фоне повышения экспрессии ключевого белка, ассоциированного с индукцией EndMT ($TGF\beta 1$) (Рисунок 23).

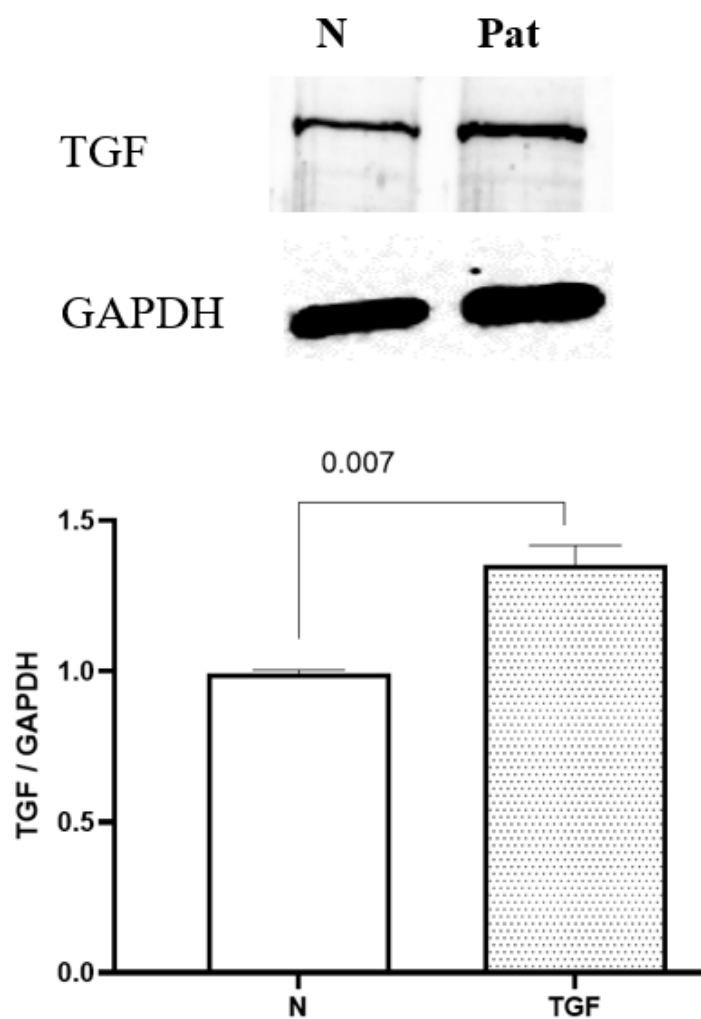


Рисунок 23 – Относительное количество $\text{TGF}\beta 1$ при добавлении различных концентраций сулодексида в первичной нативной культуре HUVEC и в культуре после моделирования баллонной ангиопластики в сравнении с белком домашнего хозяйства GAPDH

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Характеристики пациентов, включенных в исследование

Всего в клиническую часть исследования было включено 80 пациентов с ОААНК с хронической ишемией нижних конечностей II-IV стадии заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна; кроме того, дополнительно у 10 добровольцев оценивался уровень исследуемых маркеров в популяции условно здоровых людей без подтверждённых признаков атеросклероза.

Пациенты были разделены на группы в зависимости от лечения (эндоваскулярное и консервативное), средний возраст в оперативной группе составил $67,1 \pm 8,9$, в консервативной группе $68,8 \pm 7,2$, средний возраст в группе контроля составил $49,7 \pm 4,8$ лет. Опытные группы были сопоставимы по возрасту, полу, уровню и стороне поражения, сопутствующим заболеваниям, исключая ИБС, и исходным значениям лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ).

Несмотря на то, что по отдельным признакам вышеуказанные группы не были полностью сопоставимы (по стадии заболевания, ИБС и предшествующим операциям в анамнезе) при последующем межгрупповом анализе было установлено, что вопреки различиям в стадии заболевания пациенты были сопоставимы по уровням исследуемых маркеров EndMT. Кроме того, ограничение сопоставимости групп по стадии заболевания было связано с более тяжёлым поражением артериального русла, потребовавшего более активной хирургической тактики.

Общая характеристика пациентов, включенных в исследование, в том числе подробное описание уровня поражения артериального русла, стадии заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна, сопутствующей патологии исходов (конечных точек), в течение 1 года наблюдения, значению ЛПИ и уровню маркеров EndMT представлены в Таблицах 5 и 6.

Таблица 5 – Характеристика опытных групп

Показатель	Оперативная группа	Консервативная группа	p
Возраст, лет	67,1±8,9	68,8±7,2	0.331
Пол, n (%)			1
-мужской	24 (60)	24 (50)	
-женский	16 (40)	16 (50)	
Стадия заболевания, n (%)			<0,001
-2А	0 (0)	19 (47,5)	
-2Б	7 (17,5)	14 (35)	
-3	11 (27,5)	5 (12,5)	
-4	22 (55)	2 (5)	
Уровень поражения, n (%)			0,287
-Бедренно-подколенный	19 (47,5)	14 (35)	
-Подколенно-берцовый	6 (15)	2 (5)	
-Дистальный	12 (30)	19 (47,5)	
-Мульти	1 (2,5)	1 (2,5)	
-Синдром Лериша	2 (5)	4 (10)	
Сторона поражения, n (%)			0,205
-Слева	20 (50)	16 (40)	
-Справа	13 (32,5)	10 (25)	
-С обеих сторон	7 (17,5)	14 (35)	
Сопутствующие заболевания, n (%)			-
-Гипертоническая болезнь	40 (100)	30 (75)	0,012
-Ишемическая болезнь сердца	19 (47,5)	20 (50)	0,175
-Инфаркт миокарда в анамнезе	14 (35)	19 (47,5)	0,115
-Сахарный диабет	26 (65)	9 (22,5)	0,048
-Операция в анамнезе	2 (5)		
Стент			<0,001
-Да	12 (30)	0 (0)	
-Нет	28 (70)	40 (100)	
ЛПИ (V0)	0,455 (0,31-0,73)	0,49 (0,42-0,55)	0,946
αSMA (V0), нг/мл	1,92 (1,32-2,62)	1,91 (1,37-2,88)	0,847
vWF (V0), нг/мл	79,57 (51,6-130,02)	51,6 (33,64-93,72)	0,028
CD31 (V0), нг/мл	5,02 (4,03-5,52)	5,03 (4,37-6,12)	0,273
VIM (V0), нг/мл	3,21 (1,84-6,82)	5,01 (2,36-10,2)	0,288
TGFβ1 (V0), нг/мл	210,13 (131,51-721,5)	397,81 (153,11-873)	0,122

Таблица 6 – Характеристика контрольной группы (здоровые добровольцы)

Показатель	Значение
Возраст, лет	49,7±4,81
Пол, n (%)	
-мужской	6 (60)
-женский	4 (40)
α SMA (V0), нг/мл	2,85 (0,89-4,52)
vWF (V0), нг/мл	207,8 (158,9-247,4)
CD31 (V0), нг/мл	4,18 (3,6-4,51)
VIM (V0), нг/мл	17,95 (6,43-32,1)
TGF β 1 (V0), нг/мл	930,6 (835,5-987,6)

Добровольцы в контрольной группе не сопоставимы по возрасту с пациентами в оперативной и консервативной группе ввиду высокой распространённости атеросклероза в пожилой и старческой возрастной группе.

Более высокие уровни VIM, α SMA, TGF β 1 у лиц контрольной группы в сравнении с пациентами с атеросклерозом, по-видимому, могут свидетельствовать о наличии у здоровых добровольцев более высокого пролиферативно-регенеративный потенциала.

Динамика количественных показателей среди всех пациентов в исследовании с поправкой на множественное сравнение

В Таблице 7 представлены показатели EndMT в зависимости от метода лечения. В данной таблице V0-точка включения в исследование, V1-контрольная точка через 1 месяц после включения и V2- через 3 месяца после включения.

Таблица 7 – Динамика количественных маркеров EndMT

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

Оперативная группа

Статистически значимое увеличение ЛПИ в оперативной группе относительно точки включения в исследование (V0) и первой контрольной точки (V1) 0,46 (0,31-0,73) и 0,83 (0,69-1,15), соответственно (на 81,25%), свидетельствует об эффективности реваскуляризирующей операции (баллонной ангиопластики и/или стентирования) p=0,001.

Отмечается статистически значимое снижение уровня ЛПИ (на 26,03%) в оперативной группе в контрольных точках V1 и V2, значения которого составили

0,83 (0,69-1,15) и 0,66 (0,4-0,81), соответственно ($p=0,001$), что может быть связано с развитием рестеноза в зоне оперативного вмешательства.

В оперативной группе наблюдается статистически значимое повышение уровня vWF с 79,57 (51,6-130,02) нг/мл в V0 до 104,35 (74,95-147,63) нг/мл (на 31,25%) в V1 и до 163,63 (88,85-202,04) нг/мл (на 57%) в V2 ($p=0,002$), что, вероятно, связано с тем, что ангиопластика вызывает активацию эндотелиоцитов в ответ на механическое воздействие; это проявляется повышением уровня маркера воспаления и гемостатической дисфункции vWF, что соответствует данным литературы [10, 110].

При оценке показателей α SMA, CD31, VIM статистически значимых различий не было получено. Возможно, изменение вышеуказанных параметров не было статистически значимым в связи с ограниченной выборкой пациентов.

Консервативная группа

В консервативной группе в течение трёх месяцев зафиксировано статистически значимое снижение ЛПИ, с 0,49 (0,42-0,55) до 0,455 (0,4-0,535) $p=0.005$. Данные изменения можно связать с процессом прогрессирования атеросклероза в течении трёх месяцев.

Помимо этого, в данной группе пациентов статистически значимо снижался уровень vWF с 51,6 (33,64-93,72) нг/мл, до 41,24 (32,32-46,2) нг/мл ($p=0,004$); подобное снижение маркера воспаления и гиперкоагуляции можно связать с положительным воздействием сулодексида, что соответствует опубликованным данным пациентов со схожей патологией [61].

Было зафиксировано значимое повышение уровня CD31 с 5,03 (4,37-6,12) нг/мл до 6,22 (5,72-6,6) нг/мл, данные изменения можно связать с положительным влиянием сулодексида на основной маркер клеточных контактов эндотелиоцитов ($p<0,001$).

Было зафиксировано значимое снижение уровня TGF β 1 с 397,81 (153,11-87) нг/мл до 162,85 (146,85-178,5) нг/мл ($p=0,001$), что может свидетельствовать о

существенном ингибирующем влиянии сулодексида на ключевой маркер EndMT, что соотносится с данными, полученными в экспериментальной части исследования.

Различия между консервативной и оперативной группами представлены в Таблице 8.

Таблица 8 – Различия между консервативной и оперативной группами V2 (3 мес.)

Показатель	Оперативная группа	Консервативная группа	p
ЛПИ	0,66(0,4-0,81)	0,455(0,4-0,54)	0,027
α SMA, нг/мл	1,66(1,12-2,14)	2,06(1,54-2,65)	0,023
vWF, нг/мл	163,63(88,85-202,04)	41,24(32,32-46,2)	<0,001
CD31, нг/мл	5,5(5,06-6,32)	6,22(5,72-6,6)	0,012
VIM, нг/мл	4,16(2,61-5,61)	3,83(1,7-5,18)	0,218
TGF β 1, нг/мл	162,49(132,24-187,2)	162,85(146,85-178,5)	0,509

Были получены статистически значимые различия между показателями ЛПИ между оперативной и консервативной группой через 3 месяца после включения в исследование, в оперативной группе ЛПИ превышал данный показатель в консервативной на 44,06%, и составлял 0,66 (0,4-0,81) и 0,4 (0,46-0,54) соответственно, данное явление можно связать с эффективностью оперативного лечения в течении 3х месяцев ($p=0,027$).

Помимо этого, в оперативной группе зафиксировано более низкое значение такого показателя как α SMA (на 24.1%), данные изменения могут характеризовать особенности ответа клеточных элементов сосудистой стенки на механическое воздействие при баллонной ангиопластике. Важно отметить, что в норме α SMA в эндотелиоцитах не содержится, этим можно объяснить отсутствие влияние сулодексида на изменение уровня данного маркера.

В оперативной группе спустя три месяца после включения наблюдается более высокий уровень vWF (на 196,64%) (163,63 (88,85-202,04)) нг/мл в сравнении с группой, получавшей только консервативное лечение с сулодексидом (41,24 (32,32-46,2)) нг/мл ($p<0,001$). Данное явление можно связать с двумя факторами. Первый - ангиопластика, которая вызывает активацию эндотелия в ответ на механическое воздействие, что в свою очередь проявляется избыточной

экспрессией маркера воспаления и гемостатической дисфункции vWF, что не противоречит ранее опубликованным данным [110]. Второй – это противовоспалительное действие препарата сулодексид, описанное исследователями ранее [61].

Меньшие значения такого показателя как CD31 в оперативной группе, относительно консервативной (на 13,09%), вероятно, связано с проявлениями эндотелиальной дисфункции в виду заведомо более тяжёлой стадии заболевания и перенесённой операцией в оперативной группе в ответ на механическое воздействие ($p=0,012$).

Межгрупповые различия маркеров EndMT у пациентов оперативной и консервативной групп в зависимости от стадии заболевания

Исходные значения показателей EndMT у пациентов оперативной и консервативной групп (за исключением vWF) были сопоставимы вне зависимости от стадии заболевания, поэтому несопоставимость групп по степени ХИНК при проведении межгруппового анализа своей роли в этом отношении не сыграла за исключением межгруппового различия по маркеру CD31 во 2й контрольной точке – 3 месяца ($p=0,044$); вероятно, данное различие может быть связано с механическим повреждением интимы в результате эндоваскулярного оперативного вмешательства и явлениями EndMT.

Учитывая сопоставимость по уровню остальных исследуемых маркеров EndMT, можно судить о том, что даже при начальных стадиях ХИНК отмечаются выраженные биохимические изменения исследуемых показателей в крови пациентов.

Таблицы сопряженности по группам

В Таблице 9 представлены основные неблагоприятные исходы заболевания в основные контрольные точки.

Таблица 9 – Сопряженность по конечным точкам

Показатель	Оперативная группа	Консервативная группа	ОШ (95% ДИ)	ОР (95% ДИ)	p
V1					
Рестеноз	5 (12,5%)	-	-	-	-
Прогрессирование	4 (10%)	-	-	-	-
Тромбоз	1 (2,5%)	-	-	-	-
Острый ИМ	1 (2,5%)	-	-	-	-
Смерть	0 (0%)	-	-	-	-
Онкология	0 (0%)	-	-	-	-
V2					
Рестеноз	14 (35%)	-	-	-	-
Прогрессирование	11 (27%)	6 (15%)	2,15 (0,71-6,53)	1,41 (0,9-2,19)	0,172
Тромбоз	1 (2,5%)	0 (0%)	-	-	1
Острый ИМ	2 (5%)	0 (0%)	-	-	0,494
Смерть	1 (2,5%)	1 (2,5%)	1 (0,06-16,56)	1 (0,25-4,07)	1
Онкология	0 (0%)	0 (0%)	-	-	-
V3					
Рестеноз	21 (52,5%)	-	-	-	-
Прогрессирование	17 (42,5%)	6 (15%)	4,19 (1,44-12,22)	1,83 (1,23-2,73)	0,007
Тромбоз	2 (5%)	0 (0%)	-	-	0,494
Острый ИМ	3 (7,5%)	2 (5%)	-	-	1
Смерть	4 (10%)	4 (10%)	1 (0,23-4,31)	1 (0,48-2,08)	1
Онкология	1 (2,5%)	0 (0%)	-	-	1
Ампутация	10 (25%)	0 (0%)	-	-	0,001
Операция (повторная для оперативной группы)	10 (25%)	2 (5%)	6,33 (1,29-31,14)	1,89 (1,31-2,73)	0,025

При анализе таблиц сопряженности отмечены статистически значимые различия в прогрессировании стадии ХИНК в оперативной группе у 17 пациентов (42,5%) в отличие от группы с консервативным лечением - у 6 пациентов (15%) ($p=0,007$). Данное явление можно объяснить изначально более тяжелым течением атеросклероза у пациентов оперативной группы и воздействием операционной травмы.

4.1.1 ROC-анализ в группах клинической части исследования

При проведении ROC-анализа в группе пациентов после оперативного лечения с целью оценки ассоциации изученных маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода и неблагоприятных исходов была выявлена прогностическая роль VIM в развития рестеноза в зоне оперативного вмешательства в течение года наблюдения (Рисунок 24).

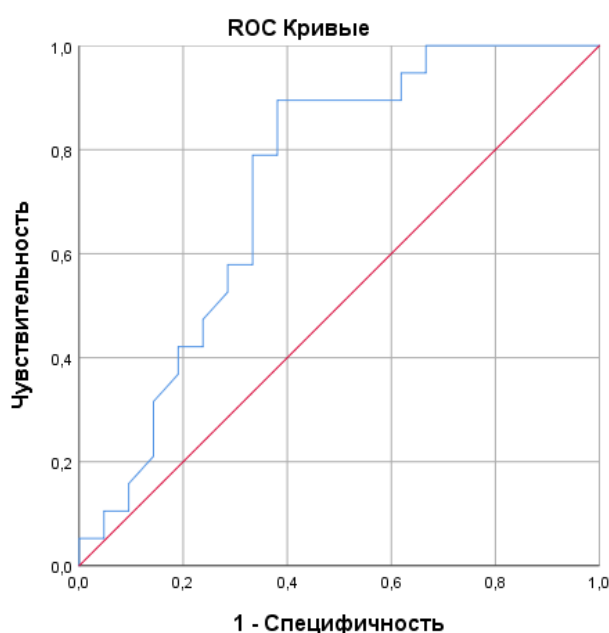


Рисунок 24 – ROC-анализ прогрессирования рестеноза в течении года на основе показателей VIM

Площадь под ROC-кривой составила $0,73 \pm 0,081$ с 95% ДИ: 0,57-0,89. Значимость модели – ($p=0,012$). Пороговое значение VIM в точке cut-off, определенное с помощью индекса Юдена, – 4,38 нг/мл. Направление проверки по убыванию, при значении VIM до операции равно или ниже точки cut-off прогнозируется развитие рестеноза в течение 1 года после операции. Чувствительность и специфичность метода – 89,5% и 61,9%, соответственно.

Полученные данные соответствуют имеющейся информации о том, что заведомо более высокий уровень виментина, участвующего в процессах фиброза и EndMT, ассоциируется со снижением отдаленной проходимости зоны оперативного вмешательства, тем самым ухудшается долгосрочный прогноз

операции [67].

По аналогии был проведён ROC-анализ данных по прогрессированию (более тяжёлая стадия ХИНК) заболевания в течение 1 года.

Была построена модель прогнозирования прогрессирования атеросклероза в течение 1 года после операции на основании исходных значений VIM (Рисунок 25).

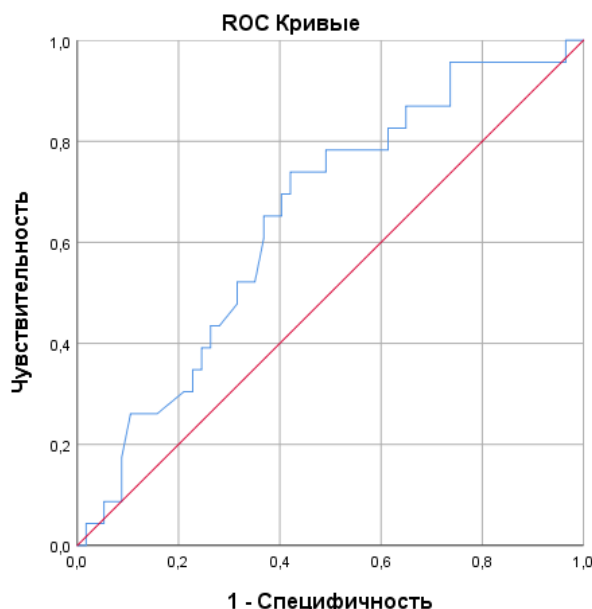


Рисунок 25 – ROC-анализ прогрессирования ХИНК в течении года на основе показателей VIM

Площадь под ROC-кривой составила $0,65 \pm 0,07$ с 95% ДИ: 0,52-0,78. Значимость модели – $p=0,038$. Пороговое значение VIM в точке cut-off, определенное с помощью индекса Юдена, – 4,27 нг/мл. Направление проверки по убыванию, при значении VIM до операции равно или ниже точки cut-off прогнозируется развитие прогрессирования заболевания течение 1 года. Чувствительность и специфичность метода – 73,9% и 57,9%, соответственно.

Как было ранее сказано, исходно высокий уровень VIM является предиктором рестеноза, а значит и ухудшения проходимости артериального русла, что в свою очередь ассоциировано с более тяжёлыми клиническими проявлениями ОААНК, соответственно более высокой стадией заболевания по классификации А.В. Покровского.

При проведении ROC-анализа в группе пациентов после эндоваскулярного

лечения с целью оценки ассоциации изученных параметров EndMT и неблагоприятных исходов была выявлена прогностическая роль уровня CD31, развития рестеноза и уровня CD31, TGF β 1 и прогрессирования стадии ОААНК. Активности vWF, и TGF β 1 и развития летального исхода.

CD31 и рестеноз

ROC-анализ позволил создать прогностическую модель прогнозирования рестеноза в течение 3 месяцев после операции на основании исходных значений CD31 (Рисунок 26).

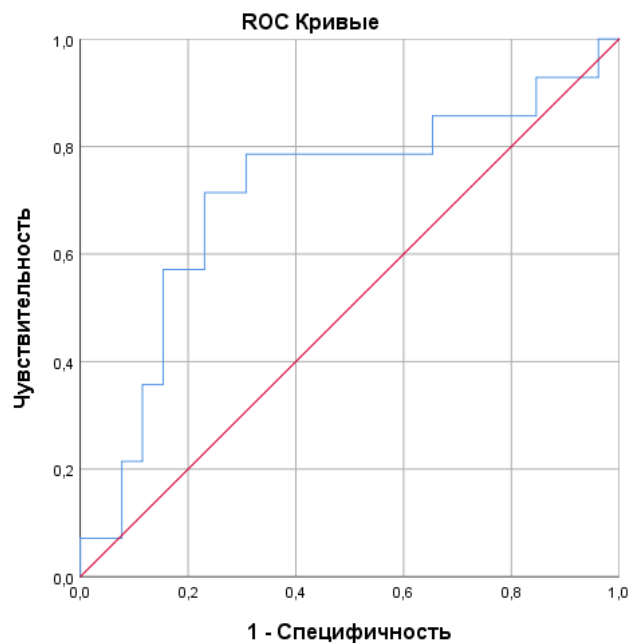


Рисунок 26 – ROC-анализ прогрессирования рестеноза в течении трёх месяцев на основе показателя CD31

Площадь под ROC-кривой составила $0,71 \pm 0,09$ с 95% ДИ: 0,53-0,89. Значимость модели – $p=0,031$. Пороговое значение CD31 в точке cut-off, определенное с помощью индекса Юдена, – 5,29 нг/мл. Направление проверки по возрастанию, при значении CD31 до операции равном или выше точки cut-off прогнозируется развитие рестеноза в течение 3 месяцев после операции. Чувствительность и специфичность метода – 71,4% и 76,9%, соответственно.

ROC-анализ подтвердил связь уровня CD31 и развития рестеноза после эндоваскулярных оперативных вмешательств. Данная модель соотносится с данными эксперимента (Chen Z et al.) на лабораторных мышах, в результате эксперимента дефицит CD31 провоцировал ремоделирование в сосудистой стенке, увеличивал адгезию лейкоцитов в интима, данные факторы являются провоцирующими в развитии рестеноза после оперативного вмешательства [51].

TGF β 1 и прогрессирование стадии ХИНК

ROC-анализ позволил создать прогностическую модель прогнозирования прогрессирования ХИНК в течение 1 месяца после операции на основании исходных значений TGF β 1 (Рисунок 27).

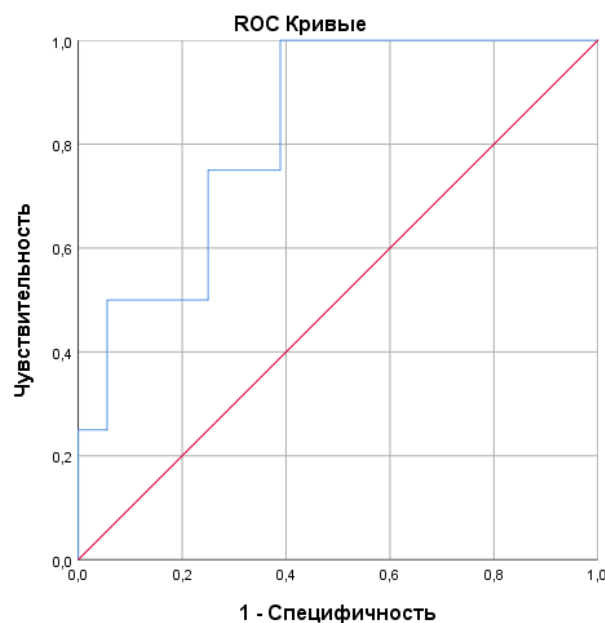


Рисунок 27 – ROC-анализ прогрессирования стадии заболевания в течении месяца на основе показателя TGF β 1

Площадь под ROC-кривой составила $0,83 \pm 0,09$ с 95% ДИ: 0,65-1. Значимость модели $p=0,034$. Пороговое значение TGF β 1 в точке cut-off, определенное с помощью индекса Юдена, – 307,2 нг/мл. Направление проверки по возрастанию, при значении TGF- β 1 до операции равно или выше точки cut-off прогнозируется прогрессирование стадии ОААНК в течение 1 месяца после операции. Чувствительность и специфичность метода – 100% и 61,1%,

соответственно.

Согласно данным литературы TGF β 1 является одним из нескольких важных семейств факторов, влияющих на сосудистое русло. Значительное количество данных указывает на то, что TGF β 1 является ключевым модулятором нормального и аномального восстановления сосудов и что дисфункции в этом пути способствуют провоспалительной, профиброзной и проатеросклеротической перестройке сосуда. Однако данный фактор может быть как «атеропротекторный», так и как «атерогенный»; в условиях отсутствия механического повреждения сосуда TGF β 1 выступает как атеропротекторный фактор и его высокий уровень снижает риск прогрессирования атеросклероза, но в случае оперативного вмешательства на сосудах данный фактор провоцирует аномальное ремоделирование сосудов, что сопоставимо с полученными нами данными [139].

TGF- β и летальный исход

ROC-анализ позволил создать прогностическую модель прогнозирования летального исхода в течение 1 года периода наблюдения на основании исходных значений TGF β 1 (Рисунок 28).

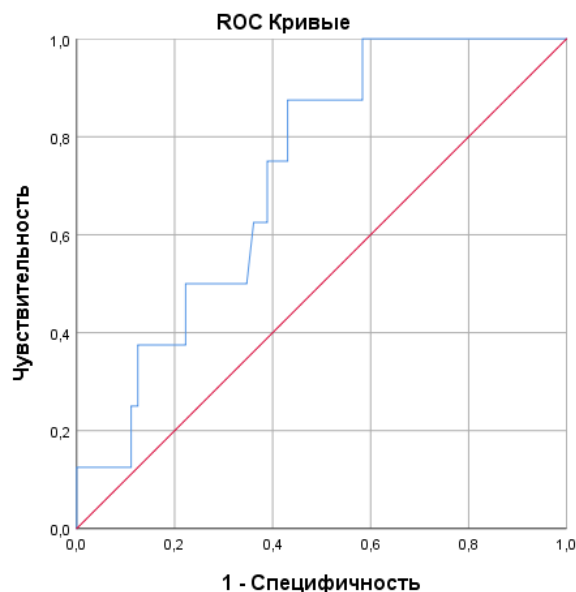


Рисунок 28 – ROC-анализ прогнозирования летального исхода в течение года на основе показателя TGF β 1

Площадь под ROC-кривой составила $0,72 \pm 0,08$ с 95% ДИ: 0,58-0,87. Значимость модели $p=0,039$. Пороговое значение $TGF\beta 1$ в точке cut-off, определенное с помощью индекса Юдена, – 307,2 нг/мл. Направление проверки по возрастанию, при значении $TGF\beta 1$ до операции равно или выше точки cut-off прогнозируется летальный исход в течение 1 года. Чувствительность и специфичность метода – 87,5% и 56,9%, соответственно.

Согласно данным литературы, более высокий уровень данного фактора является атерогенным, а более агрессивное прогрессирование атеросклероза в значительной степени повышает риск негативных сердечно-сосудистых событий, приводящих к летальному исходу [73].

vWF и летальный исход

ROC-анализ позволил создать прогностическую модель прогнозирования летального исхода в течение 1 года периода наблюдения на основании исходных значений vWF (Рисунок 29).

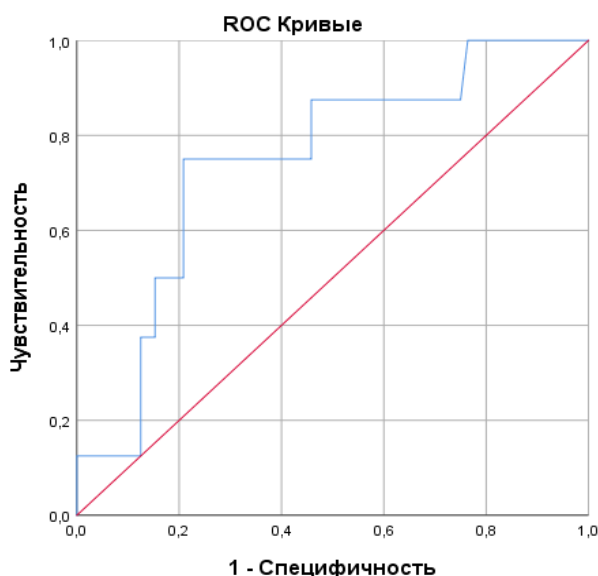


Рисунок 29 – ROC-анализ прогнозирования летального исхода в течении года на основе показателя vWF

Площадь под ROC-кривой составила $0,75 \pm 0,09$ с 95% ДИ: 0,58-0,92. Значимость модели – 0.023. Пороговое значение vWF в точке cut-off, определенное с помощью индекса Юдена, – 104,25 нг/мл. Направление проверки

по возрастанию, при значении vWF до операции равном или выше точки cut-off прогнозируется летальный исход в течение 1 года. Чувствительность и специфичность метода – 75% и 79.2%, соответственно.

Полученные данные по связи повышенного уровня vWF у пациентов с ОААНК, у которых в течение года произошёл летальный исход, соответствуют мировым литературным данным, согласно которым vWF рассматривается в качестве важного прогностического маркера высокого риска развития тяжелых сердечно-сосудистых осложнений, что согласно нашим исследованиям, справедливо и для пациентов с ОААНК [121].

Возраст и летальный исход

Нами были проанализированы различные возрастные группы, и исходя из этих данных построена модель прогнозирования летального исхода в течение одного года на основании возраста пациента с ОААНК.

ROC-анализ позволил создать прогностическую модель прогнозирования летального исхода в течение 1 года периода наблюдения на основании возраста (Рисунок 30).

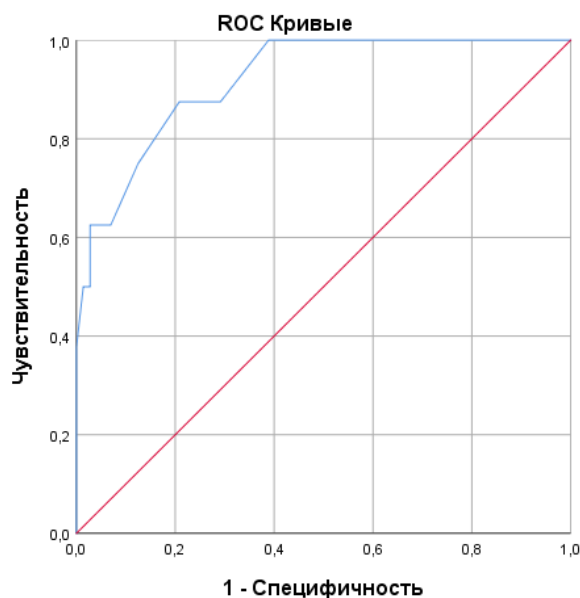


Рисунок 30 –ROC-анализ прогнозирования летального исхода в течении года на основе показателя возраста пациента

Площадь под ROC-кривой составила $0,92 \pm 0,04$ с 95% ДИ: 0,83-1.

Значимость модели <0.001 . Пороговое значение возраста в точке cut-off, определенное с помощью индекса Юдена, – 73,5года. Направление проверки по возрастанию, при значении возраста до операции равном или выше точки cut-off прогнозируется летальный исход в течение 1 года. Чувствительность и специфичность метода – 87,5% и 79,2%, соответственно.

Ведущую роль в статистике смертности в Российской Федерации на данный момент занимают заболевания сердечно-сосудистой системы, к которым относится ОААНК, однако в большинстве случаев атеросклероз носит системный характер, и поражает не только артерии нижних конечностей, но и артерии сердца, головного мозга, желудочно-кишечного тракта. По данным литературы прогрессирование данных заболеваний и соответственно риск летального исхода тесно ассоциирован с возрастом и полом пациентов, что соответствует полученным нами данным [73].

4.1.2 Логистическая регрессия

Проведение бинарной логистической регрессии среди двух групп пациентов, включая субанализ по стадиям заболеваний в отношении изучаемых маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода и основных осложнений, в том числе прогрессирования заболевания, рестеноза, тромбоза, инфаркта миокарда, летального исхода, позволило разработать ряд прогностических моделей, включая оценку риска прогрессирования стадии ХИНК в различные сроки с момента начала лечения.

Прогрессирование стадии ХИНК в течение 3 месяцев

Исходя из анализа логистической регрессии получены прогностические данные в отношении прогрессирования ХИНК в течение 3 месяцев, статистически значимыми в отношении прогрессирования являются показатели CD31 (1,96 (1,27-3,01)%) $p=0,002$ при многофакторном анализе и (2,35 (1,42-3,88)%) $p=0,001$

при однофакторном анализе, данные изменения соответствуют экспериментальным данным других авторов [51]. Помимо CD31 негативную роль играет наличие инфаркта миокарда среди сопутствующих заболеваний, что можно объяснить более тяжёлым системным течением атеросклероза. При проведении логистической регрессии были получены схожие данные относительно прогрессирования ХИНК в течении 1 года, ассоциированного с изменением уровня CD31 (Таблица 10).

Таблица 10 – Прогрессирование стадии ХИНК в течении 3-х месяцев для опытных групп

Показатель	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОШ (95% ДИ)	p	ОШ (95% ДИ)	p
Возраст	1,079 (0,9997-1,164)	0,051	1,092 (0,99-1,204)	0,077
Пол				
-мужской	0,94 (0,295-2,793)	0,911	-	-
-женский	1,064 (0,358-3,164)			
Стадия заболевания				
-2А-2Б	0,151 (0,039-0,577)	0,006	0,079 (0,015-0,408)	0,002
-3-4	6,641 (1,732-25,465)		12,673 (2,453-65,463)	
Уровень поражения				
-Бедренно-подколенный	0,727 (0,239-2,212)	0,575		
-Подколенно-берцовый	1,267 (0,232-6,944)	0,785		
-Дистальный	1,546 (0,524-4,566)	0,43	-	-
-Мульти	3,876 (0,23-66,667)	0,347		
-Синдром Лериша	-	-		
Сторона поражения				
-Слева	1,042 (0,321-3,378)	0,946	-	-
-Справа	1,111 (0,38-3,257)	0,848		
-С обеих сторон	0,833 (0,238-2,907)	0,774		
Сопутствующие заболевания				
-Гипертоническая болезнь	-	-	-	-
-Ишемическая болезнь сердца	1,206 (0,395-3,676)	0,742	-	-
-Инфаркт миокарда в анамнезе	1,709 (0,582-5,025)	0,329	-	-
-Сахарный диабет	4,808 (1,259-18,519)	0,022	26,29 (0,728-949,812)	0,074
-Операция в анамнезе	1,473 (0,345-6,289)	0,601	-	-
Группа исследования				
-Оперативная	2,151 (0,708-6,536)	0,177	-	-
-Консервативная	0,465 (0,153-1,413)			
Стент	0,295 (0,035-2,469)	0,26	-	-
ЛПНП (V0)	0,297 (0,031-2,874)	0,295	-	-
α SMA (V0), нг/мл	0,905 (0,666-1,229)	0,522	-	-
vWF (V0), нг/мл	1,005 (0,999-1,012)	0,11	-	-
CD31 (V0), нг/мл	1,957 (1,272-3,012)	0,002	2,347 (1,421-3,877)	0,001
VIM (V0), нг/мл	0,922 (0,834-1,02)	0,116	-	-
TGF β 1 (V0), нг/мл	0,998 (0,997-1,0002)	0,086	1 (0,998-1,002)	0,763

Прогрессирование стадии ХИНК в течение 1 года

Основываясь на данных логистической регрессии получены прогностические данные в отношении прогрессирования ХИНК в течение 1 года, статистически значимыми в отношении прогрессирования являются показатели CD31 (1,535 (1,036-2,276)) нг/мл $p=0,033$ при многофакторном анализе и (1,43 (1,012-2,021)) нг/мл $p=0,043$ при однофакторном анализе, данные изменения соответствуют экспериментальным данным других авторов [51]. Помимо CD31 негативную роль играет наличие сахарного диабета второго типа среди сопутствующих заболеваний, что можно объяснить более тяжёлым системным течением атеросклероза (Таблица 11).

Таблица 11 – Прогрессирование стадии ХИНК в течение 1 года

Показатель	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОШ (95% ДИ)	p	ОШ (95% ДИ)	p
Возраст	1,025 (0,963-1,09)	0,441	-	-
Пол				
-мужской	0,637 (0,239-1,695)	0,366	-	-
-женский	1,571 (0,59-4,184)			
Стадия заболевания				
-2А	0,098 (0,012-0,789)	0,029	0,628 (0,052-7,601)	0,714
-2Б	0,495 (0,146-1,675)	0,258	-	-
-3	2,333 (0,748-7,283)	0,145	-	-
-4	3,103 (1,112-8,654)	0,031	0,53 (0,098-2,866)	0,461
Уровень поражения				
-Бедренно-подколенный	0,884 (0,329-2,376)	0,807	-	-
-Подколенно-берцовый	0,81 (0,151-4,339)	0,805		
-Дистальный	1,696 (0,635-4,53)	0,292		
-Мульти	2,545 (0,152-42,506)	0,515		
-Синдром Лериша	-	-		
Сторона поражения				
-Слева	1,121 (0,389-3,234)	0,833	-	-
-Справа	1,5 (0,567-3,967)	0,414		
-С обеих сторон	0,495 (0,146-1,675)	0,258		
Сопутствующие заболевания				
-Гипертоническая болезнь	-	-	-	-
-Ишемическая болезнь сердца	0,758 (0,283-2,03)	0,582	-	-
-Инфаркт миокарда в анамнезе	1,058 (0,398-2,812)	0,91	-	-
-Сахарный диабет	5,662 (1,71-18,758)	0,005	4,694 (1,315-16,758)	0,017
-Операция в анамнезе	0,919 (0,221-3,821)	0,907	-	-

<i>Продолжение Таблицы 11</i>				
Группа исследования				
-Оперативная	4,184 (1,437-12,195)	0,009	5,025 (1,468-17,241)	0,01
-Консервативная	0,239 (0,082-0,696)		0,199 (0,058-0,681)	
Стент	0,448 (0,09-2,224)	0,326	-	-
ЛПИ (V0)	1,44 (0,29-7,158)	0,656	-	-
α SMA (V0), нг/мл	1,033 (0,856-1,246)	0,735	-	-
vWF (V0), нг/мл	1,003 (0,997-1,009)	0,325	-	-
CD31 (V0), нг/мл	1,43 (1,012-2,021)	0,043	1,535 (1,036-2,276)	0,033
VIM (V0), нг/мл	0,963 (0,915-1,013)	0,143	-	-
TGF β 1 (V0), нг/мл	0,999 (0,998-1,001)	0,336	-	-

Прогрессирование стадии ХИНК в течение 3 месяцев после операции для оперативной группы

Получены прогностические данные в отношении прогрессирования ХИНК в течение 3 месяцев для оперативной группы пациентов (Таблица 12).

Таблица 12 – Прогрессирование стадии ХИНК в течение 3 месяцев после операции для оперативной группы

Показатель	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОШ (95% ДИ)	р	ОШ (95% ДИ)	р
Возраст	1,059 (0,968-1,16)	0,211	-	-
Пол				
-мужской	1,235 (0,295-5,181)	0,773	-	-
-женский	0,81 (0,193-3,395)			
Стадия заболевания				
-2А	-	-		
-2Б	-	-	-	-
-3	0,984 (0,208-4,673)	0,984		
-4	2,857 (0,629-12,987)	0,174		
Уровень поражения				
-Бедренно-подколенный	1,477 (0,366-5,952)	0,584		
-Подколенно-берцовый	1,389 (0,216-8,929)	0,729		
-Дистальный	0,833 (0,178-3,891)	0,817	-	-
-Мульти	-	-		
-Синдром Лериша	-	-		
Сторона поражения				
-Слева	2,188 (0,519-9,259)	0,286		
-Справа	0,464 (0,111-1,942)	0,293	-	-
-С обеих сторон	1,066 (0,175-6,536)	0,944		
Сопутствующие заболевания				
-Гипертоническая болезнь	-	-		
-Ишемическая болезнь сердца	0,893 (3,597-0,223)	0,873		
-Инфаркт миокарда в анамнезе	1,086 (0,255-4,608)	0,911	-	-
-Сахарный диабет	1,629 (0,355-7,463)	0,53		
-Операция в анамнезе	-	-		

Продолжение Таблицы 12				
Стент	0,164 (0,018-1,46)	0,105	-	-
ЛПИ (V0)	0,381 (0,049-2,934)	0,354	-	-
α SMA (V0), нг/мл	0,894 (0,66-1,211)	0,47	-	-
vWF (V0), нг/мл	1,009 (0,998-1,019)	0,096	1,007 (0,997-1,017)	0,082
CD31 (V0), нг/мл	2,074 (1,115-3,856)	0,021	1,924 (1,056-3,504)	0,032
VIM (V0), нг/мл	0,913 (0,766-1,087)	0,306	-	-
TGF β 1 (V0), нг/мл	1 (0,997-1,002)	0,651	-	-

Статистически значимыми в отношении прогрессирования являются показатели CD31 (2,074 (1,115-3,856)) нг/мл $p=0,021$ при многофакторном анализе и (1,924 (1,056-3,504)) нг/мл $p=0,032$ при однофакторном анализе, данные изменения соответствуют экспериментальным данным других авторов [51].

Другие показатели логистической регрессии, представленные в Таблицах 13-16, 18-19 не достигли статистически значимого уровня.

Таблица 13 – Развитие рестеноза в течение 1 года после операции

Показатель	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОШ (95% ДИ)	p	ОШ (95% ДИ)	p
Возраст	1,044 (0,969-1,125)	0,258	-	-
Пол				
-мужской	0,36 (0,097-1,33)	0,125	-	-
-женский	2,778 (0,752-10,26)			
Стадия заболевания				
-2А	-	-		
-2Б	0,376 (0,064-2,224)	0,281	-	-
-3	0,533 (0,128-2,225)	0,388		
-4	2,889 (0,79-10,57)	0,109		
Уровень поражения				
-Бедренно-подколенный	1,481 (0,425-5,161)	0,537		
-Подколенно-берцовый	1,125 (0,198-6,385)	0,894	-	-
-Дистальный	1,154 (0,298-4,467)	0,836		
-Мульти	-	-		
-Синдром Лериша	-	-		
Сторона поражения				
-Слева	0,923 (0,245-3,477)	0,906	-	-
-Справа	1,833 (0,522-6,434)	0,344		
-С обеих сторон	0,376 (0,064-2,224)	0,281		
Сопутствующие заболевания				
-Гипертоническая болезнь	-	-		
-Ишемическая болезнь сердца	0,675 (0,194-2,352)	0,537	-	-
-Инфаркт миокарда в анамнезе	1,857 (0,233-3,148)	0,816		
	3,413 (0,844-13,7)	0,085		
-Сахарный диабет	-	-		
-Операция в анамнезе				

<i>Продолжение Таблицы 13</i>				
Стент	0,714 (0,182-1,862)	0,629	-	-
ЛПИИ (V0)	0,983 (0,202-4,776)	0,983	-	-
α SMA (V0), нг/мл	0,995 (0,824-1,202)	0,959	-	-
vWF (V0), нг/мл	1,005 (0,996-1,014)	0,251	-	-
CD31 (V0), нг/мл	1,411 (0,871-2,285)	0,162	-	-
VIM (V0), нг/мл	0,854 (0,681-1,071)	0,171	-	-
TGF β 1 (V0), нг/мл	0,999 (0,998-1,001)	0,522	-	-

Таблица 14 – Развитие рестеноза в течение 3 месяцев после операции

Показатель	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОШ (95% ДИ)	P	ОШ (95% ДИ)	p
Возраст	1,091 (0,994-1,198)	0,067	1,09 (0,989-1,202)	0,083
Пол				
-мужской	0,529 (0,141-1,99)	0,346	-	-
-женский	1,889 (0,503-7,092)			
Стадия заболевания				
-2А	-	-		
-2Б	0,256 (0,026-2,381)	0,231	-	-
-3	0,613 (0,134-2,817)	0,53		
-4	2,915 (0,725-11,765)	0,132		
Уровень поражения				
-Бедренно-подколенный	1,818 (0,489-6,757)	0,372		
-Подколенно-берцовый	2,092 (0,362-12,048)	0,41	-	-
-Дистальный	0,515 (0,114-2,336)	0,39		
-Мульти	-	-		
-Синдром Лериша	-	-		
Сторона поражения				
-Слева	1,25 (0,316-4,95)	0,75	-	-
-Справа	1 (0,273-3,663)	1		
-С обеих сторон	0,7 (0,117-4,184)	0,696		
Сопутствующие заболевания				
-Гипертоническая болезнь	-	-		
-Ишемическая болезнь сердца	1,818 (0,489-6,757)	0,372	-	-
-Инфаркт миокарда в анамнезе	2,717 (0,697-10,526)	0,15		
	2,688 (0,603-12,048)	0,195		
-Сахарный диабет	-	-		
-Операция в анамнезе				
Стент	0,9 (0,216-3,745)	0,885	-	-
ЛПИИ (V0)	0,204 (0,025-1,667)	0,138	-	-
α SMA (V0), нг/мл	1,056 (0,873-1,277)	0,576	-	-
vWF (V0), нг/мл	1,009 (0,999-1,02)	0,083	1,01 (0,999-1,022)	0,082
CD31 (V0), нг/мл	1,636 (0,972-2,755)	0,064	1,498 (0,885-2,537)	0,133
VIM (V0), нг/мл	0,908 (0,774-1,067)	0,241	-	-
TGF β 1 (V0), нг/мл	0,999 (0,997-1,001)	0,196	-	-

Таблица 15 – Развитие рестеноза в течение 1 месяца после операции

Показатель	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОШ (95% ДИ)	P	ОШ (95% ДИ)	p
Возраст	1,209 (0,998-1,465)	0,052	1,168 (0,974-1,401)	0,094
Пол				
-мужской	0,13 (0,013-1,3)	0,083	0,188 (0,017-2,13)	0,177
-женский	7,667 (0,769-76,452)		5,314 (0,47-60,106)	
Стадия заболевания				
-2А	-	-	-	-
-2Б	-	-	-	-
-3	1,927 (0,276-13,514)	0,509		
-4	1,263 (0,187-8,547)	0,81		
Уровень поражения				
-Бедренно-подколенный	5,319 (0,539-52,632)	0,152		
-Подколенно-берцовый	1,499 (0,138-16,393)	0,739	-	-
-Дистальный	-	-		
-Мульти	-	-		
-Синдром Лериша	-	-		
Сторона поражения				
-Слева	0,479 (0,048-4,785)	0,531	-	-
-Справа	1,587 (0,236-10,753)	0,635		
-С обеих сторон	1,208 (0,114-12,821)	0,875		
Сопутствующие заболевания				
-Гипертоническая болезнь	-	-		
-Ишемическая болезнь сердца	1,783 (0,264-12,048)	0,553	-	-
-Инфаркт миокарда в анамнезе	1,277 (0,187-8,696)	0,802		
-Сахарный диабет	2,364 (0,24-23,256)	0,463		
-Операция в анамнезе	8,475 (0,441-166,667)	0,156		
Стент	0,546 (0,054-5,464)	0,606	-	-
ЛПИ (V0)	2,126 (0,243-18,618)	0,496	-	-
α SMA (V0), нг/мл	1,187 (0,964-1,462)	0,107	-	-
vWF (V0), нг/мл	1,006 (0,998-1,015)	0,118	-	-
CD31 (V0), нг/мл	1,084 (0,579-2,029)	0,802	-	-
VIM (V0), нг/мл	0,657 (0,35-1,236)	0,193	-	-
TGF β 1 (V0), нг/мл	1 (0,997-1,003)	0,937	-	-

Таблица 16 – Прогрессирование стадии ОААНК в течение 1 года после операции

Показатель	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОШ (95% ДИ)	P	ОШ (95% ДИ)	p
Возраст	1,004 (0,935-1,079)	0,905	-	-
Пол				
-мужской	0,6 (0,167-2,16)	0,435	-	-
-женский	1,667 (0,463-6,006)			

Продолжение Таблицы 16				
Стадия заболевания				
-2А	-	-		
-2Б	0,48 (0,081-2,838)	0,418	-	-
-3	0,703 (0,168-2,939)	0,629		
-4	2 (0,552-7,251)	0,292		
Уровень поражения				
-Бедренно-подколенный	1,462 (0,415-5,154)	0,554		
-Подколенно-берцовый	0,633 (0,102-3,938)	0,624	-	-
-Дистальный	1,545 (0,396-6,035)	0,531		
-Мульти	-	-		
-Синдром Лериша	-	-		
Сторона поражения				
-Слева	1,983 (0,519-7,584)	0,317	-	-
-Справа	0,815 (0,232-2,86)	0,749		
-С обеих сторон	0,48 (0,081-2,838)	0,418		
Сопутствующие заболевания				
-Гипертоническая болезнь	-	-		
-Ишемическая болезнь сердца	1,558 (0,439-5,526)	0,492	-	-
-Инфаркт миокарда в анамнезе	1,543 (0,405-5,879)	0,525		
-Сахарный диабет	0,4 (0,1-1,608)	0,197		
-Операция в анамнезе	-	-		
Стент	0,173 (0,032-0,939)	0,042	-	-
ЛПИ (V0)	1,253 (0,255-6,143)	0,781	-	-
α SMA (V0), нг/мл	1,001 (0,827-1,211)	0,993	-	-
vWF (V0), нг/мл	1,003 (0,996-1,01)	0,381	-	-
CD31 (V0), нг/мл	1,338 (0,841-2,131)	0,219	-	-
VIM (V0), нг/мл	0,973 (0,928-1,02)	0,251	-	-
TGF β 1 (V0), нг/мл	1,001 (0,999-1,002)	0,505	-	-

Получены прогностические данные в отношении прогрессирования ХИНК в течение 1 месяца для оперативной группы пациентов, статистически значимыми в отношении прогрессирования являются показатели TGF β (1,003 (1,00006-1,007)) нг/мл $p=0,046$ при однофакторном анализе, полученные данные можно связать нахождением в крови пациентов после оперативного лечения ключевого маркера EndMT (Таблица 17).

Таблица 17 – Прогрессирование стадии ОААНК в течение 1 месяца после операции

Показатель	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОШ (95% ДИ)	P	ОШ (95% ДИ)	p
Возраст	1,062 (0,926-1,218)	0,389	-	-
Пол				
-мужской	0,637 (0,081-5,051)	0,669	-	-
-женский	1,571 (0,198-12,47)			

Продолжение Таблицы 17				
Стадия заболевания				
-2А	-	-		
-2Б	-	-	-	-
-3	0,867 (0,08-9,346)	0,906		
-4	2,68 (0,255-28,571)	0,411		
Уровень поражения				
-Бедренно-подколенный	-	-		
-Подколенно-берцовый	-	-	-	-
-Дистальный	-	-		
-Мульти	-	-		
-Синдром Лериша	-	-		
Сторона поражения				
-Слева	7,8125 (0,724-83,333)	0,09	5,025 (0,4-62,5)	0,211
-Справа	0,298 (0,028-3,145)	0,314	-	-
-С обеих сторон	-	-	-	-
Сопутствующие заболевания				
-Гипертоническая болезнь	-	-		
-Ишемическая болезнь сердца	1,117 (0,142-8,85)	0,916	-	-
-Инфаркт миокарда в анамнезе	0,59 (0,056-6,25)	0,661		
-Сахарный диабет	1,695 (0,16-17,857)	0,661		
-Операция в анамнезе	11,628 (0,574-250)	0,11		
Стент	-	-	-	-
ЛПНП (V0)	4,121 (0,421-40,363)	0,224	-	-
α SMA (V0), нг/мл	1,004 (0,737-1,368)	0,979	-	-
vWF (V0), нг/мл	0,995 (0,977-1,013)	0,576	-	-
CD31 (V0), нг/мл	1,133 (0,577-2,222)	0,717	-	-
VIM (V0), нг/мл	0,632 (0,306-1,306)	0,215	-	-
TGF β 1 (V0), нг/мл	1,003 (1,00006-1,007)	0,046	1,003 (0,999-1,006)	0,099

Таблица 18 – Неблагоприятные события в течение 1 года после операции

Показатель	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОШ (95% ДИ)	P	ОШ (95% ДИ)	p
Возраст	0,985 (0,909-1,067)	0,71	-	-
Пол				
-мужской	1 (0,232-4,31)	1	-	-
-женский	1 (0,232-4,31)			
Стадия заболевания				
-2А	-	-	-	-
-2Б	-	-	-	-
-3	0,222 (0,025-2,008)	0,18	-	-
-4	11,769 (1,319-105,008)	0,027	11,414 (1,21-107,619)	0,033
Уровень поражения				
-Бедренно-подколенный	0,191 (0,035-1,056)	0,058	0,199 (0,032-1,235)	0,083
-Подколенно-берцовый	1,625 (0,25-10,578)	0,611	-	-
-Дистальный	6 (1,274-28,254)	0,023	2,333 (0,4-13,609)	0,346
-Мульти	-	-	-	-
-Синдром Лериша	-	-	-	-

Продолжение Таблицы 18				
Сторона поражения				
-Слева	0,857 (0,182-4,042)	0,846	-	-
-Справа	1,714 (0,4-7,34)	0,468		
-С обеих сторон	0,444 (0,047-4,222)	0,48		
Сопутствующие заболевания				
-Гипертоническая болезнь	-	-	-	-
-Ишемическая болезнь сердца	1,143 (0,273-4,786)	0,855	-	-
-Инфаркт миокарда в анамнезе	0,74 (0,158-3,463)	0,702	-	-
-Сахарный диабет	6,882 (0,771-61,406)	0,084	1,363 (0,068-27,531)	0,84
-Операция в анамнезе	0,31 (0,018-5,479)	0,424	-	-
Стент	0,192 (0,021-1,724)	0,141	-	-
ЛПИ (V0)	1,208 (0,202-7,225)	0,836	-	-
α SMA (V0), нг/мл	1 (0,805-1,243)	0,998	-	-
vWF (V0), нг/мл	0,999 (0,991-1,007)	0,807	-	-
CD31 (V0), нг/мл	1,217 (0,751-1,971)	0,426	-	-
VIM (V0), нг/мл	0,999 (0,993-1,004)	0,678	-	-
TGF β 1 (V0), нг/мл	1 (0,998-1,002)	0,751	-	-

Таблица 19 – Повторная операция в течение 1 года после операции

Показатель	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОШ (95% ДИ)	P	ОШ (95% ДИ)	p
Возраст	0,946 (0,872-1,027)	0,183	-	-
Пол				
-мужской	1,786 (0,385-8,264)	0,459	-	-
-женский	0,56 (0,121-2,597)			
Стадия заболевания				
-2А	-	-		
-2Б	0,444 (0,047-4,222)	0,48	-	-
-3	1,179 (0,244-5,7)	0,838		
-4	1,312 (0,307-5,62)	0,714		
Уровень поражения				
-Бедренно-подколенный	0,667 (0,156-2,852)	0,585		
-Подколенно-берцовый	1,625 (0,25-10,578)	0,611	-	-
-Дистальный	1,833 (0,408-8,231)	0,429		
-Мульти	-	-		
-Синдром Лериша	-	-		
Сторона поражения				
-Слева	0,857 (0,182-4,042)	0,846	-	-
-Справа	1,714 (0,4-7,34)	0,468		
-С обеих сторон	0,444 (0,047-4,222)	0,48		
Сопутствующие заболевания				
-Гипертоническая болезнь	-	-		
-Ишемическая болезнь сердца	1,143 (0,273-4,786)	0,855	-	-
-Инфаркт миокарда в анамнезе	0,74 (0,158-3,463)	0,702		
-Сахарный диабет	1,351 (0,289-6,32)	0,702		
-Операция в анамнезе	0,31 (0,018-5,479)	0,424		
Стент	0,5 (0,089-2,807)	0,431	-	-
ЛПИ (V0)	6,056 (0,976-37,564)	0,053	-	-

<i>Продолжение Таблицы 19</i>				
α SMA (V0), нг/мл	1,003 (0,808-1,245)	0,979	-	-
vWF (V0), нг/мл	1 (0,992-1,007)	0,957	-	-
CD31 (V0), нг/мл	1,2 (0,741-1,944)	0,459	-	-
VIM (V0), нг/мл	0,998 (0,988-1,008)	0,702	-	-
TGF β 1 (V0), нг/мл	1 (0,998-1,002)	0,801	-	-

4.1.3 Возможности использования прогностических моделей на примере клинических случаев

Клинический пример 1

Пациент К. диагноз – ОААНК: бедренно-подколенная окклюзия слева, II-III стадия заболевания по классификации Покровского-Фонтейна. Выполнена реканализация, баллонная ангиопластика левой поверхностной бедренной артерии баллоном без лекарственного покрытия 6,0-150мм, просвет артерии восстановлен полностью. Значение ЛПИ после операции 0,7, значение VIM до операции 1,78 нг/мл, через 1 месяц значение ЛПИ 0,62. Через 1 месяц после операции показатель VIM 2,71 нг/мл. По данным ультразвукового дуплексного сканирования (УЗДС) выявлены признаки рестеноза зоны баллонной ангиопластики до 50%. Через 3 месяца по данным УЗДС короткая окклюзия правой поверхностной бедренной артерии в зоне баллонной ангиопластики, значение ЛПИ 0,4, что косвенно свидетельствует о развитии рестеноза. Выполнено повторное эндоваскулярное оперативное вмешательство на артериях бедренно-подколенного сегмента слева (Рисунки 31, 32).



Рисунок 31 – ПКА и дистальный сегмент ПБА после баллонной ангиопластики

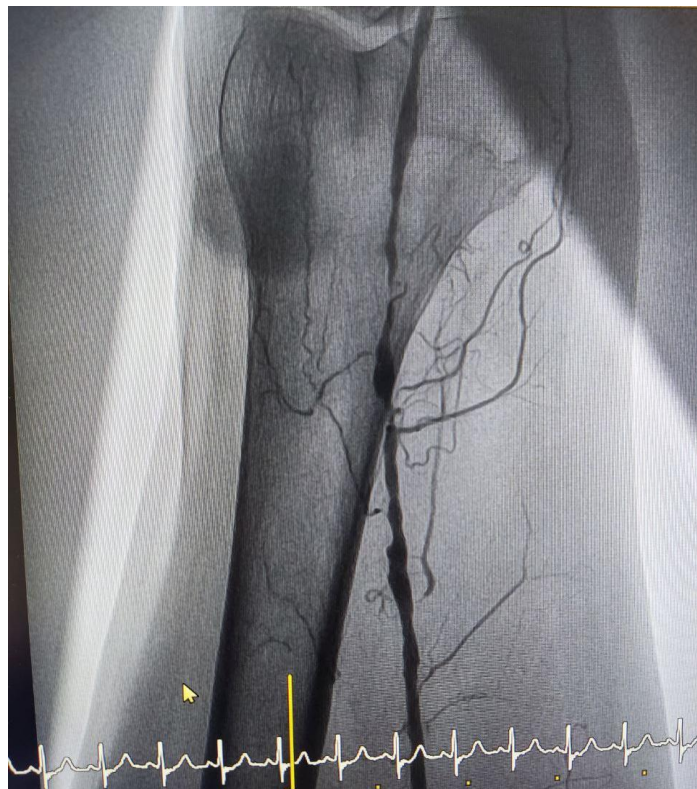


Рисунок 32 – Рестеноз зоны баллонной ангиопластики через 3 месяца

Клинический пример 2

Пациент Б. Диагноз: ОААНК, дистальный тип окклюзии справа, IV стадия заболевания по классификации Покровского-Фонтейна. Выполнена реканализация, баллонная ангиопластика передней большеберцовой артерии. Просвет артерии восстановлен полностью. Значение ЛПИ после операции 1,5, значение VIM до операции 0,6 нг/мл, через 1 месяц значение ЛПИ 0,3. Через 1 месяц после операции показатель VIM 2,3 нг/мл. Через 3 месяца по данным УЗДС выявлена протяженная окклюзия правой передней большеберцовой артерии в зоне баллонной ангиопластики, значение ЛПИ 0,1 что косвенно свидетельствует о развитии рестеноза. Выполнена попытка реваскуляризации передней большеберцовой артерии справа, без технического успеха, продолжено консервативное лечение согласно клиническим рекомендациям.

Таким образом, при значении VIM до эндоваскулярного оперативного вмешательства равном или ниже 4,38 нг/мл прогнозируется развитие рестеноза через 1 год в зоне оперативного вмешательства (Рисунки 33, 34).

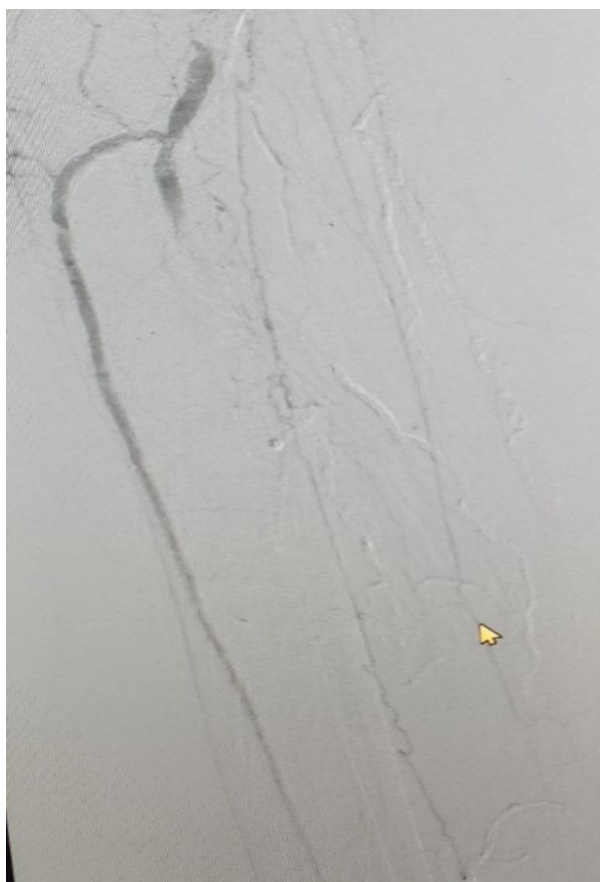


Рисунок 33 – ПББА после реваскуляризации

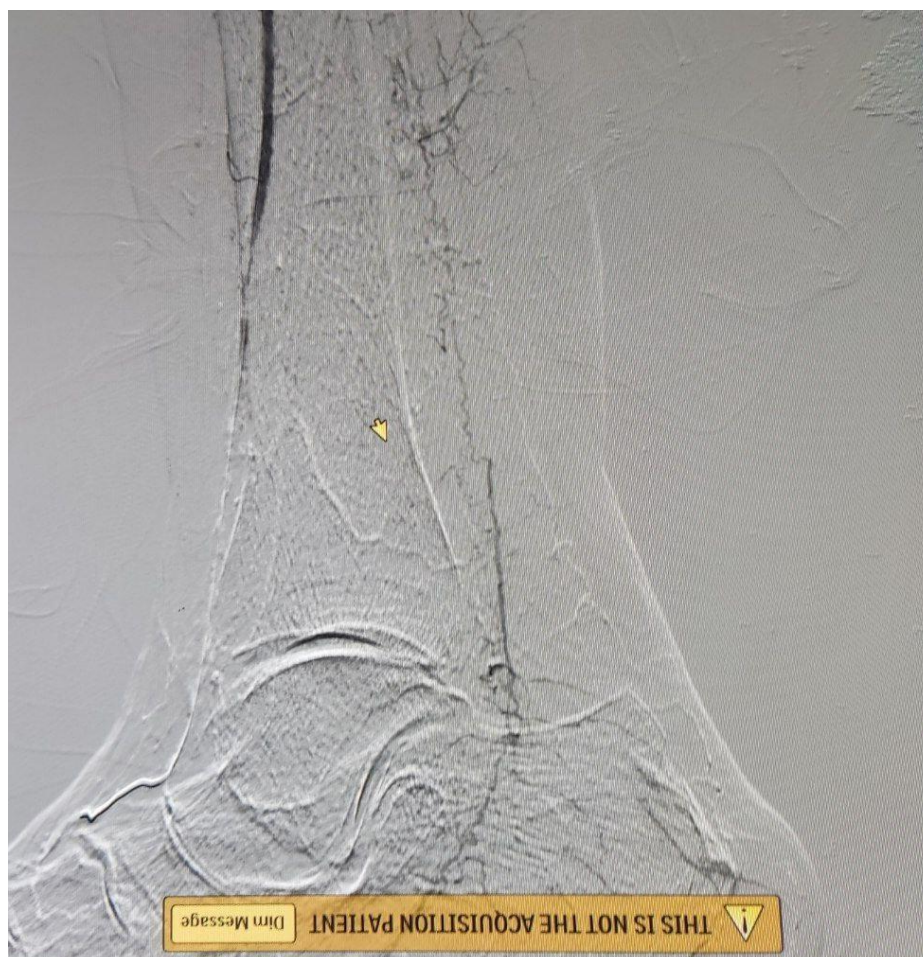


Рисунок 34 – Рестеноз ПББА через 1 месяц

Клинический пример 3

Пациент С. Диагноз: ОААНК, Синдром Лериша, IIБ стадия заболевания по классификации Покровского-Фонтейна. Выполнена, баллонная ангиопластика двойное бифуркационное эндопротезирование общих и наружных подвздошных артерий с обеих сторон. Просвет артерии восстановлен полностью. Значение ЛПИ справа после операции 0,54, значение CD1 до операции 7,45 нг/мл, через 3 месяца значение ЛПИ 0.45. Через 3 месяца по данным УЗДС выявлен стеноз в дистальном стенте НПА справа до 60%, что косвенно свидетельствует о развитии рестеноза. Продолжено консервативное лечение согласно клиническим рекомендациям.

Таким образом, при значении CD31 до эндоваскулярного оперативного вмешательства равном или выше 5,29 нг/мл прогнозируется развитие рестеноза через 3 месяца в зоне оперативного вмешательства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема оценки влияния эндотелиально-мезенхимального перехода на развитие рестеноза в зоне оперативного вмешательства у пациентов с заболеваниями периферических артерий атеросклеротической этиологии, а также оптимизация лечения, в настоящее время остается нерешенной. EndMT и связанное с данным явлением возможные возникновение и прогрессирование рестеноза обуславливает ухудшение симптомов ХИНК с переходом к критической ишемии конечности, угрожающую ампутацией. На сегодняшний день роль EndMT в развитии рестеноза до конца не изучена. Поэтому исследование маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода, а также их динамики до и после эндоваскулярного оперативного лечения, а также у пациентов, получающих консервативное лечение, остаётся актуальным.

Растущее количество пациентов с ОААНК, а вместе с этим растущее число эндоваскулярных операций, отсутствие общепризнанных маркеров прогнозирования рестеноза в зоне данных вмешательств, разработка и внедрение в клиническую практику новых баллонов, стентов, препаратов, обуславливают необходимость пристального изучения факторов, потенциально влияющих на отдалённую проходимость зоны оперативного вмешательства, в том числе в *in vitro* условиях. Перспективным представляется изучение эндотелиально-мезенхимального перехода с целью оптимизации диагностики и лечения пациентов с ОААНК, что призвано улучшить прогноз заболевания и жизни пациентов.

Большое количество *in vitro* исследований посвящено изучению маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода в условиях физиологии и патологии [140]. В данной работе мы провели оценку маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода, (эндотелиальных - CD31, vWF, мезенхимальных – VIM, α SMA, интегрального маркера EndMT – TGF β 1) в условиях *in vitro* в модели ангиопластики на первичных культурах HUVEC, а также выполнили клиническое исследование по оценке вышеуказанных маркеров непосредственно у больных

ОААНК.

Экспериментальная часть исследования

Диссертационное исследование включило в себя экспериментальную и клиническую части. Основное внимание в рамках экспериментальной части было уделено *in vitro* изучению маркеров EndMT в первичной культуре эндотелиоцитов HUVEC в условиях модели баллонной ангиопластики, а также воздействия препарата сулодексид в различных концентрациях (0,1 ЛЕ/мл, 0,25 ЛЕ/мл, 0,5 ЛЕ/мл, 1,0 ЛЕ/мл, 5,0 ЛЕ/мл). После выделения первичных культур HUVEC от здоровых доноров проводилось подтверждение принадлежности полученных клеток к эндотелиальным при помощи метода иммуноцитохимии с использованием маркеров CD31 и vWF. Далее изучались метаболическая активность культур эндотелиальных клеток при помощи МТТ-теста, миграционная активность первичной культуры HUVEC при помощи scratch-теста с последующей фотодокументацией полученных результатов и обработкой изображений в программе ImageJ, а также изучалась относительное количество белков-маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода (эндотелиальных – CD31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1) при инкубации культур клеток с сулодексидом в различных его концентрациях (0,1 ЛЕ/мл, 0,25 ЛЕ/мл, 0,5 ЛЕ/мл, 1,0 ЛЕ/мл, 5,0 ЛЕ/мл) непосредственно в культуре клеток при помощи метода вестерн-блот. В ходе эксперимента было показано, что метаболическая активность первичных культур клеток HUVEC в модели баллонной ангиопластики была в целом ниже по сравнению с интактными первичными культурами HUVEC ($p=0.025$). То есть моделирование баллонной ангиопластики негативно влияет на метаболическую активность культуры HUVEC по сравнению с группой контроля. При добавлении в кондиционную среду различных концентраций сулодексида (0,1 ЛЕ/мл, 0,25 ЛЕ/мл, 0,5 ЛЕ/мл, 1,0 ЛЕ/мл, 5,0 ЛЕ/мл) метаболическая активность интактных (нормальных) первичных культур клеток HUVEC статистически значимо не изменялась ($p=0,628$), таким образом, можно судить о том, что сулодексид не

обладает цитотоксическим воздействием на первичные культуры HUVEC в выбранных концентрациях. При добавлении препарата сулодексид в первичные культуры HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики были выявлены статистически значимые различия в метаболической активности HUVEC при инкубации в культуральной среде с добавлением сулодексида в концентрации 0,1МЕ/мл по сравнению с контролем (инкубация только в культуральной среде) $0,507 \pm 0,029$ ед.опт.пл. и $0,485 \pm 0,034$ ед.опт.пл., соответственно ($p=0,034$), а также при инкубации патологических культур HUVEC в культуральной среде с добавлением сулодексида в концентрации 0,1МЕ/мл и в концентрации 5МЕ/Мл $0,485 \pm 0,034$ ед.опт.пл. и $0,460 \pm 0,039$ ед.опт.пл., соответственно ($p=0,004$). Следовательно, добавление в культуральную среду сулодексида в концентрации 0,1 МЕ/мл статистически значимо повышает метаболическую активность первичных культур клеток HUVEC в модели баллонной ангиопластики ($p=0,034$). При повышении концентрации до 5МЕ/Мл эффект нивелируется.

Анализ миграционной активности культур клеток показал, что в сроки 12 часов скорость заращения повреждения первичных нативных культур HUVEC была статистически значимо выше, чем в первичных культурах клеток HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики (патологические) на 23,96% и составила $26,71 \pm 3,57$ мкм/ч и $21,55 \pm 7,64$ мкм/ч соответственно. Таким образом моделирование баллонной ангиопластики способствует снижению миграционной активности культур эндотелиоцитов в срок 12 часов $p < 0,001$. Инкубация первичных нативных культур HUVEC с добавлением сулодексида в концентрации 0,1ЛЕ/мл к культуральной среде характеризовалась увеличением миграционной активности культур клеток на 19,25% по сравнению с контролем, то есть инкубацией нативных культур HUVEC со стандартной эндотелиальной средой: скорость заращения повреждения в срок 12 часов составила $31,85 \pm 4,99$ мкм/ч и $26,71 \pm 3,57$ мкм/ч, соответственно ($p=0,002$). Помимо этого, статистически значимое увеличение скорости заживления повреждения на 33,18% было достигнуто в срок 12 часов при добавлении сулодексида в концентрации 5,0

ЛЕ/мл по сравнению с аналогичным контролем, 35,57 мкм/ч и 26,71 мкм/ч, соответственно ($p < 0,001$). Инкубация первичных патологических культур HUVEC (после моделирования баллонной ангиопластики) с добавлением сулодексида в концентрации 1,0 ЛЕ/мл к культуральной среде характеризовалась увеличением миграционной активности культур клеток на 242% по сравнению с контролем, то есть инкубацией патологических культур HUVEC со стандартной эндотелиальной средой: скорость заращения повреждения в срок 12 часов составила $73,69 \pm 7,85$ мкм/ч и $21,54 \pm 7,82$ мкм/ч, соответственно ($p < 0,001$). Помимо этого, статистически значимое увеличение скорости заживления повреждения на 179,53% было достигнуто в срок 12 часов при добавлении сулодексида в концентрации 5,0 ЛЕ/мл по сравнению с аналогичным контролем, $60,24 \pm 32,86$ мкм/ч и $21,54 \pm 7,82$ мкм/ч, соответственно ($p < 0,001$).

Таким образом, снижение миграционной активности первичных культур HUVEC при воздействии баллонной ангиопластики можно рассматривать как негативный процесс, связанный с механическим повреждением эндотелиоцитов. Инкубация первичных культур HUVEC с сулодексидом характеризуется увеличением миграционной активности культур эндотелиоцитов, как нативных, так и полученных в модели баллонной ангиопластики.

Выявленное в рамках *in vitro* исследования снижение миграционной и метаболической активности первичной культуры эндотелиоцитов при моделировании баллонной ангиопластики можно рассматривать как возможный неблагоприятный фактор в отношении потенциальной эндотелизации зоны баллонной ангиопластики при эндоваскулярных оперативных вмешательствах *in vivo*, одновременно, увеличивая риск развития рестеноза, что требует дальнейших исследований.

В ходе эксперимента по оценке относительного количества белков маркеров EndMT методом Вестерн-блота было зафиксировано понижение относительного количества vWF в первичной культуре клеток HUVEC после добавления в кондиционную среду препарата сулодексид в концентрациях 0,1 ЛЕ/мл на 47% ($p = 0,0001$), 0,25 ЛЕ/мл на 47,3% ($p = 0,0001$), 1,0 ЛЕ/мл на 45,6% ($p = 0,0002$),

5,0ЛЕ/мл на 52,7% ($p < 0,0001$) по сравнению с контролем. Это может свидетельствовать о влиянии сулодексида на фактор vWF, отвечающий за воспалительные реакции, прокоагуляционную активность, понижая его активность, что соответствует терапевтическими эффектами данного препарата указанным в инструкции по применению и данными полученными в клинической части исследования.

По результатам вестерн-блота не было зафиксировано изменения относительного количества VIM в первичной культуре клеток HUVEC после добавления в кондиционную среду сулодексида в различных концентрациях по сравнению с контролем. Данные результаты могут свидетельствовать о отсутствии влияния сулодексида на относительное количество данного белка в первичной культуре HUVEC, однако в эксперименте *in vivo* данный показатель снижался так как данный маркер экспрессируется в различных типах эпителиальных и мезенхимальных клеток. По результатам Вестерн-блота не было зафиксировано изменения относительного количества α SMA в первичной культуре клеток HUVEC после добавления в кондиционную среду препарата сулодексид в различных концентрациях по сравнению с контролем. Данные результаты могут свидетельствовать об отсутствии влияния сулодексида на относительное количество данного белка в первичной культуре HUVEC, что соответствует данным, полученным в клинической части исследования. Однако обнаружение данного белка в данном эксперименте может свидетельствовать о нахождении данной клеточной культуры в состоянии EndMT. По результатам вестерн-блота не было зафиксировано изменения относительного количества CD31 в первичной культуре клеток HUVEC после добавления в кондиционную среду препарата сулодексид в различных концентрациях по сравнению с контролем, однако, при добавлении сулодексида в концентрациях 0,5 ЛЕ/мл и 1 ЛЕ/мл видна тенденция к росту экспрессии данного маркера и статистических значениях близких 0,05, что может свидетельствовать о недостаточной выборке. При оценке экспрессии TGF β 1 было зафиксировано изменение относительного количества в первичной культуре клеток HUVEC после добавления в

кондиционную среду препарата сулодексид в концентрациях 1,0 ЛЕ/мл (на 14,3%) и при концентрации 5,0 ЛЕ/мл (на 22,7%) по сравнению с контролем. Это может говорить об ингибирующем влиянии сулодексида на EndMT и соотносится с данными, полученными в клинической части исследования. По результатам Вестерн-блота было зафиксировано понижение относительного количества vWF в первичной культуре клеток HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики и добавления в кондиционную среду препарата сулодексид в концентрациях 0,25 ЛЕ/мл на 48,6% ($p=0,0039$), 0,5 ЛЕ/мл на 49,0% ($p=0,0037$), 1,0 ЛЕ/мл на 50,0% ($p=0,0032$) 5,0 ЛЕ/мл на 51,6% ($p=0,0025$) по сравнению с контролем, что соотносится с данными, полученными в эксперименте с нативными культурами HUVEC. В культурах эндотелиальных клеток HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики было зафиксировано значимое повышение экспрессии CD31 при добавлении сулодексида в концентрации 0,25 ЛЕ/мл (на 28,3%), 0,5 ЛЕ/мл (на 34%) 1,0 ЛЕ/мл (на 37,6%), 5,0 ЛЕ/мл (на 42,6%); данное повышение экспрессии может свидетельствовать о том, что в нативных эндотелиоцитах и эндотелиоцитах после моделирования баллонной ангиопластики сулодексид способствует повышению относительного количества основного белка межклеточных контактов данных клеток – CD31. Экспрессия α SMA в эксперименте с первичной культурой HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики и добавлении различных концентраций сулодексида, статистически значимо не изменялась. По результатам Вестерн-блота с культурами HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики было зафиксировано значимое изменение относительного количества VIM в первичной культуре клеток HUVEC после добавления в кондиционную среду препарата сулодексид в концентрации 0,25 ЛЕ/мл (на 20,3%) ($p=0,0095$), 0,5 ЛЕ/мл (на 34%) ($p=0,0008$), 1,0 ЛЕ/мл (на 37,6%) ($p=0,0046$), 5,0 ЛЕ/мл (на 42,7%) ($p=0,0015$) по сравнению с контролем. Данные результаты могут свидетельствовать о влиянии сулодексида на относительное количество данного белка в первичной культуре HUVEC в модели баллонной ангиопластики, и возможном снижении активности EndMT под воздействием данного препарата, что соотносится с данными

клинической части исследования. Было зафиксировано изменение относительного количества TGF β 1 в первичной культуре клеток HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики и добавления в кондиционную среду препарата сулодексид в концентрациях 0,25 ЛЕ/мл (на 33,3%) ($p=0,0041$), 0,5 ЛЕ/мл (на 27,3%) ($p=0,016$), и при концентрации 5,0 ЛЕ/мл (на 36,6%) ($p=0,0023$), по сравнению с контролем. Это может говорить об ингибирующем влиянии сулодексида на EndMT и соотносится с данными, полученными в клинической части исследования и результатами эксперимента с нативными культурами HUVEC.

При межгрупповом анализе относительного количества маркеров EndMT в культурах нативных HUVEC и HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики зафиксировано статистически значимое повышение относительной концентрации vWF у клеток после моделирования баллонной ангиопластики на 42% ($p=0,0098$), что может быть связано с повышением белка маркера воспаления после механического повреждения эндотелиоцитов. Помимо этого, при межгрупповом анализе зафиксировано статистически значимое повышение относительного количества VIM после моделирования баллонной ангиопластики на 60,6% ($p=0,0019$), что может быть связано с процессом эндотелиально-мезенхимального перехода и повышением экспрессии мезенхимальных маркеров после механического повреждения эндотелиоцитов.

В клинической части исследования уровень vWF в консервативной группе пациентов, получающих сулодексид повышался, а в экспериментальной части исследования, при воздействии данным препаратом на клетки HUVEC его экспрессия статистически значимо снижалась, подобное расхождение может свидетельствовать о выбросе данного белка в кровеносное русло *in vivo* и дальнейшей его детекцией методом ИФА в плазме пациентов с ОААНК. Помимо этого, при межгрупповом анализе относительного количества маркеров EndMT в культурах нативных HUVEC и HUVEC после моделирования баллонной ангиопластики зафиксировано статистически значимое повышение относительного количества VIM после моделирования баллонной ангиопластики

на 35,3% ($p=0,007$), что может быть связано с процессом эндотелиально-мезенхимального перехода ввиду повышения экспрессии белка VIM, ассоциированного с EndMT.

Понимание особенностей влияния баллонной ангиопластики на функцию клеток сосудистой стенки может послужить стимулом для поиска оптимальных препаратов для покрытия баллонов и тактики послеоперационного лечения, что позволит снизить количество рестенозов в зоне реконструкции.

Клиническая часть исследования

Всего в клиническую часть исследования было включено 90 человек: 80 пациентов с ОААНК с хронической ишемией нижних конечностей II-IV стадии заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна; кроме того, дополнительно было включено 10 добровольцев для оценки уровня исследуемых маркеров в популяции условно здоровых людей без подтверждённых признаков атеросклероза.

Пациенты были разделены на группы в зависимости от лечения (эндоваскулярное и консервативное), средний возраст в оперативной группе составил $67,1 \pm 8,9$, в консервативной группе $68,8 \pm 7,2$, средний возраст в группе контроля составил $49,7 \pm 4,81$. Опытные группы были сопоставимы по возрасту, полу, уровню и стороне поражения, сопутствующим заболеваниям, исключая ИБС, и исходным значениям лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ).

Несмотря на то, что по отдельным признакам вышеуказанные группы не были полностью сопоставимы (по стадии заболевания, ИБС и предшествующим операциям в анамнезе) при последующем межгрупповом анализе было установлено, что вопреки различиям в стадии заболевания пациенты были сопоставимы по уровням исследуемых маркеров EndMT. Кроме того, ограничение сопоставимости групп по стадии заболевания было связано с более тяжёлым поражением артериального русла, потребовавшего более активной хирургической тактики.

Пациентам I группы при включении в исследование, через 1, 3 месяцев был произведен забор периферической венозной крови для оценки уровня маркеров EndMT методом ИФА (Набор для определения CD31 кат.номер SEA36Hu (КНР), набор для определения vWF кат.номер SEA833Hu (КНР), набор для определения VIM кат.номер SEB040Hu(КНР), набор для определения α SMA кат.номер SEA124Hu (КНР), набор для определения TGF β 1 кат.номер AES097Hu (КНР)) (эндотелиальных – CD 31, vWF; мезенхимальных – VIM, α SMA; интегрального маркера EndMT – TGF β 1) в сыворотке крови пациентов после проведенных эндоваскулярных вмешательств на артериях нижних конечностей. Помимо этого, всем пациентам I группы в аналогичные сроки проводиться вышеуказанные инструментальные исследования.

Больным II группы оценка маркеров EndMT и инструментальные исследования проводились при включении в проект и в срок 3 месяца.

В контрольной группе (здоровые добровольцы) производился забор венозной крови единожды при включении в исследование с дальнейшим ИФА для определения изучаемых маркеров.

Пациенты I и II группы получали оптимальную медикаментозную терапию согласно клиническим рекомендациям, II группа пациентов дополнительно получала препарат сулодексид по схеме.

К статистическому анализу через 1 год наблюдения были доступны данные 90 пациентов.

Несмотря на значительные клинические различия в стадиях заболевания IIa, IIб, III, IV по изучаемым показателям уже на IIб и III стадии заболевания изучаемые группы пациентов являются сопоставимыми по изучаемым маркерам (эндотелиальным – CD31, vWF; мезенхимальным – VIM, α SMA; интегральному маркеру EndMT – TGF β 1), что свидетельствует о том, что сложные биохимические процессы, связанные с миграцией, пролиферацией клеток и EndMT, находятся на сопоставимых уровнях у пациентов, кому проводится как оперативное, так и консервативное лечение.

Статистический анализ полученных данных показал, что

реваскуляризирующая операция (в объеме баллонной ангиопластики и/или Статистически значимое увеличение ЛПИ в оперативной группе относительно точки включения в исследование (V0) и первой контрольной точки (V1) 0,46 (0,31-0,73) и 0,825(0,69-1,15), соответственно (на 81,25%), свидетельствует об эффективности реваскуляризирующей операции (баллонной ангиопластики и/или стентирования) $p=0,001$. Отмечается статистически значимое снижение уровня ЛПИ (на 26,03%) в оперативной группе в контрольных точках V1 и V2, значения которого составили 0,83(0,69-1,15) и 0,66 (0,4-0,81), соответственно ($p=0,001$), что может быть связано с развитием рестеноза в зоне оперативного вмешательства. В оперативной группе наблюдается статистически значимое повышение уровня vWF с 79,57 (51,6-130,02) нг/мл в V0 до 104,35 (74,95-147,63) нг/мл (на 31,25%) в V1 и до 163,63 (88,85-202,04) нг/мл (на 57%) в V2 ($p=0,002$), что, вероятно, связано с тем, что ангиопластика вызывает активацию эндотелиоцитов в ответ на механическое воздействие; это проявляется повышением уровня маркера воспаления и гемостатической дисфункции vWF, что соответствует данным литературы [132, 133].

В консервативной группе в течение трёх месяцев зафиксировано статистически значимое снижение ЛПИ, с 0,49 (0,42-0,55) до, 0,455 (0,4-0,535) $p=0,005$. Данные изменения можно связать с процессом прогрессирования атеросклероза в течении трёх месяцев.

Помимо этого, в данной группе пациентов статистически значимо снижался уровень vWF с 51,6 (33,64-93,72) нг/мл, до 41,24 (32,32-46,2) нг/мл ($p=0,004$); подобное снижение маркера воспаления и гиперкоагуляции можно связать с положительным воздействием сулодексида, что соответствует опубликованным данным пациентов со схожей патологией [134].

Было зафиксировано значимое повышение уровня CD31 с 5,03 (4,37-6,12) нг/мл до 6,22 (5,72-6,6) нг/мл, данные изменения можно связать с положительным влиянием сулодексида на основной маркер клеточных контактов эндотелиоцитов ($p<0,001$).

Было зафиксировано значимое снижение уровня TGF β 1 с 397,81 (153,11-87)

нг/мл до 162,85 (146,85-178,5) нг/мл ($p=0,001$), что может свидетельствовать о существенном ингибирующем влиянии сулодексида на ключевой маркер EndMT. Были получены статистически значимые различия между показателями ЛПИ между оперативной и консервативной группой через 3 месяца после включения в исследование, в оперативной группе ЛПИ превышал данный показатель в консервативной на 44,06%, и составлял 0,66 (0,4-0,81) и 0,4 (0,46-0,54) соответственно, данное явление можно связать с эффективностью оперативного лечения в течении 3х месяцев ($p=0,027$).

Помимо этого, в оперативной группе зафиксировано более низкое значение такого показателя как α SMA (на 24,1%), данные изменения могут характеризовать особенности ответа клеточных элементов сосудистой стенки на механическое воздействие при баллонной ангиопластике. Важно отметить, что в норме α SMA в эндотелиоцитах не содержится, этим можно объяснить отсутствие влияние сулодексида на изменение уровня данного маркера. В оперативной группе спустя три месяца после включения наблюдается более высокий уровень vWF (на 196,64%) (163,63 (88,85-202,04)) нг/мл в сравнении с группой, получавшей только консервативное лечение с сулодексидом (41,24 (32,32-46,2)) нг/мл ($p<0,001$). Данное явление можно связать с двумя факторами. Первый - ангиопластика, которая вызывает активацию эндотелия в ответ на механическое воздействие, что в свою очередь проявляется избыточной экспрессией маркера воспаления и гемостатической дисфункции vWF, что не противоречит ранее опубликованным данным [110]. Второй – это противовоспалительное действие препарата сулодексид, описанное исследователями ранее [61].

Меньшие значения такого показателя как CD31 в оперативной группе, относительно консервативной (на 13,09%), вероятно, связано с проявлениями эндотелиальной дисфункции в виду заведомо более тяжёлой стадии заболевания и перенесённой операцией в оперативной группе в ответ на механическое воздействие ($p=0,012$).

Исходные значения показателей EndMT у пациентов оперативной и консервативной групп (за исключением vWF) были сопоставимы вне зависимости

от стадии заболевания, поэтому несопоставимость групп по степени ХИНК при проведении межгруппового анализа своей роли в этом отношении не сыграла за исключением межгруппового различия по маркеру CD31 во 2й контрольной точке – 3 месяца ($p=0,044$); вероятно, данное различие может быть связано с механическим повреждением интимы в результате эндоваскулярного оперативного вмешательства и явлениями EndMT.

Диссертационное исследование освещает и систематизирует современные аспекты проблемы облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей, включая возможные осложнения после эндоваскулярного лечения данной патологии. Особое внимание уделяется их распространенности, а также молекулярным и клеточным патофизиологическим механизмам. В работе представлены данные о значении эндотелиально-мезенхимального перехода и его маркеров в формировании рестеноза после эндоваскулярных вмешательств. Исследование подробно анализирует маркеры EndMT в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Клиническая часть исследования включает оценку уровня маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода у пациентов на различных стадиях периферического атеросклероза и при применении различных методов лечения. Установлены корреляции между уровнями маркеров EndMT до и после проведения эндоваскулярных оперативных вмешательств, а также у пациентов, проходящих консервативную терапию с применением сулодексида. Использование методов логистической регрессии и ROC-анализа позволило выделить ключевые закономерности и оценить влияние изучаемых показателей на развитие атеросклеротического процесса, вероятность осложнений и неблагоприятных исходов, таких как прогрессирование болезни, рестеноз, ампутация конечностей и летальные исходы. На основе полученных данных предложены алгоритмы прогнозирования указанных осложнений, направленные на улучшение результатов лечения и прогнозов для пациентов с ОААНК.

ВЫВОДЫ

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

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

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

4. Частота развития неблагоприятных исходов после эндоваскулярного лечения пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей в срок 12 месяцев составила: рестенозов – 21 случай (52,5%), прогрессирования стадии ХИНК – 17 случаев (42,5%), тромбозов – 2 случая (5%), повторных операций – 10 случаев (25%), летальных исходов - 4(10%), ампутаций - 10(25%), у пациентов оперативной группы IIб-IV стадии заболевания по классификации А.В. Покровского. У пациентов консервативной группы II-IV

стадии заболевания по классификации А.В. Покровского прогрессирование стадии ХИНК выявлено в 6 случаях (15%) тромбозов не выявлено, необходимость в повторных операциях на артериях нижних конечностей возникла в 2 случаях (5%), количество летальных исходов составило 4 случая (10%), ампутаций не было.

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

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В научно-исследовательских лабораториях рекомендуется использовать предложенный способ моделирования баллонной ангиопластики для получения клеточных культур эндотелиоцитов со сниженной миграционной и метаболической активностью.
2. Для оценки параметров EndMT при моделировании баллонной ангиопластики возможно использование методики вестерн-блот.
3. Пациентам с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей рекомендуется назначение сулодексида с целью снижения уровня мезенхимальных маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода.
4. Пациентам с ОААНК целесообразно оценивать относительное количество маркеров EndMT (CD31, vWF, VIM, TGF β 1) в сыворотке/плазме крови для прогнозирования развития неблагоприятных исходов.
5. Пациентам с ОААНК целесообразно оценивать уровень маркера EndMT -трансформирующего фактора роста β 1 в крови для прогнозирования летального исхода в течение года после эндоваскулярного оперативного вмешательства.
6. Пациентам с ОААНК целесообразно оценивать уровень маркера EndMT виментина в крови для прогнозирования прогрессирования рестеноза и стадии ХИНК в течение года после эндоваскулярного оперативного лечения на артериях нижних конечностей.
7. Пациентам с ОААНК целесообразно оценивать уровень маркера EndMT CD31 в крови до операции для прогнозирования прогрессирования рестеноза в течение трёх месяцев после эндоваскулярного оперативного лечения на артериях нижних конечностей.
8. Пациентам с ОААНК целесообразно оценивать уровень маркера EndMT фактора фон Виллебранда в крови до операции для прогнозирования летального исхода в течение года после эндоваскулярного оперативного лечения на артериях нижних конечностей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БЛП – баллон с лекарственным покрытием

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГМК – гладкомышечные клетки

ЗПА – заболевания периферических артерий

ОААНК – атеросклерозом артерий нижних конечностей

ИБС – ишемическая болезнь сердца

КИНК – критическая ишемия нижних конечностей

ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс

НИЗ – неинфекционные заболевания

ПББА – передняя большеберцовая артерия

ПХ – перемежающая хромота

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ХИНК - хроническая ишемия нижних конечностей

ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

ADAMTS13 – цинксодержащая металлопротеиназа (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 motif, member 13)

Akt – RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, Protein kinase B alpha

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

BMP – костный морфогенетический белок (bone morphogenetic protein)

CD31– кластер дифференцировки 31 (cluster of differentiation 31)

DPBS – фосфатно-солевой буферный раствор (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)

ECGM – эндотелиальная клеточная среда (Endothelial Cell Growth Medium)

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

FAP – белок активирующий фибробласты (fibroblast activation protein)

FSP-1 – белок-супрессор ферроптоза-1 (ferroptosis suppressor protein-1)

GSK-3 β – серин/треониновая киназа

HAEC – эндотелиальные клетки аорты человека (human aortic endothelial cells)

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

NOD2 – нуклеотид-связывающий домен олигомеризации содержащий 2 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2)

MMP-9 – матриксная металлопротеиназа 9 (matrix metalloproteinase 9)

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

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

ROCK1 – Rho-ассоциированная киназа 1

SRF – сывороточный фактор ответа

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

TNF α – фактор некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor alpha)

VIM – виментин (vimentin)

vWF – фактор фон Виллебранда (von Willebrand factor)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адо, А.Д. Патологическая физиология / А.Д. Адо. – 2000. – С. 272-276. – Текст : непосредственный.
2. Анализ показателей заболеваемости и смертности населения Тамбовской области от болезней системы кровообращения за 2012-2021 гг. / Э.М. Османов, А.В. Решетников, З.Г. Гусейнова [и др.]. – Текст : непосредственный // Социальные аспекты здоровья населения. – 2023. – Т. 69, № 6. – С.8. DOI: 10.21045/2071-5021-2023-69-6-8
3. Ангиопластика баллонными катетерами с лекарственным покрытием при заболеваниях артерий нижних конечностей / С.А. Папоян, А.А. Щеголев, Д.Г. Громов, К.С. Асатурян. – Текст : непосредственный // РМЖ. Медицинское обозрение. – 2022. – Т. 6, № 4. – С. 177-181. DOI: 10.32364/2587-6821-2022-6-4-177-181.
4. Артериальный рестеноз: прошлое, настоящее, будущее / К.А. Хохлов, К.Л. Козлов, Е.О. Лебеденко [и др.]. – Текст : непосредственный // Кардиология: новости, мнения, обучение. – 2023. – Т. 11, № 1. – С. 34-41. <https://doi.org/10.33029/2309-1908-2023-11-1-34-41>
5. Влияние напряжения сдвига на свойства колониеформирующих эндотелиальных клеток в сравнении с эндотелиальными клетками коронарных артерий / Е.А. Великанова, В.Г. Матвеева, М.Ю. Ханова, Л.В. Антонова. – Текст : непосредственный // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2022. – Т.11, № 4. – С. 90-97. <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2022-11-4-90-97>
6. Дистальное шунтирование при критической ишемии с использованием родственной донорской вены / В.В. Карпов, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.]. – Текст : непосредственный // Журнал им. Н.В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь. – 2024. – Т. 13, № 1. – С. 134–139. <https://doi.org/10.23934/222390222024131134139>
7. Исмаилов, Н.Б. Лечебная и диагностическая тактика при атеросклеротическом окклюзионно-стенотическом поражении артерий нижних

конечностей у геронтологических больных / Н.Б. Исмаилов, А.В. Веснин. – Текст : непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2008. – Т. 14, №4 (4). – С. 27-30.

8. Коваленко, И.Б. Эндоваскулярное лечение пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы: этапы развития, проблемы и пути их решения / И.Б. Коваленко. – Текст : непосредственный // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2011. – Т. 99, № 4. – С. 24-29.

9. Консервативная терапия у больных хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей / В.М. Кошкин, В.А. Сергеева, М.П. Кузнецов [и др.]. – Текст : непосредственный // Медицинский совет. – 2015. – №8. – С. 6-9.

10. Кузнецов, М.Р. Основные принципы диагностики и лечения облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей / М.Р. Кузнецов. – Текст : непосредственный // Лечебное дело. – 2008. – №1. – С. 3-8. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/osnovnye-printsiipy-diagnostiki-i-lecheniya-obliteriruyuschego-ateroskleroza-arteriy-nizhnih-konechnostey>.

11. Маркеры развития рестеноза зоны реконструкции после эндоваскулярных вмешательств на артериях нижних конечностей / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Э.А. Климентова, А.В. Щулькин. – Текст : непосредственный // Журнал им. Н.В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь. – 2021. – Т. 10, № 4. – С. 669–675. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2021-10-4-669-675>

12. Мжаванадзе, Н.Д. Гемостатическое звено эндотелиальной дисфункции при развитии осложнений у пациентов с периферическим атеросклерозом: диссертация доктора медицинских наук : специальность 3.1.15 / Н.Д. Мжаванадзе. – Рязань, 2021. – 217 с. – Текст : непосредственный.

13. Молекулярно-клеточные аспекты эндотелиально-мезенхимального перехода при сердечно-сосудистых заболеваниях / Е.А. Стрельникова, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.]. – Текст : непосредственный // Молекулярная биология. – 2023. – Т. 57, №4. – С. 563-572. doi: 10.31857/S0026898423030138

14. Национальные рекомендации по ведению пациентов с патологией

артерий нижних конечностей. – Текст : непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2013. – Т. 19, № 2 (Прил.). – С. 1-67.

15. Новости медицины и фармации. – Текст : электронный / Новостной сайт Remedium. – 2015. – Режим доступа: <http://remedium.ru/news/detail.php?ID=62225>.

16. Прогнозирование результатов реваскуляризирующих операций на артериях нижних конечностей на основе методов оценки регионарного кровотока / Ю.В. Белов, О.А. Виноградов, О.А. Виноградов [и др.]. – Текст : непосредственный // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2014. – Т. 7, № 5. – С. 62-67.

17. Распространенность поражения и факторы риска у больных с атеросклерозом артерий нижних конечностей, направленных для хирургического вмешательства: гендерные особенности / А.В. Панов, Э.В. Кулешова, М.А. Чернявский [и др.]. – Текст : непосредственный // Артериальная гипертензия. – 2021. – Т. 27, № 4. – С. 415-426. <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2021-27-4-415-426>

18. Рентгенэндоваскулярные вмешательства при ишемии нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом: современные возможности и перспективы / Г.М. Костанян, Т.П. Храмых, Т.И. Гайгиев [и др.]. – Текст : непосредственный // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2022. – № 10. – С. 99-104.

19. Рестеноз стента: клиника, гемодинамические проявления, механизмы развития и возможности коррекции / Д.В. Шумаков, Г.Г. Шехян, Д.И. Зыбин [и др.]. – Текст : непосредственный // Кардиологический вестник. – 2021. – Т. 16, № 1. – С. 20-27. <https://doi.org/10.17116/Cardiobulletin20211601120>

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

21. Случай спонтанного эндотелиально-мезенхимального перехода в

культуре первичных эндотелиальных клеток пупочной вены человека / Д.К. Шишкова, А.В. Синицкая, М.Ю. Синицкий [и др.]. – Текст : непосредственный // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2022. – №3. – С. 97-113.

22. Становление и развитие метода терапевтического ангиогенеза в российской сердечно-сосудистой хирургии / Н.Д. Мжаванадзе, Р.Е. Калинин, А.А. Исаев, Р.В. Деев. – Текст : непосредственный // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2015. – № 6. – С. 91-97. doi: 10.17116/kardio20158691-97

23. Суранова, Г.Ж. Анализ клинико-эпидемиологических показателей облитерирующего атеросклероза сосудов нижних конечностей у пациентов, проживающих в зоне урановых хвостохранилищ / Г.Ж. Суранова, Р.Р. Тухватшин. – Текст : непосредственный // Радиация и риск (Бюллетень НРЭР). – 2021. – №2. – С. 146-157.

24. Тропонины, молекулы адгезии и интерлейкины как диагностические маркеры сердечно-сосудистых заболеваний: экспрессия в периферических тканях / Е.А. Карпасова, А.С. Дятлова, Н.С. Линькова [и др.]. – Текст : непосредственный // Успехи современной биологии. – 2020. – Т. 140, № 1. – С. 30–42.

25. Артериальный рестеноз: прошлое, настоящее, будущее / К.А. Хохлов, К.Л. Козлов, Е.О. Лебеденко [и др.]. – Текст : непосредственный // Кардиология: новости, мнения, обучение. – 2023. – Т. 11, № 1. – С. 34–41. DOI: <https://doi.org/10.33029/2309-1908-2023-11-1-34-41>

26. Хроническая ишемия нижних конечностей с клиникой перемежающейся хромоты (ПХ). Клинические рекомендации / МЗ РФ. – 2024. – 78 с. – Текст : непосредственный.

27. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний и их факторов риска в регионах Российской Федерации. Третье исследование (ЭССЕ-РФ-3). Обоснование и дизайн исследования / О.М. Драпкина, С.А. Шальнова, А.Э. Имаева [и др.]. – Текст : непосредственный // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2022. – Т. 21, № 5. – С. 3246. <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2022-3246>.

28. 14-3-3 Proteins regulate Akt Thr308 phosphorylation in intestinal epithelial

cells / M. Gómez-Suárez, I.Z. Gutiérrez-Martínez, J.A. Hernández-Trejo [et al.]. – Text : visual // *Cell Death Differ.* – 2016. – Vol. 23. – P. 1060–1072. doi: 10.1038/cdd.2015.163.

29. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries. Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS) / V. Aboyans, J.B. Ricco, M.E.L. Bartelink [et al.]. – Text : visual // *European Heart Journal.* – 2018. – Vol. 39, № 9. – P. 763–816. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx095.

30. A human endothelial cell-restricted externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions / W.A. Muller, C.M. Ratti, S.L. McDonnell, Z.A. Cohn. – Text : visual // *Journal of Experimental Medicine.* – 1989. – Vol. 170. – P. 399–414. doi: 10.1084/jem.170.2.399.

31. A Neonatal Heterotopic Rat Heart Transplantation Model for the Study of Endothelial-to-Mesenchymal Transition / G. Gierlinger, L. Rech, S.M. Emani [et al.]. – Text : visual // *Journal of Visualized Experiments.* – 2023. – Vol. 197. – P. e65426. doi:10.3791/65426 .

32. A novel leukocyte differentiation antigen: Two monoclonal antibodies TM2 and TM3 define a 120-kd molecule present on neutrophils, monocytes, platelets, and activated lymphoblasts / H. Ohto, H. Maeda, Y. Shibata [et al.]. – Text : visual // *Blood.* – 1985. – Vol. 66. – P. 873–881.

33. A promising field: regulating imbalance of EndMT in cardiovascular diseases / K. Zhou, K.J. Tian, B.J. Yan [et al.]. – Text : visual // *Cell Cycle.* – 2021. – Vol. 20, № 15. – P. 1477–1486. doi: 10.1080/15384101.2021.1951939. Epub 2021 Jul 16.

34. Akt isoforms regulate intermediate filament protein levels in epithelial carcinoma cells / A.-M. Fortier, C. Van Themsche, E. Asselin, M. Cadrin. – Text : visual // *FEBS Letters.* – 2010. – Vol. 584. – P. 984–988. doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.045.

35. Alvandi, Z. Endothelial-Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease / Z. Alvandi, J. Bischoff. – Text : visual // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2021. – Vol. 41, № 9. – P. 2357-2369. doi: 10.1161/ATVBAHA.121.313788. Epub 2021 Jul 1.
36. Apoptosis in vascular pathology: present and future / R.E. Kalinin, I.A. Suchkov, E.A. Klimentova [et al.]. – Text : visual // I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald. – 2020. – Vol. 28, № 1. – P. 79-87. doi:10.23888/PAVLOVJ202028179-87.
37. Association of six-minute walk distance with subsequent lower extremity events in peripheral artery disease / P. Nayak, J.M. Guralnik, T.S. Polonsky [et al.]. – Text : visual // Vascular Medicine. – 2020. – Vol. 25, № 4. – P. 319-327. doi: 10.1177/1358863X20901599. Epub 2020 Apr 27.
38. Balloon angioplasty in chronic critical limb ischemia: factors affecting clinical and angiographic outcome / H. Balmer, F. Mahler, D.D. Do [et al.]. – Text : visual // Journal of Endovascular Therapy. – 2002. – Vol. 9, № 4. – P. 403-10. doi: 10.1177/ 1526 6028 0200900403.
39. Biochemistry and expression of myelomonocytic antigens / S.M. Goyert, E.M. Ferrero, S.V. Seremetis [et al.]. – Text : visual // The Journal of Immunology. – 1986. – Vol. 137. – P. 3909–3914.
40. Bischoff, J. Endothelial-to-Mesenchymal Transition / J. Bischoff. – Text : visual // Circulation Research. – 2019. – Vol. 124, № 8. – P. 1163-1165. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.314813.
41. Blann, A.D. Endothelial integrity, soluble adhesion molecules and platelet markers in type 1diabetes mellitus / A.D. Blann, G.Y. Lip. – Text : visual // Diabetic Medicine – 1998. – № 15. – P. 634–642.
42. Brain ischemia causes systemic Notch1 activity in endothelial cells to drive atherosclerosis / M. Liu, D. Wang, C. Qi [et al.]. – Text : visual // Immunity. – 2024. – Vol. 57, № 9. – P. 2157-2172.e7. doi: 10.1016/ j.immuni.2024.07.002. Epub 2024 Jul 29.
43. Buccione, R. Foot and mouth: Podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles / R. Buccione, J.D. Orth, M.A. McNiven. – Text : visual // Nature Reviews

Molecular Cell Biology. – 2004. – Vol. 5. – P. 647–657. doi: 10.1038/nrm1436.

44. Bułdak, Ł. Cardiovascular Diseases-A Focus on Atherosclerosis, Its Prophylaxis, Complications and Recent Advancements in Therapies / Ł. Bułdak. – Text : visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 9. – P. 4695. doi: 10.3390/ijms23094695

45. Byrne, R.A. Stent thrombosis and restenosis: what have we learned and where are we going? The Andreas Grüntzig Lecture ESC 2014 / R.A. Byrne, M. Joner, A. Kastrati. – Text : visual // European Heart Journal. – 2015. – Vol. 36, № 47. – P. 3320–31. doi: 10.1093/eurheartj/ehv511. Epub 2015 Sep 28

46. Callluri, R. Review series on the basics of the epithelial-mesenchymal transition / R. Callluri, R. Weinberg. – Text : visual // Journal of Clinical Investigation. – 2009. – Vol. 119, № 6. – P. 1420–1.

47. CCR2 deficiency does not provide sustained improvement of muscular dystrophy in mdx5cv mice / W. Zhao, X. Wang, R.M. Ransohoff, L. Zhou. – Text : visual // Federation of American Societies for Experimental Biology Journal. – 2017. – Vol. 31, № 1. – P. 35–46. doi: 10.1096/fj.201600619R

48. CD31 (PECAM-1) exists as a dimer and is heavily N-glycosylated / J.P. Newton, A.P. Hunter, D.L. Simmons [et al.]. – Text : visual // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1999. – Vol. 261. – P. 283–291. doi: 10.1006/bbrc.1999.1018.

49. Characterization of a novel myeloid antigen regulated during differentiation of monocytic cells / C. Cabanas, F. Sanchez-Madrid, T. Bellon [et al.]. – Text : visual // European Journal of Immunology. – 1989. – Vol. 19. – P. 1373–1378. doi: 10.1002/eji.1830190804.

50. Chen, P.Y. Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression / P.Y. Chen, L. Qin, N. Baeyens. – Text : visual // Journal of Clinical Investigation. – 2015. – Vol. 125, № 12. – P. 4514–28. doi: 10.1172/JCI82719.

51. Chen, Z. PECAM-1 is necessary for flow-induced vascular remodeling / Z. Chen, E. Tzima. – Text : visual // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2009. – Vol. 29, № 7. – P. 1067–73. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.186692. Epub 2009

Apr 23.

52. Chronic Disturbed Flow Induces Superficial Erosion-Prone Lesion via Endothelial-to-Mesenchymal Transition in a DNA Methyltransferase-Dependent Manner / Tang Caiying, Shi Guoxia, Jia Ruyi [et al.]. – Text : visual // Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. – 2024. – Nov 15. doi: 10.5551/jat.64990. Online ahead of print.

53. Crampton, S.P. Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) / S.P. Crampton, J. Davis, C.C. Hughes. – Text : visual // Journal of Visualized Experiments. – 2007. – Vol. 3. – P. 183.

54. De Ceunynck, K. Unwinding the von Willebrand factor strings puzzle / K. De Ceunynck, S.F. De Meyer, K. Vanhoorelbeke. – Text : visual // Blood. – 2013. – Vol. 121, № 2. – P. 270-7. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-442285>.

55. Derynck, R. TGF- β receptor signaling / R. Derynck, X.H. Feng. – Text : visual // Biochimica et Biophysica Acta. – 1997. – Vol. 1333. – P. F105–F150. doi: 10.1016/s0304-419x(97)00017-6.

56. Dual roles of Cripto as a ligand and coreceptor in the nodal signaling pathway / Y.T. Yan, J.J. Liu, Y. Luo [et al.]. – Text : visual // Molecular and Cellular Biology. – 2002. – Vol. 22. – P. 4439–4449. doi: 10.1128/MCB.22.13.4439-4449.2002.

57. Duffield, J.S. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis / J.S. Duffield. – Text : visual // Journal of Clinical Investigation. – 2014. – Vol. 124, № 6. – P. 2299–306. doi: 10.1172/JCI72267

58. Dynamics of Endothelial Cell Diversity and Plasticity in Health and Disease / A. Larionov, C.M. Hammer, K. Fiedler, L. Filgueira. – Text : visual // Cells. – 2024. – Vol. 13, № 15. – P.1276. doi: 10.3390/cells13151276.

59. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications / Sonia How Ming Wong, Chee Mun Fang, Lay-Hong Chuah [et al.]. – Text : visual // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 2018. – Vol. 121, № 11-22. – P. 1040-8428. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.11.010>.

60. EndoCAM: A novel endothelial cell-cell adhesion molecule / S.M. Albelda, P.D. Oliver, L.H. Romer, C.A. Buck. – Text : visual // Journal of Cell Biology. – 1990. – Vol. 110. – P. 1227–1237. doi: 10.1083/jcb.110.4.1227.

61. Endothelial Dysfunction and Microcirculation in C4 Patients with Varicose Veins after Endovenous Laser Ablation and Sulodexide Treatment / Yu.L. Shevchenko, Yu.M. Stoyko, T.Yu. Chernyago, M.N. Yashkin. – Text : visual // Journal of Venous Disorders. – 2022. – Vol. 16, № 3. – P. 213-219. <https://doi.org/10.17116/flebo202216031213>
62. Endothelial to mesenchymal transition is common in atherosclerotic lesions and is associated with plaque instability / S.M. Evrard, L. Lecce, K.C. Michelis, A. Nomura-Kitabayashi. – Text : visual // Nature Communications. – 2016. – Vol. 7. – P. 11853. doi: 10.1038/ncomms11853.
63. Endothelial-mesenchymal transition in atherosclerosis / C. Swilhol, M.C. Harmsen, P.S. Evans, G. Krenning. – Text : visual // Cardiovascular Research. – 2018. – Vol. 114, № 4. – P. 565–577.
64. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cardiovascular Pathophysiology / A. Singh, K.S. Bhatt, H.C. Nguyen [et al.]. – Text : visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25, № 11. – P. 6180. doi: 10.3390/ijms25116180.
65. Endothelial-to-mesenchymal transition: A novel therapeutic target for cardiovascular diseases / A.O. Jackson, J. Zhang, Z. Jiang, K. Yin. – Text : visual // Trends in Cardiovascular Medicine. – 2017. – Vol. 27, № 6. – P. 383-393. doi: 10.1016/j.tcm.2017.03.003. Epub 2017 Mar 16.
66. Endothelial-to-mesenchymal transition: Cytokine-mediated pathways that determine endothelial fibrosis under inflammatory conditions / L. Pérez, N. Muñoz-Durango, C.A. Riedel [et al.]. – Text : visual // Cytokine & Growth Factor Reviews. – 2017. – Vol. 33. – P. 41-54. doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.09.002. Epub 2016 Sep 23.
67. Enhanced neointimal fibroblast, myofibroblast content and altered extracellular matrix composition: Implications in the progression of human peripheral artery restenosis / P. Krishnan, K.R. Purushothaman, M. Purushothaman [et al.]. – Text : visual // Atherosclerosis. – 2016. – Vol. 251. – P. 226-233. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.046. Epub 2016 Jun 30.
68. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing the state of cells in development and disease / H. Acloque, M.S. Adams, K. Fishwick [et al.]. – Text :

visual // Journal of Clinical Investigation. – 2009. – Vol. 119, № 6. – P.1438–1449.

69. Farrar, E.J. Heterogeneous susceptibility of valve endothelial cells to mesenchymal transformation in response to TNFalpha / E.J. Farrar, J.T. Butcher. – Text : visual // Annals of Biomedical Engineering. – 2014. – Vol. 42, № 1. – P.149–61. doi:10.1007/s10439-013-0894-3.

70. Frid, M.G. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis / M.G. Frid, V.A. Kale, K.R. Stenmark. – Text : visual // Circulation Research. – 2002. – Vol. 90, № 11. – P.1189-96. doi: 10.1161/01.res.0000021432.70309.28.

71. Functional architecture of Weibel-Palade bodies / K.M. Valentijn, J.E. Sadler, J.A. Valentijn [et al.]. – Text : visual // Blood. – 2011. – Vol. 117, № 19. – P. 5033-43. [https:// doi.org/10.1182 /blood -2010-09-267492](https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-267492).

72. Gericke, A. Sulodexide reduces glucose induced senescence in human retinal endothelial cells / A. Gericke, K. Suminska-Jasińska, A. Bręborowicz. – Text : visual // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11. – P. 11532. [https:// doi. org/ 10.1038/s41598-021-90987-w](https://doi.org/10.1038/s41598-021-90987-w)

73. Glezer, M.G. Gender and Age Characteristics of Mortality From Diseases of the Circulatory System of the Moscow region. Data 2016 year / M.G. Glezer. – Text : visual // Kardiologiia. – 2019. – Vol. 59, № 1. – P. 49-56. doi: 10.18087/ cardio. 2019.1.10215.

74. Glucagon-Like peptide 1 protects against hyperglycemic-induced endothelial-to-mesenchymal transition and improves myocardial dysfunction by suppressing poly(ADP-Ribose) polymerase 1 activity / F. Yan, G.H. Zhang, M. Feng [et al.]. – Text : visual // Molecular Medicine. – 2015. – Vol. 21. – P. 15–25. doi:10.2119/molmed.2014.00259

75. Gonzalez, D.M. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition / D.M. Gonzalez, D. Medici. – Text : visual // Science Signaling. – 2014. – Vol. 7, № 344. – P. re8. doi: 10.1126/scisignal.2005189.

76. Grube, E. Drug-eluting stents: clinical experiences and perspectives / E. Grube, U. Gerckens, L. Buellesfeld. – Text : visual // Minerva Cardioangiol. – 2002. –

Vol. 50, № 5. – P. 469-73.

77. Gyoeva, F.K. Coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules depends on kinesin / F.K. Gyoeva, V.I. Gelfand. – Text : visual // Nature. – 1991. – Vol. 353. – P. 445–448. doi: 10.1038/353445a0.

78. Hahn, C. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis / C. Hahn, M.A. Schwartz. – Text : visual // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2009. – Vol. 10, № 1. – P. 53-62. doi: 10.1038/nrm2596.

79. Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial / Heart Protection Study Collaborative Group // Lancet. – 2002. – Vol. 360 (9326). – P. 7-22. doi: 10.1016/S0140-6736(02)09327-3)

80. High glucose induced endothelial to mesenchymal transition in human umbilical vein endothelial cell / C.H. Yu, Suriguga, M. Gong [et al.]. – Text : visual // Experimental and Molecular Pathology. – 2017. – Vol. 102, № 3. – P. 377–83. doi:10.1016 /j.yexmp.2017.03.007

81. High levels of coagulation factors and venous thrombosis risk: strongest association for factor VIII and von Willebrand factor / I.M. Rietveld, W.M. Lijfering, S. Le Cessie [et al.]. – Text : visual // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2019. – Vol. 17, № 1. – P. 99-109. <https://doi.org/10.1111/jth.14343>.

82. High von Willebrand factor levels increase the risk of stroke: the Rotterdam study / R.G. Wieberdink, M.C. van Schie, P.J. Koudstaal [et al.]. – Text : visual // Stroke. – 2010. – Vol. 41, № 10. – P. 2151-6. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.586289>.

83. Human myeloid differentiation antigens identified by monoclonal antibodies to the myelomonocytic leukemia cell line RC-2A / A.B. Lyons, S.J. Cooper, S.R. Cole, L.K. Ashman. – Text : visual // Pathology. – 1988. – Vol. 20. – P. 137–146. doi: 10.3109/00313028809066624.

84. Human vascular endothelial cells express a membrane protein complex immunochemically indistinguishable from the platelet VLA- 2 (glycoprotein Ia–IIa) complex / J.C. Giltay, H.J. Brinkman, P.W. Modderman [et al.]. – Text : visual // Blood.

– 1989. – Vol. 73. – P. 1235–1241.

85. Ilan, N. PECAM-1: old friend, new partners / N. Ilan, J.A. Madri. – Text : visual // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2003. – Vol. 15. – P. 515–524. doi: 10.1016/s0955-0674(03)00100-5

86. Improved survival with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in chronic limb-threatening ischemia / S.Z. Khan, M.S. O'Brien-Irr, M. Rivero [et al.]. – Text : visual // *Journal of Vascular Surgery*. – 2020. – Vol. 72, № 6. – P. 2130-2138. doi:10.1016/j.jvs.2020.02.041

87. Influence of inflation pressure and balloon size on the development of intimal hyperplasia after balloon angioplasty. A study in the atherosclerotic rabbit / I.J. Sarembock, P. J. LaVeau, S. L. Sigal [et al.]. – Text : visual // *Circulation*. – 1989. – Vol. 80, № 4. – P. 1029-1040.

88. Kalinin, R.E. Prospects for forecasting the course of obliterating atherosclerosis of lower limb arteries / R.E. Kalinin, I.A. Suchkov, A.A. Chobanyan. – Text : visual // *Science of the young (Eruditio Juvenium)*. – 2019. – Vol. 7, № 2. – P. 274-82. doi:10.23888/HMJ201972274-282

89. Katoh, K. Effects of Mechanical Stress on Endothelial Cells In Situ and In Vitro / K. Katoh. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 22. – P. 16518. doi: 10.3390/ijms242216518.

90. Kokudo, T. Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells / T. Kokudo, Y. Suzuki, Y. Yoshimatsu. – Text : visual // *Journal of Cell Science*. – 2008. – Vol. 121. – P. 3317–3324.

91. Kotsis, V. Pathophysiology of early vascular ageing-opportunities for treatment / V. Kotsis, C. Antza, S. Stabouli. – Text : visual // *The Open Hypertension Journal*. – 2013. – Vol. 5. – P. 58–62.

92. Krenning, G. Vascular smooth muscle cells for use in vascular tissue engineering obtained by endothelial-to-mesenchymaltransdifferentiation (EnMT) on collagen matrices / G. Krenning, J.A.J. Moonen, M.J.A. van Luyn. – Text : visual // *Biomaterials*. – 2008. – Vol. 29, № 27. – P. 3703-3711. doi:

10.1016/j.biomaterials.2008.05.034.

93. Lenting, P.J. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends / P.J. Lenting, O.D. Christophe, C.V. Denis. – Text : visual // *Blood*. – 2015. – Vol. 125, № 13. – P. 2019-28. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-528406>.

94. Lepreux, S. Human liver myofibroblasts during development and diseases with a focus on portal (myo) fibroblasts / S. Lepreux, A. Desmouliere. – Text : visual // *Frontiers in physiology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 173. doi: 10.3389/fphys.2015.00173

95. Liao, G. Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. Selective binding of kinesin to detyrosinated tubulin and vimentin / G. Liao, G.G. Gundersen. – Text : visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273. – P. 9797–9803. doi: 10.1074/jbc.273.16.9797.

96. Lin, F. The role of endothelial-mesenchymal transition in development and pathological process / F. Lin, N. Wang, T.C. Zhang. – Text : visual // *IUBMB Life*. – 2012. – Vol. 64, № 9. – P. 717-23. doi: 10.1002/iub.1059. Epub 2012 Jun 25.

97. Lower Extremity Peripheral Artery Disease: Contemporary Epidemiology, Management Gaps, and Future Directions: A Scientific Statement From the American Heart Association / M.H. Criqui, K. Matsushita, V. Aboyans, C.N. Hess; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention; Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Peripheral Vascular Disease; and Stroke Council. – Text : visual // *Circulation*. – 2021. – Vol. 144, № 9. – P. e171-e191. doi: 10.1161/CIR.0000000000001005. Epub 2021 Jul Erratum in: *Circulation*. 2021 Aug 31;144(9):e193.

98. Low-molecular-weight heparin for prevention of restenosis after femoropopliteal percutaneous transluminal angioplasty: A randomized controlled trial / R. Koppensteiner, S. Spring, B.R. Amann-Vcsti, T. Meier. – Text : visual // *Journal of Vascular Surgery*. – 2006. – Vol. 44. – P.1247-1253.

99. MacEwan, D.J. TNF ligands and receptors – a matter of life and death / D.J. MacEwan. – Text : visual // *British Journal of Pharmacology*. – 2002. – Vol. 135,

№ 4. – P. 855–75. doi: 10.1038 / sj.bjp.0704549.

100. Mahmoud, M.M. Shear stress induces endothelial-to-mesenchymal transition via the transcription factor Snail / M.M. Mahmoud, J. Serbanovic-Canic, S. Feng. – Text : visual // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 3375. doi: 10.1038/s41598-017-03532-z.

101. Mahmoud, M.M. TWIST1 integrates endothelial responses to flow in vascular dysfunction and atherosclerosis / M.M. Mahmoud, H.R. Kim, R. Xing. – Text : visual // Circulation Research. – 2016. – Vol. 119. – P. 450–462.

102. Margadant, C. Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing / C. Margadant, A. Sonnenberg. – Text : visual // EMBO Reports. – 2010. – Vol. 11. – P. 97–105. doi: 10.1038/embor.2009.276.

103. Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31 / H. Stockinger, S.J. Gadd, R. Eher [et al.]. – Text : visual // Journal of Immunology. – 1990. – Vol. 145. – P. 3889–3897.

104. Molecular cloning of CD31, a putative intercellular adhesion molecule closely related to carcinoembryonic antigen / D.L. Simmons, C. Walker, C. Power, R. Pigott. – Text : visual // Journal of Experimental Medicine. – 1990. – Vol. 171. – P. 2147–2152. doi: 10.1084/jem.171.6.2147.

105. Moonen, J.R. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to fibro-proliferative vascular disease and is modulated by fluid shear stress / J.R. Moonen, E.S. Lee, M. Schmidt. – Text : visual // Cardiovascular Research Journal. – 2015. – Vol. 108, № 3. – P. 377-86. doi: 10.1093/cvr/cvv175.

106. Mulvany, M.M. Structure and function of small arteries / M.M. Mulvany, C. Aalkjaer. – Text : visual // Physiological Reviews. – 1990. – Vol. 70. – P. 921–961.

107. Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix / P.J. Wipff, D.B. Rifkin, J.J. Meister, B. Hinz. – Text : visual // The Journal of cell biology. – 2007. – Vol. 179, № 6. – P. 1311–23. doi: 10.1083/jcb.200704042

108. Newman, P.J. PECAM-1. 3 / P.J. Newman, D.K. Newman. – Boston: Academic Press, 2013. – Text : visual.

109. Newman, P.J. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1. New

roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology / P.J. Newman, D.K. Newman. – Text : visual // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2003. – Vol. 23. – P. 953–964. doi: 10.1161/01.ATV.0000071347.69358.D9.

110. Nightingale, T. The secretion of von Willebrand factor from endothelial cells; an increasingly complicated story / T. Nightingale, D. Cutler. – Text : visual // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2013. – Vol. 11 (Suppl 1). – P. 192–201. <https://doi.org/10.1111/jth.12225>.

111. NOD2 promotes endothelial-to-mesenchymal transition of glomerular endothelial cells via MEK/ERK signaling pathway in diabetic nephropathy / J. Shang, Y. Zhang, Y. Jiang [et al.]. – Text : visual // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2017. – Vol. 484, № 2. – P. 435–41.

112. Notch1 and Notch3 coordinate for pericyte-induced stabilization of vasculature / J.B. Tefft, J.L. Bays, A. Lammers [et al.]. – Text : visual // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2022. – Vol. 322, № 2. – P. C185–C196. doi: 10.1152/ajpcell.00320.2021. Epub 2021 Dec 8.

113. NOTCH1 mitochondria localization during heart development promotes mitochondrial metabolism and the endothelial-to-mesenchymal transition in mice / J. Wang, R. Zhao, S. Xu [et al.]. – Text : visual // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15, № 1. – P. 9945. doi: 10.1038/s41467-024-54407-7.

114. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily / P.J. Newman, M.C. Berndt, J. Gorski [et al.]. – Text : visual // *Science*. – 1990. – Vol. 247. – P.1219–1222. doi: 10.1126/science.1690453.

115. Peripheral Artery Disease: Past, Present, and Future / U. Campia, M. Gerhard-Herman, G. Piazza, S.Z. Goldhaber. – Text : visual // *The American Journal of Medicine*. – 2019. – Vol. 132, № 10. – P.1133–1141. doi: 10.1016/j.amjmed.2019.04.043.

116. Piera-Velazquez, S. Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases / S. Piera-Velazquez, S.A. Jimenez. – Text : visual // *Physiological Reviews*. – 2019. – Vol. 99, № 2. – P. 1281–1324. doi: 10.1152/physrev.00021.2018

117. Polonsky, T.S. Lower Extremity Peripheral Artery Disease Without Chronic Limb-Threatening Ischemia: A Review / T.S. Polonsky, M.M. McDermott. – Text : visual // Journal of the American Medical Association. – 2021. – Vol. 325, № 21. – P. 2188-2198. doi: 10.1001/jama.2021.2126.

118. Privratsky, J.R. PECAM-1: conflicts of interest in inflammation / J.R. Privratsky, D.K. Newman, P.J. Newman. – Text : visual // Life Science. – 2010. – Vol. 87. – P. 69–82. doi: 10.1016/j.lfs.2010.06.001.

119. Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury / M.W. Majesky, V. Lindner, D.R. Twardzik [et al.]. – Text : visual // Journal of Clinical Investigation. – 1991. – Vol. 88, № 3. – P. 904-10 DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI115393>.

120. Prognostic Nutritional Index as a New Prediction Tool for All-Cause Mortality in Patients with Chronic Limb-Threatening Ischemia Undergoing Endovascular Therapy / O. Erdogan, T. Erdogan, C. Panc [et al.]. – Text : visual // The Medical Bulletin of Sisli Etfal Hospital. – 2024. – Vol. 58, № 3. – P. 346-353. doi: 10.14744/SEMB.2024.70094.

121. Prognostic value of plasma von Willebrand factor levels in major adverse cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis / M. Fan, X. Wang, X. Peng [et al.]. – Text: visual // BMC Cardiovascular Disorders. – 2020. – Vol. 20, № 1. – P.72.

122. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling / B. Hinz, S.H. Phan, V.J. Thannickal [et al.]. – Text : visual // The American Journal of Pathology. – 2012. – Vol. 180, № 4. – P. 1340–55. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.02.004

123. ROCK1 induces endothelial-to-mesenchymal transition in glomeruli to aggravate albuminuria in diabetic nephropathy / H. Peng, Y. Li, C. Wang [et al.]. – Text : visual // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – P. 20304.

124. Role of the Notch1 signaling pathway in ischemic heart disease (Review) / X. Peng, S. Wang, H. Chen, M. Chen. – Text : visual // International Journal of Molecular Medicine. – 2023. – Vol. 51, № 3. – P. 27. doi: 10.3892/ijmm.2023.5230. Epub 2023 Feb 17.

125. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease / R. Ross. – Text : visual // The New England Journal of Medicine. – 1999. – Vol. 340, № 2. – P. 115-26. doi: 10.1056 /NEJM199901143400207.
126. Salidroside inhibits endothelial-mesenchymal transition via the KLF4/eNOS signaling pathway / Y. Huang, X. Han, J. Tang [et al.]. – Text : visual // Molecular Medicine Reports. – 2021. – Vol. 24, № 4. – P. 692. doi: 10.3892/mmr.2021.12324. Epub 2021 Aug 9.
127. Seki, E. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis / E. Seki, D.A. Brenner. – Text : visual // Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences. – 2015. – Vol. 22, № 7. – P. 512–8. doi: 10.1002/jhbp.245
128. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor / Y.-F. Zhou, E.T. Eng, J. Zhu [et al.]. – Text : visual // Blood. – 2012. – Vol. 120, № 2. – P. 449-58. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-405134>.
129. Serum response factor induces endothelial-mesenchymal transition in glomerular endothelial cells to aggravate proteinuria in diabetic nephropathy / L. Zhao, J. Zhao, X. Wang [et al.]. – Text : visual // Physiol Genomics. – 2016. – Vol. 48, № 10. – P. 711–8. doi:10.1152/physiolgenomics.00082.2016
130. Shi, Y. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries / Y. Shi, J.E. O'Brien, A. Fard. – Text : visual // Circulation. – 1996. – Vol. 94, № 7. – P. 1655-64. doi: 10.1161/01.cir.94.7.1655.
131. Strojil, J. Sulodexid / J. Strojil. – Text : visual // Remedia. – 2006. – Vol. 16. – P. 376–381.
132. Sulodexide improves pain-free walking distance in patients with lower extremity peripheral arterial disease: A systematic review and meta-analysis / A.V. Gaddi, Fabio Capello, Oana Florentina Gheorghe-Fronea [et al.]. – Text : visual // JRSM Cardiovascular Disease. – 2020. – Vol. 9. – P. 204800402090700.
133. Sulodexide up-regulates glutathione S-transferase P1 by enhancing Nrf2 expression and translocation in human umbilical vein endothelial cells injured by oxygen glucose deprivation / B. Gabryel, K. Bontor, K. Jarzabek [et al.]. – Text : visual // Archives of Medical Science. – 2019. – Vol. 16, № 4. – P. 957-963. doi:

10.5114/aoms.2019.82818.

134. Tenascin-X Mediates Flow-Induced Suppression of EndMT and Atherosclerosis / G. Liang, S. Wang, J. Shao [et al.]. – Text : visual // Circulation Research. – 2022. – Vol. 130, № 11. – P. 1647-1659. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.320694. Epub 2022 Apr 21.

135. TFPI2 suppresses the interaction of TGF- β 2 pathway regulators to promote endothelial-mesenchymal transition in diabetic nephropathy / G. Guan, J. Xie, Y. Dai, H. Han. – Text : visual // Journal of Biological Chemistry. – 2022. – Vol. 298, № 3. – P. 101725. doi: 10.1016/j.jbc.2022.101725. Epub 2022 Feb 11.

136. The role of bone morphogenetic protein-5 (BMP-5) in human nephrosclerosis / C.P. Bramlage, G.A. Müller, B. Tampe [et al.]. – Text : visual // Journal of Nephrology. – 2011. – Vol. 24. – P. 647–655. doi: 10.5301/JN.2011.6330.

137. The significance of some growth factors in the pathogenesis of endocrine ophthalmopathy / V.V. Charinzev, D.M. Serkin, O.V. Serebryakova, S.V. Charinzeva. – Text : visual // Clinical and experimental thyroidology. – 2017. – Vol. 13, № 1. – P.12-19. <https://doi.org/10.14341/ket2017112-19>

138. Thy-1-integrin α 5 β 1 interactions inhibit lung fibroblast contraction-induced latent transforming growth factor- β 1 activation and myofibroblast differentiation / Y. Zhou, J.S. Hagood, B. Lu [et al.]. – Text : visual // Journal of Biological Chemistry. – 2010. – Vol. 285, № 29. – P. 22382–93. doi: 10.1074/jbc.M110.126227

139. Toma, I. Transforming growth factor- β and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects / I. Toma, T.A. McCaffrey. – Text : visual // Cell and Tissue Research. – 2012. – Vol. 347, № 1. – P. 155-75. doi: 10.1007/s00441-011-1189-3. Epub 2011 May 31.

140. Tzivion, G. Calyculin A-induced Vimentin Phosphorylation Sequesters 14-3-3 and Displaces Other 14-3-3 Partners in Vivo / G. Tzivion, Z.-J. Luo, J. Avruch. – Text : visual // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Vol. 275. – P. 29772–29778. doi: 10.1074/jbc.M001207200.

141. Use of sulodexide in patients with peripheral vascular disease / J. Laserra-

Cirujeda, P. Coronel, M. Aza, M. Gimeno. – Text : visual // Journal of Blood Medicine. – 2010. – Vol. 1. – P. 105–115.

142. Vimentin Diversity in Health and Disease / F. Danielsson, M.K. Peterson, H. Caldeira Araújo [et al.]. – Text : visual // Cells. – 2018. – Vol. 7, № 10. – P. 147. doi: 10.3390/cells7100147. PMID: 30248895.

143. Vimentin knockout results in increased expression of sub-endothelial basement membrane components and carotid stiffness in mice / B. Langlois, E. Belozertseva, A. Parlakian [et al.]. – Text : visual // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 11628. doi: 10.1038/s41598-017-12024-z.

144. Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve / E. Perlson, S. Hanz, K. Ben-Yaakov [et al.]. – Text : visual // Neuron. – 2005. – Vol. 45. – P. 715–726. doi: 10.1016/j.neuron.2005.01.023.

145. Wall shear stress in the human common carotid artery as function of age and gender / S.K. Samijo, J.M. Willigers, R. Barkhuysen [et al.]. – Text : visual // Cardiovascular Research. – 1998. – Vol. 39. – P. 515–522. doi: 10.1016/S0008-6363(98)00074-1.

146. Wells, R.G. Origin and function of myofibroblasts in the liver / R.G. Wells, R.F. Schwabe. – Text : visual // Seminars in liver disease. – 2015. – Vol. 35, № 2. – P. 97–106. doi: 10.1055/s-0035-1550061

147. Wnt Site Signaling Inhibitor Secreted Frizzled-Related Protein 3 Protects Mitral Valve Endothelium From Myocardial Infarction-Induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition / Z. Alvandi, Y. Nagata, L.S.A. Passos [et al.]. – Text : visual // Journal of the American Heart Association. – 2022. – Vol. 11, № 7. – P. e023695. doi: 10.1161/JAHA.121.023695. Epub 2022 Mar 29.

148. Woodfin, A. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology / A. Woodfin, M.B. Voisin, S. Nourshargh. – Text : visual // Arteriosclerosis Thrombi Vascular Biology. – 2007. – Vol. 27. – P. 2514–2523. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.151456.

149. α -Smooth muscle actin is an inconsistent marker of fibroblasts responsible for force-dependent TGFbeta activation or collagen production across multiple models of

organ fibrosis / K.H. Sun, Y. Chang, N.I. Reed, D. Sheppard. – Text : visual // American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology. – 2016. – Vol. 310, № 9. – P. L824–36. doi: 10.1152 /ajplung. 00350.2015