

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

*На правах рукописи*

МЖАВАНАДЗЕ Нина Джансуговна

**ГЕМОСТАТИЧЕСКОЕ ЗВЕНО ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ  
ПРИ РАЗВИТИИ ОСЛОЖНЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРИФЕРИЧЕСКИМ  
АТЕРОСКЛЕРОЗОМ**

3.1.15. Сердечно-сосудистая хирургия

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Научный консультант  
доктор медицинских наук,  
профессор Калинин Роман Евгеньевич

Рязань - 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1.     Нерешенные проблемы лечения пациентов с ЗПА атеросклеротической этиологии. Структура осложнений периферического атеросклероза.....	16
1.2.     Молекулярно-клеточные аспекты тромбоза после артериальных реконструктивных вмешательств.....	19
1.3.     Молекулярно-клеточные аспекты развития рестеноза после реконструктивных вмешательств.....	23
1.4.     Эндотелий в норме и патологии. Роль эндотелия в системе гемостаза.....	28
1.5.     Ключевые гемостатические маркеры дисфункции эндотелия.....	36
1.6.     Изучение гемостатического звена эндотелиальной дисфункции <i>in vitro</i> .....	49
1.6.1.   Характеристика основных клеточных линий эндотелиальных клеток для <i>in vitro</i> исследований.....	49
1.6.2. <i>In vitro</i> изучение гемостатического звена дисфункции эндотелия.....	51
1.6.3. <i>In vitro</i> изучение процессов рестеноза.....	53
1.6.4.   Микрожидкостные и пульсатильные устройства для <i>in vitro</i> изучения тромбозов.....	55
1.7.     Резюме.....	57
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	59
2.1.     Материалы и методы экспериментальной части исследования.....	59
2.1.1.   Выделение первичных культур HUVEC.....	59
2.1.2.   Изучение метаболической (митохондриальной) активности первичной культуры HUVEC при воздействии материалов для артериальных реконструктивных вмешательств.....	63

2.1.3 Изучение миграционной активности первичной культуры HUVEC при воздействии материалов для артериальных реконструктивных вмешательств.....	67
2.1.4. Изучение уровня и активности гемостатических маркеров дисфункции эндотелия <i>in vitro</i> .....	69
2.1.5. Оценка экспрессии маркеров гемостатического звена дисфункции эндотелия в культуре HUVEC методом вестерн-блот .....	71
2.2. Материалы и методы клинической части исследования.....	73
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	80
3.1. Метаболическая (митохондриальная) активность первичной культуры HUVEC при воздействии материалов для артериальных реконструктивных вмешательств .....	80
3.2. Миграционная активность HUVEC при воздействии материалов для артериальных реконструктивных вмешательств .....	83
3.3. Активность и уровни гемостатических маркеров дисфункции эндотелия в кондиционной среде при воздействии ПТФЭ, ПЭТ и нитинола.....	85
3.4. Экспрессия vWF и PAI-1 в культуре HUVEC при воздействии материалов для артериальных реконструктивных вмешательств методом вестерн-блот.....	89
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	92
4.1. Характеристики пациентов, включенных в исследование.....	92
4.2. Роль показателей гемостатического звена дисфункции эндотелия в развитии осложнений при различных стадиях заболевания.....	105
4.3. Изучение роли показателей гемостатического звена дисфункции эндотелия в развитии осложнений в зависимости от выбранного	

метода лечения.....	115
4.3.1. Группа консервативного лечения.....	115
4.3.2. Группа эндоваскулярного лечения. ....	121
4.3.3. Группа открытых оперативных (шунтирующих) вмешательств.....	138
4.3.4. Межгрупповые различия в зависимости от вида проведенного лечения.....	152
4.4. Прогностические модели неблагоприятных исходов ЗПА атеросклеротической этиологии.....	157
4.4.1. Модель прогнозирования рестеноза после эндоваскулярных вмешательств. Клинические примеры. ....	157
4.4.2. Модель прогнозирования летальных исходов в группе эндоваскулярного лечения. Клинические примеры. ....	164
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	168
ВЫВОДЫ .....	179
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	183
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	185
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	188

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности**

Заболевания периферических артерий (ЗПА) атеросклеротической этиологии, или облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей, занимают третье по распространенности место в структуре атеросклеротического поражения артерий после ишемической болезни сердца (ИБС) и ишемии головного мозга. Консервативное лечение, рентгенэндоваскулярные и открытые оперативные вмешательства предлагают широкий выбор в улучшении качества жизни и прогноза заболевания у больных с периферическим атеросклерозом. Несмотря на это, со временем у пациентов регистрируются прогрессирование атеросклероза, развитие тромбозов и рестенозов после проведенного лечения, что в итоге приводит к неудовлетворительным исходам, повышению инвалидности и летальности [13].

Проходимость аутовенозных шунтов через 1 год после проведения операций составляет от 40 до 70% [228], стентов – от 54% при использовании непокрытых металлических стентов до 85% при имплантации эндопротезов с различными видами лекарственных покрытий [221], при этом частота возникновения постинтервенционных тромбозов может составлять до 12,5% в течение года после выполнения эндоваскулярного вмешательства [192]. Несмотря на бурное развитие эндоваскулярной хирургии актуальным остается вопрос не только проходимости стентов, но и их безопасности [24]. Существуют данные о том, что смертность пациентов может увеличиваться после имплантации покрытых паклитакселем баллонов и стентов в бедренную артерию. При анализе 28 рандомизированных клинических исследований (РКИ) с участием 4663 пациентов, среди которых клиника перемежающейся хромоты (ПХ) отмечалась у 89%, была отмечена сравнимая смертность от всех причин через 1 год в группах стентов с покрытием и контроля, в то время как через 2 года смертность в группе паклитаксела согласно результатам 12 РКИ существенно превысила аналогичный показатель в группе контроля (7,2% против 3,8%; отношение рисков, 1,68;

доверительный интервал (ДИ) 95%, 1,15-2,47). Повышение смертности зарегистрировано также в срок 5 лет от имплантации стентов [229].

В послеоперационном периоде, будь то открытое или эндоваскулярное вмешательство, пациентам показана активная антитромботическая терапия, которая включает сильнодействующие антитромбоцитарные препараты, а в ряде случаев требует назначения и антикоагулянтов, что повышает риски развития геморрагических осложнений [11]. Выбор оптимального антитромботического препарата определяется широким спектром факторов, включая особенности проведенного вмешательства, риски тромбозов, рестенозов, а также кровотечений; кроме того, в настоящее время ведется разработка новых препаратов антитромбоцитарного и антикоагулянтного действия в рамках экспериментальных и клинических исследований [114, 93].

Важную роль в развитии различных осложнений периферического атеросклероза, включая тромботические, играют нарушения системы гемостаза, в том числе гемостатического звена дисфункции эндотелия [19, 32, 40]. Большинство авторов признают дисфункцию эндотелия основным предиктором сердечно-сосудистых событий, а эндотелий характеризуется как обособленный вид «ткани», участвующей в развитии широкого спектра патологических состояний и неблагоприятных исходов [22, 29, 30].

Эндотелиальная дисфункция – это сложный многогранный процесс, основным проявлением которого является нарушение синтеза большого количества биологически активных веществ, участвующих в процессах вазоконстрикции и вазодилатации, воспаления, коагуляции, ангиогенеза [1, 14, 26]. Многочисленные исследования, проведенные в последние десятилетия, были посвящены изучению дисфункции эндотелия с позиций выработки оксида азота (II) (nitric oxide, NO) и оценке сигнальных путей NO, про- и противовоспалительных медиаторов, взаимодействия с тромбоцитами, в то время как роль коагуляционных маркеров дисфункции эндотелия, а также их взаимосвязь с факторами свертывания остается до конца не изученной у больных с атеросклерозом.

Факторы, секретируемые эндотелием и участвующие в гемостазе и тромбозе, можно разделить на две группы — протромбогенные (коагуляционные, гемостатические), включая фактор коагуляции VIII (FVIII), фактор фон Виллебранда (von Willebrand factor, vWF), ингибитор активации плазминогена 1 типа (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1), растворимые эндотелиальные рецепторы протеина С (soluble endothelial protein C receptor, sEPCR), и атромбогенные. Важную роль в патогенезе атеросклероза и его осложнений играют особенности функционирования фибринолитической системы [21, 34].

Во время инвазивного (оперативного) вмешательства происходит неизбежное травмирование эндотелия, приводящее к его дисфункции. Интерес представляют работы, посвященные изучению влияния различных vasoактивных агентов, нацеленных на эндотелиоциты, что в результате может приводить к изменениям, активации или повреждению эндотелиоцитов. Изменения в структуре или функции эндотелиоцитов могут играть важнейшую роль в повреждении сосудов, и, таким образом, оценка кинетического профиля, особенностей секреции и активности различных биологических веществ, специфичных для эндотелия может помочь в оценке биомаркеров как острого, так и хронического сосудистого повреждения. К основным маркерам дисфункции эндотелия, непосредственным образом участвующим в гемостазе, и которым посвящена данная работа, относят фактор коагуляции 8 (FVIII), фактор фон Виллебранда (von Willebrand factor, vWF), ингибитор активации плазминогена-1 (plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1), растворимые эндотелиальные рецепторы протеина С (soluble endothelial protein C receptors, sEPCR) и оксид азота II (NO).

Изменение активности и уровня показателей гемостатического звена дисфункции эндотелия при естественном течении периферического атеросклероза либо в послеоперационном периоде при использовании современных методов лечения, чрескожных или открытых, как *in vitro*, так и *in vivo*, в клинике, могут играть важную роль в понимании патогенеза развития различных осложнений, в т.ч. тромботических. Полученные в ходе экспериментальных и клинических исследований данные помогут выявить новые

предикторы осложнений и неблагоприятных исходов у пациентов с заболеваниями периферических артерий атеросклеротической этиологии.

### **Цель исследования**

Улучшение результатов консервативного, эндоваскулярного, открытого хирургического лечения у пациентов с периферическим атеросклерозом и создание моделей прогнозирования неблагоприятных исходов на основании оценки показателей гемостатического звена дисфункции эндотелия.

### **Задачи исследования**

1. Определение оптимального метода для рутинного лабораторного изучения влияния материалов, используемых при реконструктивных артериальных вмешательствах (политетрафторэтилен - ПТФЭ, полиэтилентерефталат - ПЭТ, нитинол), на первичную культуру эндотелиальных клеток пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) *in vitro*.

2. Оценка миграционной активности первичной культуры HUVEC при воздействии ключевых материалов, применяемых в реконструктивной артериальной хирургии с целью изучения потенциальной эндотелизации сосудистых протезов.

3. *In vitro* изучение активности и уровня показателей гемостатического звена дисфункции эндотелия (активности FVIII, vWF, уровней PAI-1, sEPCR, антигена vWF (АГ vWF), метаболитов NO) при воздействии ПТФЭ, ПЭТ и нитинола на первичную культуру эндотелиоцитов HUVEC.

4. Изучение показателей гемостатического звена дисфункции эндотелия у пациентов с заболеваниями периферических артерий атеросклеротической этиологии.

5. Изучение изменения показателей гемостатического звена дисфункции эндотелия у пациентов с периферическим атеросклерозом в зависимости от выбранного вида лечения.

6. Установление ассоциации между активностью и уровнями показателей гемостатического звена дисфункции эндотелия и развитием неблагоприятных исходов у больных с периферическим атеросклерозом.

7. Разработка прогностических моделей развития неблагоприятных исходов у больных с периферическим атеросклерозом в зависимости от активности и уровня показателей гемостатического звена эндотелиальной дисфункции (ЭД) и сопутствующей патологии.

### **Научная новизна исследования**

В рамках экспериментальной части исследования проведена *in vitro* оценка метаболической (митохондриальной) активности ключевых элементов сосудистой стенки, эндотелиоцитов, на примере первичной культуры HUVEC, изучение миграционной активности культуры эндотелиоцитов, а также показателей активности и уровня параметров гемостатического звена дисфункции эндотелия (активности FVIII, vWF, уровней PAI-1, sEPCR, АГ vWF, метаболитов NO) при воздействии основных материалов, применяемых в реконструктивной артериальной хирургии (ПТФЭ, ПЭТ, нитинол).

В рамках клинической части диссертационного исследования у 167 больных с заболеваниями периферических артерий атеросклеротической этиологии при различных методах хирургического лечения (консервативное, эндоваскулярное, открытое хирургическое) впервые выполнена интегральная оценка показателей гемостатического звена дисфункции эндотелия (активности FVIII, vWF, уровней PAI-1, sEPCR, АГ vWF, метаболитов NO) в зависимости от характера и протяженности поражения артериального русла, тяжести ишемии, наличия сопутствующей патологии.

Разработаны прогностические модели развития неблагоприятных исходов у больных с периферическим атеросклерозом в зависимости от активности и уровня показателей гемостатического звена дисфункции эндотелия, наличия сопутствующей патологии.

### **Теоретическая значимость работы**

Полученные результаты используются в учебной работе высших медицинских учебных заведений для подготовки врача-лечебника, подготовке научно-педагогических кадров вузов. Результаты исследования окажут положительное влияние на расширение теоретических и практических знаний о коагуляционном звене эндотелиальной дисфункции. Проведено *in vitro* изучение активности и уровней показателей функции эндотелия, ассоциированных с гиперкоагуляцией, при воздействии различных материалов, используемых в реконструктивной артериальной хирургии (ПТФЭ, ПЭТ, нитинол) на клеточные элементы сосудистой стенки, в частности, первичные культуры HUVEC.

### **Практическая значимость работы**

Результаты диссертационного исследования применяются в практическом здравоохранении, а именно в сосудистой хирургии, ангиологии, кардиологии. В рамках клинической части эксперимента показана высокая прогностическая роль оценки гемостатических маркеров дисфункции эндотелия (активности FVIII, vWF, уровней PAI-1, sEPCR и метаболитов оксида азота (II), суммарной концентрации нитратов и нитритов, как интегрального показателя функции эндотелиоцитов) в развитии неблагоприятных исходов заболеваний периферических артерий атеросклеротической этиологии, а именно: рестеноза, инфаркта миокарда, летальных исходов, что может оказать существенное влияние на тактику лечения пациентов с периферическим атеросклерозом и улучшение прогнозов.

### **Методология и методы исследования**

Показатели гемостатического звена эндотелиальной дисфункции изучались *in vitro* в рамках экспериментальной части исследования и у пациентов с периферическим атеросклерозом в рамках клинической части.

В ходе *in vitro* исследования изучалась принадлежность выделенных первичных культур клеток к линии HUVEC при помощи метода

иммуноцитохимии. Далее оценивалась цитотоксичность ключевых материалов, используемых в сосудистой хирургии (ПТФЭ, ПЭТ, нитинол) при инкубации с ними первичных культур HUVEC при помощи MTS-теста фотокolorиметрически. Миграционная активность культуры эндотелиоцитов при воздействии вышеуказанных материалов изучалась при помощи теста «заживления повреждения (царапины)» с последующими микроскопией и фотодокументированием. Активность vWF в кондиционной среде после инкубации культуры HUVEC с ПТФЭ, ПЭТ или нитинолом определялась с использованием методики агглютинации тромбоцитов с использованием реагента VW Reagent, активность фактора коагуляции FVIII - клоттинговым гемостазиологическим методом, уровни PAI-1 и sEPCR - методом иммуноферментного анализа на автоматическом иммуноферментном анализаторе. Содержание стойких метаболитов оксида азота II (нитритов и нитратов) в кондиционной среде определялось спектрофотокolorиметрически. Экспрессия маркеров гемостатического звена дисфункции эндотелия в культуре HUVEC оценивалась методом Вестерн-блот.

В рамках клинической части исследования проводились физикальные, лабораторные и инструментальные обследования. Инструментальные методы включили в себя ультразвуковую доплерографию с измерением лодыжечно-плечевого индекса, ультразвуковое исследование артерий нижних конечностей, ангиографическое исследование периферического артериального русла, электрокардиографию. Показатели гемостатического звена эндотелиальной дисфункции (активность vWF и FVIII, уровни PAI-1, sEPCR, содержание стойких метаболитов NO) в периферической крови больных изучались при помощи методов аналогично *in vitro* исследованию. Помимо этого, в ходе клинической части исследования у пациентов с периферическим атеросклерозом проводилась оценка антигена vWF методом иммуноферментного анализа и активности протеина С - с использованием хромогенного метода с субстратом на автоматическом коагулометре.

Полученные результаты обрабатывали адекватными статистическими методами.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Гемостатическое звено дисфункции сосудистого эндотелия играет существенную роль в патогенезе периферического атеросклероза, включая развитие грозных осложнений: рестеноза, тромбоза артерий конечностей, инфаркта миокарда и летальных исходов.

2. Для пациентов с периферическим атеросклерозом характерны измененная активность и уровни гемостатических маркеров дисфункции эндотелия, степень выраженности которых зависит от тяжести ишемии, особенностей поражения артериального русла нижних конечностей и сопутствующей патологии, при этом для больных с критической ишемией в виде язвенно-некротических изменений, прогрессированием атеросклероза и развитием рестеноза характерно истощение «гемостатического» потенциала эндотелия по параметрам активности VIII, vWF и уровню sEPCR, соответственно.

3. *In vitro* изучение дисфункции эндотелия на первичной культуре эндотелиоцитов HUVEC в рамках экспериментальной части диссертационного исследования доказало наличие статистически значимых различий по параметрам метаболической, миграционной и коагуляционной активности культуры клеток при воздействии основных материалов, используемых в сосудистой хирургии (ПТФЭ, ПЭТ, нитинол), что следует учитывать при *in vivo* изучении процессов гиперкоагуляции, тромбоза, рестеноза и эндотелизации синтетических протезов и эндопротезов.

4. У больных периферическим атеросклерозом изучение уровня растворимых эндотелиальных рецепторов протеина С позволяет прогнозировать развитие рестеноза после эндоваскулярных вмешательств, а также риски развития новообразований, что может способствовать ранней диагностике и лечению с улучшением прогноза жизни.

5. Оценка активности протеина С позволяет прогнозировать рестеноз после открытых (шунтирующих) операций с использованием синтетических протезов.

6. Изучение активности vWF и уровня метаболитов NO у больных с периферическим атеросклерозом с сопутствующей гипертонической болезнью позволяет оценить вероятность развития летальных исходов.

7. Определение активности маркеров гемостатического звена дисфункции эндотелия FVIII и vWF позволяет выявить уязвимых в отношении развития инфаркта миокарда лиц с периферическим атеросклерозом.

8. Изучение уровня метаболитов оксида азота II (NO) у пациентов с периферическим атеросклерозом, которым показано выполнение открытых (шунтирующих) операций с использованием сосудистых протезов, позволяет выявить больных с повышенными рисками осложнений: развитием рестеноза зоны артериальной реконструкции, потерей конечности, а также летальными исходом.

9. В случае выполнения эндоваскулярных вмешательств, определение активности FVIII и уровня sEPCR у пациентов с периферическим атеросклерозом, в т.ч. с сопутствующим сахарным диабетом, позволяет оценить риски рестеноза.

### **Внедрение результатов исследования в практику и учебный процесс**

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

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность результатов исследования обусловлена широким спектром клинических наблюдений, использованием современных биохимических и коагуляционных методик, а также применения *in vitro* исследований на культурах

клеток на оборудовании мирового уровня с использованием реактивов высокого качества от ведущих производителей.

Основные результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на ежегодной научной конференции РязГМУ (Рязань, 2016), 23 Всероссийском съезде сердечно-сосудистых хирургов (Москва, 2017), I Съезде хирургов Центрального Федерального округа Российской Федерации (Рязань, 27-29 сентября 2017), XXXIII Международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов (Сочи, 2017), 24 Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов (Москва, 2018), XXXIV Международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов (Ярославль, 2018), ежегодной научно-теоретической конференции ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (Рязань, 2018), IV Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов с Международным участием (Россия, 2018), X Юбилейной Международной научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования» (Беларусь, 2018), XXIII ежегодной сессии НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева Минздрава России с Всероссийской конференцией молодых ученых (Москва, 2019), V Всероссийской с международным участием студенческой научно-образовательной конференции «Актуальные вопросы студенческой медицинской науки и образования» (Рязань, 2019), 26th Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery (24-27 May 2018 Moscow, Russia), 68th International Congress of the European Society for Cardiovascular and Endovascular Surgery ESCVS (May 22-25, 2019, Groningen, The Netherlands), ежегодной научно-теоретической конференции ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (Рязань, 2020), XIII Съезде хирургов России (онлайн, 2020), Российском форуме по тромбозу и гемостазу совместно с 10-й (юбилейной) конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии (онлайн, 08-10 октября 2020), ежегодной научной конференции РязГМУ к 70-летию основания ВУЗа на Рязанской земле (онлайн, 2020), 26-м всероссийском съезде сердечно-сосудистых хирургов (онлайн, ноябрь, 2020), ежегодной научно-теоретической конференции

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (Рязань, 2021), XXXVI Международная конференция «Горизонты современной ангиологии, сосудистой хирургии и флебологии» (Казань, июнь 2021), ежегодной 35-й конференции Европейского общества сосудистых хирургов ESVS в гибридном формате (онлайн и очно, Роттердам, Нидерланды, сентябрь, 2021).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 32 научных труда, из них 13 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, 8 – в изданиях, входящих в международную цитатно-аналитическую базу данных Scopus, издана 1 научная монография, 1 учебное пособие, получено 3 патента РФ на изобретение, внедрено 2 рационализаторских предложения.

### **Конфликт интересов**

Часть работы выполнена при поддержке исследовательского гранта Европейского общества сосудистых хирургов (European Society for Vascular Surgery Research grant 2016), часть работы – за счет бюджета ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Иных финансовых и других конфликтных интересов, получения вознаграждения ни в какой форме от фирм-производителей лабораторного оборудования, диагностического оборудования нет.

### **Объём и структура диссертации**

Объем работы составляет 217 страниц печатного текста, и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов клинического, экспериментального исследований и их обсуждения, заключения, выводов и практических рекомендаций, списка использованной литературы. Диссертация иллюстрирована 63 рисунками, 19 таблицами, 5 клиническими примерами. Список литературы содержит 261 источник, из которых 41 отечественных и 220 зарубежных авторов.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Нерешенные проблемы лечения пациентов с ЗПА атеросклеротической этиологии. Структура осложнений периферического атеросклероза

Атеросклероз является основной причиной сердечно-сосудистых заболеваний во всем мире, при этом распространенность заболеваний периферических артерий атеросклеротической этиологии в популяции довольно высока и составляет по разным данным до 10,69% в популяции в целом, достигая 20% среди пожилых людей старше 80 лет [43, 87]. Имеются данные о том, что среди пациентов с симптомным течением ЗПА в виде перемежающейся хромоты в течение 5 лет от выявления заболевания у 20% больных разовьются инфаркт миокарда или инсульт, летальный исход будет ожидаться у 10-15% [87]. При декомпенсации артериального кровотока в нижних конечностях к концу первого года лишь 45% больных имеют шанс сохранения конечности, 30% продолжают жить после ампутации бедра или голени, 25% – умрут [20].

Результаты реваскуляризирующих сосудистых операций впечатляют, однако проблема послеоперационных осложнений продолжает оставаться весьма актуальной [36]. Одними из грозных осложнений являются тромбозы, которые составляют 60-90% от всех поздних осложнений открытых реконструктивных вмешательств на артериях конечностей, в особенности после повторных вмешательств; частота тромботических осложнений после аорто-бедренных реконструкций колеблется от 42 до 59 % и возрастает с увеличением длительности наблюдения за пациентами [3]. При выполнении бедренно-подколенного шунтирования ниже щели коленного сустава частота возникновения осложнений зависит от методики шунтирования: преимуществом обладает шунтирование по методике «in situ», при котором тромбоз отмечается в среднем в 8,5% случаев, реверсированной веной – 15,4%, синтетическим протезом – 37,0 %. Частота тромбозов при выполнении бедренно-берцовых шунтирований колеблется в пределах 28,3-100%, прооперированных по методике «in situ» – 28,3%, с использованием реверсированной аутовены – 48,3%, синтетического

протеза - 98% [37]. К основным причинам локальных тромботических осложнений относятся хирургические погрешности, несостоятельность дистального русла, прогрессирование заболевания, гиперкоагуляция [5].

Оптимальным способом реваскуляризации является использование аутовенозных кондуитов, в частности, большой подкожной вены, а также в ряде случаев криопрезервированных аллогенных венозных протезов в сложных клинических ситуациях. В случаях, когда вена не доступна, широко применяются сосудистый протезы, преимущественно из ПТФЭ и ПЭТ (дакрона). Сосудистые протезы из ПТФЭ стали изучаться в экспериментах на животных с 1972 года, а применение в клинической практике началось с 1976 года [47]. По сравнению с дакроном, ПТФЭ представляет собой менее пористый материал, ввиду чего отмечается меньшая проницаемость этого материала для крови. Но, несмотря на химическую инертность материала, белки плазмы крови и тромбоциты могут осаждаться и на ПТФЭ [130]. Вопреки имеющимся данным о том, что активация комплемента и прикрепление тромбоцитов к поверхности материала ниже у ПТФЭ по сравнению с дакроном [205], согласно другим источникам, проходимость протезов из ПТФЭ и дакрона является сравнимой [216].

Протезы из ПЭТ применяются в сердечно-сосудистой хирургии уже более 70 лет. В настоящее время большинство дакроновых протезов покрываются коллагеном или желатином либо импрегнируются серебром; помимо этого, для снижения тромбогенности, протезы покрываются гепарином [119]. Дакроновые протезы проявляют не меньший профиль безопасности и надежности, чем ПТФЭ: согласно данным некоторых исследований, структурные недостатки отмечаются не более чем в 0,2% случаев в отдаленном после реконструкции периоде [154]. Порозность материала сосудистых протезов, комплайенс между имплантированным графтом и нативным сосудом, особенности кровотока в зонах анастомоза играют важную роль в развитии тромботических осложнений и рестеноза (гиперплазии интимы).

Следует отметить, что тромботические осложнения со стороны артерий конечностей характерны и для минимально инвазивных эндоваскулярных

вмешательств: так, в течение первого года тромбируются до 12,5% стентов с лекарственным покрытием и 1,4% без покрытия [192]. В случае выбора эндоваскулярного метода лечения одним из наиболее часто используемых материалов для создания эндопротезов является никелид титана — нитинол, представляющий собой соединение никеля и титана в пропорции 55 и 45% соответственно [167]. Несмотря на применение современных стентов с лекарственным покрытием, отмечаются и осложнения в виде локальных тромбозов, связанных с повреждением эндотелия. Большое количество *in vivo* и *in vitro* исследований посвящено изучению патогенетических механизмов развития тромбозов, а также реакции отдельных клеточных элементов сосудистой стенки на повреждение при имплантации внутрисосудистых стентов, о чем будет рассказано ниже [64].

Важную роль в развитии тромботических осложнений и рестеноза при ЗПА играют разнообразные молекулярно-клеточные элементы, в частности, эндотелий и его метаболиты. В норме атромбогенные факторы сосудистой стенки ингибируют тромбиногенез, инактивируют прокоагулянты, активируют фибринолиз, тормозят адгезию и агрегацию тромбоцитов, но не препятствуют гемостазу при повреждении сосудов, таким образом, ограничивают процесс тромбообразования. К одним из важнейших гемостатических маркеров дисфункции эндотелия относятся: фактор фон Виллебранда, ингибитор активатора плазминогена 1 типа, растворимые эндотелиальные рецепторы протеина С и метаболиты оксида азота II (NO). В случае повреждения клеток эндотелия их освобождение увеличивается, что дает основание их использования в качестве индикаторов нарушения функции эндотелия [257]. Интересен тот факт, что VIII фактор производится не только в синусоидных клетках печени, но и во внепеченочном эндотелии, что подтверждает взаимосвязь системы гемостаза с состоянием эндотелия сосудистой стенки [112].

В настоящее время однозначного ответа на вопросы, какова причина возникновения неблагоприятных исходов вследствие периферического атеросклероза, почему у пациентов сходного профиля возникают различные виды

тромбозов, рестеноз, прогрессирование заболевания, почему у одного больного отмечается доброкачественное течение заболевания, а у другого в короткие сроки наступает декомпенсация кровообращения и тяжелые осложнения, вплоть до летальных, не существует. В данном обзоре литературы основное внимание будет уделено потенциальным молекулярным и клеточным аспектам развития указанных осложнений.

## **1.2. Молекулярно-клеточные аспекты тромбоза после артериальных реконструктивных вмешательств**

Развитие ранних тромбозов, как правило, связано с техническими погрешностями либо наличием коагулопатии. Оклюзии протезов, регистрируемые в последующее время после артериальной реконструкции, ассоциированы с гиперплазией интимы и/или прогрессированием атеросклероза. Комплекс сложных взаимодействий между протезом, нативными сосудами и кровью запускает каскад молекулярных и клеточных ответов, что в итоге может привести к тому или иному осложнению.

Артериальный тромбоз зачастую запускается поврежденным эндотелием и разрывом атеросклеротической бляшки, в то время как в патогенезе венозного тромбоза ведущую роль играют стаз крови и факторы свертывания [86, 170]. Несмотря на эти различия, адгезия/активация тромбоцитов, образование и депонирование фибрина как результат системы коагуляции, все вместе составляют фундаментальную основу тромбообразования [209, 204]. Активация тромбоцитов возникает во время их взаимодействия с активированными эндотелиальными клетками (ЭК) на фоне повышенной продукции фактора фон Виллебранда и экспрессии селектинов посредством связывания комплекса гликопротеин Ib-V-IX с фактором фон Виллебранда, либо, когда они контактируют с компонентами субэндотелиального внеклеточного матрикса, например, коллагеном (посредством рецептора гликопротеина VI) в случаях сосудистого эндотелиального повреждения или при разрыве бляшки [78]. Коагуляция запускается связыванием фактора VII с тканевым фактором (внешний

путь коагуляции) или путем контактной системной активации посредством фактора XII (внутренний путь коагуляции) с последующим объединением в общий путь свертывания, приводящим к образованию фибрина путем сложных ферментных реакций разных факторов коагуляции (рисунок 1) [165, 238].

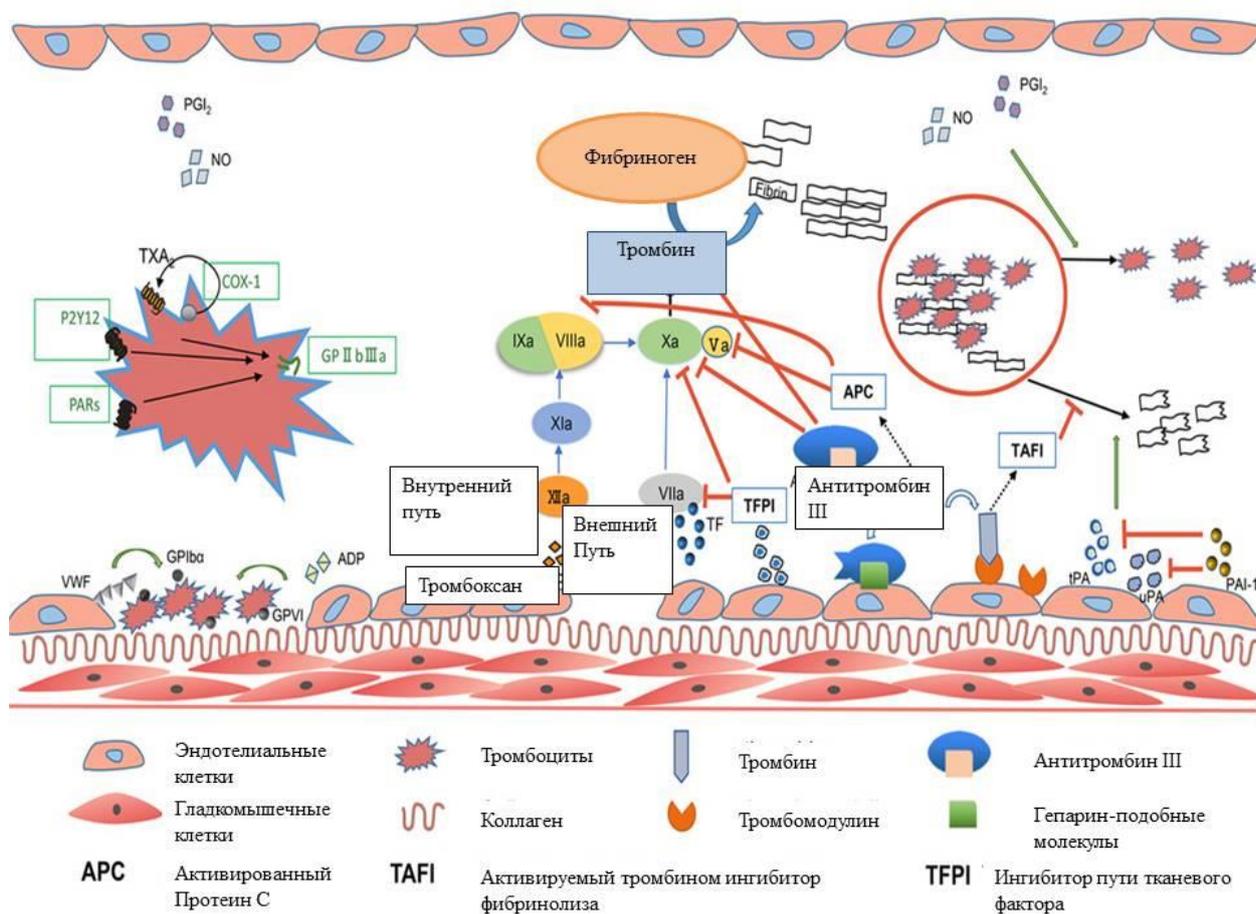


Рисунок 1 – Регуляция тромбоза. Процессы активации тромбоцитов и коагуляции, а также тромболизиса регулируются эндотелием. APC – activated protein C, активированный протеин C; GP – glycoprotein, гликопротеин; NO – оксид азота; PAI – ингибитор активатора плазминогена; TF – tissue factor, тканевой фактор; tPA – tissue plasminogen activator, активатор плазминогена тканевого типа; uPA – urokinase-type plasminogen activator, активатор плазминогена урокиназного типа; VWF – фактор фон Виллебранда (Wang M. и соавт., 2018, с изменениями) [165, 238]

Невозможность сосудистого протеза воссоздать атромбогенные свойства нативного сосуда предопределяет в большой степени дальнейшую судьбу

искусственных материалов в артериальной позиции. Одним из наиболее ранних процессов, происходящих в стенке сосудистого протеза, является отложение протромбогенных белков, транспорт которых осуществляется за счет процессов конвекции и диффузии. Такие важные факторы, как заряд поверхности, особенности структурного строения белков и их гидрофобность играют важную роль в отложении белков на стенке протеза [254].

Послеоперационные тромбозы остаются одной из важнейших проблем в современной сосудистой хирургии. Согласно литературным данным, через 1 год после шунтирующих операций ниже уровня щели коленного сустава ампутация требовалась более чем половине пациентов [174]. Ряд факторов ассоциируется с риском тромбозов шунтов, включая демографические факторы, сопутствующая патология, а также технические особенности выполнения вмешательств, частота выявления которых при ранних тромбозах может составлять до 25% [213, 251].

Тромбоз вследствие сосудистых манипуляций может происходить как вследствие непосредственного повреждения эндотелия, так и возможной диссекции внутренней и средней оболочек сосудистой стенки. Так, воздействие тканевого фактора приводит к образованию тромбина и фибрина, что в итоге совместно с активацией тромбоцитов приводит к развитию тромбоза. Адгезия тромбоцитов опосредована рецепторами интегринами и Пв/Ша. При этом агрегация тромбоцитов приводит к образованию тромбоксана А<sub>2</sub>, АДФ, серотонина, матричных металлопротеиназ (matrix metalloproteinase) MMP-2, MMP-9, различных факторов роста [206]. Тромб может служить своеобразным каркасом, через который могут мигрировать гладкомышечные клетки (ГМК), способные как синтезировать, так и деградировать компоненты внеклеточного матрикса, выполняя своеобразную реорганизацию тромба.

Эндотелиальные клетки в физиологических условиях способны поддерживать устойчивый гомеостаз в отношении атромбогенности внутренней выстилки сосудов за счет экспрессии антикоагулянтных факторов, включая оксид азота, тромбомодулин, гепарин, простагландин PGI<sub>2</sub> и другие. При возникновении сосудистого повреждения фактор Виллебранда, тканевой фактор и

субэндотелиальный коллаген контактируют с кровью, за счет чего запускается каскад коагуляции. Тромбоциты также активируются за счет фактора Виллебранда, гликопротеинов GPIa/IIa и GPIIb/IIIa, фибронектинов, тромбоксана A<sub>2</sub> и других факторов [236].

Связывание фактора XII с инородной поверхностью приводит к конформационным изменениям и активизации фактора XIIa, который в свою очередь активирует фактор IX и в итоге фактор Xa. Фактор Xa способствует конвертации протромбина в тромбин [85]. Помимо этого, тканевой фактор, в любом случае образующийся при оперативных вмешательствах, запускает образование фактора VIIa, который также приводит к образованию активированных факторов IXa и Xa. Помимо непосредственно факторов свертывания, важную роль играют особенности кровотока: локальные его нарушения в зонах анастомозов могут образовывать зоны рециркуляции, способствующие локальной прокоагуляции.

Важную роль играет клеточное взаимодействие элементов крови при контакте с материалом сосудистых протезов. Тромбоциты вовлечены в различные типы иммунных ответов, опосредованных как Т-клетками, так и системой комплемента [177]. Отложение на поверхности протезов фибронектина, фибриногена и фактора фон Виллебранда также способствуют вовлечению в тромбогенный процесс тромбоцитов. Помимо тромбоцитов внимание следует уделить рекрутингу нейтрофилов, а также моноцитов, которые в итоге дифференцируются в макрофаги. Последние способны экспрессировать различные протеазы, компоненты системы комплемента, факторы свертывания, которые способствуют развитию и поддержанию хронического воспаления. Исследования подтверждают наличие макрофагов на ПТФЭ протезах [57]. Литературные данные показывают, что при использовании дакрона моноциты и макрофаги экспрессируют интерлейкины 1В и 6, ФНО-альфа в большей степени, чем при применении ПТФЭ [239], что в итоге может усугублять развитие гиперплазии интимы за счет гиперпролиферации ГМК.

Активация системы комплемента также может играть важную роль в развитии протез-ассоциированных осложнений: связывание C3b или C3 с инородной поверхностью с последующим связыванием фактора В приводит к формированию комплекса комплемента, что в свою очередь запускает воспалительный ответ. Воспаление способствует активации тромбоцитов и может приводить к инфильтрации моноцитами и нейтрофилами поверхности искусственного сосудистого протеза, что приводит к развитию гиперплазии интимы и нарушению физиологичной эндотелизации [129].

Антитромбоцитарная терапия преимущественно осуществляет профилактику раннего тромбообразования после сосудистых вмешательств, в то время как отсроченные тромбозы, в особенности покрытых стентов, вызывают сомнения относительно длительности терапии. Интересно, что антитромбоцитарные препараты, в частности, ингибиторы П<sub>2</sub>У<sub>12</sub> рецепторов тромбоцитов, продемонстрировали важную роль тромбоцитов в процессах рестеноза. Например, нокаут рецептора P2Y<sub>12</sub> на тромбоцитах или его блокада клопидогрелем ингибировало образование неоинтимы в эксперименте [207]. Однако часть данных остается противоречивыми, так как низкая чувствительность тромбоцитов к клопидогрелю не была предиктором развития рестеноза у пациентов, которым имплантировались стенты с лекарственным покрытием [208]. Система коагуляции играет важную роль в рестенозе: наложение фибрина на стентах и пониженное содержание ко-фактора гепарина II, ингибитора тромбина, было ассоциировано с процессами рестеноза в стенте [138].

### **1.3. Молекулярно-клеточные аспекты развития рестеноза после реконструктивных вмешательств**

Помимо тромботических осложнений, ассоциированных с гиперкоагуляцией, важное место в структуре осложнений после реконструктивных вмешательств играет рестеноз. Спустя несколько месяцев после шунтирующей операции либо ангиопластики/стентирования артерий может отмечаться существенное стенозирование либо окклюзия зоны реконструкции.

Подобный рецидив стеноза и снижение просвета сосуда принято обозначать как рестеноз. Причин для развития рестеноза несколько.

Как правило, первичная патология, выявляемая в сосуде при рестенозе, это гиперплазия интимы. Также важную роль может играть ремоделирование сосудистой стенки даже в отсутствие выраженной неоинтимальной гиперплазии.

Гиперплазия интимы – это патологический процесс, участниками которого являются и кровь, и сосудистая стенка, и периваскулярное пространство; в сложное взаимодействие вовлечены многочисленные клеточные линии и сигнальные пути [23]. Важную роль в развитие гиперплазии интимы могут играть физические аспекты гемодинамики, а именно, напряжение сдвига [76]. Эндотелиоциты реагируют на изменение гемодинамики путем выделения оксида азота и Круппель-подобного фактора-2, чтобы обеспечить нормальную функцию подлежащих гладкомышечных клеток и в целом сосудистую стенку [73]. Эндотелиоциты выделяют целый ряд молекул, включая молекулы адгезии и провоспалительные факторы, которые способствуют клеточной пролиферации и в итоге развитию гиперплазии [240].

Пристеночное напряжение сдвига (wall shear stress) и напряжение сосудистой стенки (wall tension stress) являются важными регуляторами возникновения рестеноза; например, периферические реконструктивные вмешательства с использованием стентов ассоциируются с изменением кровотока, характеризующимся низким напряжением сдвига сосудистой стенки, что способствует развитию гиперплазии неоинтимы [245]. Имеются свидетельства о том, что усиление кровотока при уже имеющейся гиперплазии интимы способствует уменьшению степени ее выраженности [169]. Данные положительные эффекты могут пропадать по достижении определенного порогового значения, если напряжение сдвига достигает критических уровней [189]. В настоящее время проводятся различные *in vitro* и *in vivo* исследования с целью изучения влияния гемодинамических и механических факторов на сосудистую стенку и культуры клеток, соответственно. Например, механическое воздействие на культуру клеток может приводить к активации некоторых

сигнальных путей, которые способны оказывать влияние на фенотип гладкомышечных клеток [83]. Распространение получили различные системы для *in vitro* моделирования физиологических и патологических условий гемодинамики, например, устройства для воссоздания пульсирующего кровотока в культуре эндотелиоцитов [60].

По сравнению с нормальной средней оболочкой сосудов, в состав неоинтимы входит большее количество внеклеточного матрикса с нарушенной архитектурой, которая дает схожую с фиброзом картинку. Однако, в отличие от фиброзной ткани с большим количеством фибробластов, в неоинтиму входят клетки, которые экспрессируют маркеры ГМК, такие как альфа-актин и тяжелые цепи гладкомышечного миозина. Исследования последних лет показали, что помимо производных меди, в неоинтиму определяются и клетки адвентиции и периваскулярного пространства, прогениторные клетки и другие клетки циркулирующей крови [133]. При этом, оказавшись в неоинтиму, указанные выше клетки меняют фенотип в сторону ГМК [231], имея склонность к усиленной пролиферативной и метаболической активности в отношении факторов роста, молекул адгезии, провоспалительных цитокинов [127].

Эндотелиоциты, монослой клеток, представляющий внутреннюю выстилку сосудов, продуцируют трансмембранные молекулы адгезии для обеспечения межклеточных связей. Взаимодействие этих молекул, кадгеринов, с цитоскелетом эндотелиальных клеток приводит к образованию особых адгезивных соединений между соседними эндотелиоцитами, что обеспечивает поддержание обмена молекулами между циркулирующей кровью и непосредственно клетками [172]. При этом эндотелиоциты продуцируют широкий спектр веществ как с анти-, так и с проангиокоагулянтным действием. Одну из важнейших ролей среди всех прочих продуцентов эндотелия играет оксид азота II (NO), который является ключевым фактором релаксации сосудов и поддержания физиологического состояния клеток сосудистой стенки, а также неотъемлемым звеном в системе коагуляции [28, 101]. При воздействии неблагоприятных гемодинамических, механических либо химических раздражителей фенотип эндотелиоцитов может меняться [136];

может отмечаться измененная регуляция и активность генов, что изменяет метаболическую активность эндотелиоцитов и активность/концентрацию биологически активных молекул, производимых клетками, включая непосредственно оксид азота, цито- и хемокины, молекулы адгезии, а также про- и антикоагулянты [173]. Вышеуказанные вещества играют важную роль в развитии гиперплазии интимы за счет изменения активности ГМК, привлечения клеток, участвующих в патогенезе данного состояния, включая провоспалительные клетки, прогениторные эндотелиальные клетки и прочие. Также важную роль играют процессы эндотелиально-мезенхимального перехода [193].

Гиперплазированная интима содержит преимущественно ГМК, при этом клетки демонстрируют различный фенотип согласно экспрессии маркеров дифференции, таких как альфа-актин, десмин и прочие. ГМК в составе гиперплазированной интимы продуцируют внутри- и внеклеточные вещества, которые способствуют разрастанию неоинтимы. Интересным является факт, что активная пролиферативная и метаболическая активность ГМК ассоциирована с избыточной чувствительностью к действию факторов роста и цитокинов [109]. Отмечается повышенная регуляция генов, ответственных за синтез компонентов межклеточного матрикса. Активность протеаз, ответственных за деградацию межклеточного матрикса, а также их ингибиторов, регулируется при этом таким образом, что происходит избыточное накопление межклеточного вещества [160]. Помимо этого, ГМК экспрессирует широкий спектр факторов роста, хемо- и цитокинов, активность которых меняется в зависимости от стадии развития гиперплазии интимы. Также важную роль играет то, что по мере продолжающейся измененной дифференцировки ГМК, эти клетки могут демонстрировать фенотип миофибробластов; эти клетки могут играть важную роль в сосудистом ремоделировании, в частности, разрастании неоинтимы [82].

Среди клеточного многообразия важную роль в развитии гиперплазии интимы играют циркулирующие клетки крови. Несмотря на то, что количество провоспалительных клеток в составе неоинтимы существенно меньше в

сравнении с ГМК, моноциты, эозинофилы и Т-клетки играют важную роль за счет продукции воспалительных медиаторов в развитии гиперпластических процессов после реконструктивных вмешательств [180]. Различные субпопуляции лейкоцитов ответственны за различные этапы развития гиперплазии интимы, начиная с момента повреждения сосудистой стенки. В последние десятилетия пристальное внимание крупные научные школы обращают на роль моноцитов и макрофагов в развитии сосудистого воспаления в целом и в развитии рестеноза и прогрессирования атеросклероза в частности. Прогениторные эндотелиальные клетки (ПЭК) могут играть не менее важную роль в развитии гиперплазии интимы [94]. Было доказано, что ПЭК участвуют в реэндотелизации поврежденной поверхности сосудов [103]. Экспериментальные исследования показали, что более активный рекрутинг ПЭК к зоне повреждения был связан с угнетением развития гиперплазии интимы [89]. При этом существуют данные, что нарушение функции ПЭК ассоциируется с развитием прогрессирования атеросклероза и рестеноза [48, 102].

Известно о том, что в патогенезе развития стенотических и рестенотических процессов в сосудах задействовано большое количество хемо- и цитокинов, биологически активных веществ. Ряд исследований проводится в отношении Р-, L- и E-селектинов в развитии эндотелиальной дисфункции, воспаления и рестеноза [156]. Важную роль в процессах сосудистого воспаления и развития гиперплазии интимы играют различные хемокины, включая MCP-1, RANTES, IL-8, IP-10, SDF-1 и другие. Помимо указанных хемокинов, значение имеют молекулы межклеточной и сосудистой адгезии и интегрины. Развитию гиперплазии интимы способствует выделение моноцитами провоспалительных цитокинов, которые способствуют индукции митоза ГМК и апоптоза эндотелиоцитов. Важную роль в регуляции процессов воспаления и рестеноза в сосудистой стенке играют рецепторы TLR-2, TLR-4, запускающие иммунные реакции в зоне повреждения. Опубликована информация и о генетической предрасположенности к развитию гиперплазии интимы, например, влиянии

определенных локусов в 12 хромосоме, полиморфизма гена интерлейкина-10 и прочих [45].

В адаптации организма к имплантации искусственных сосудистых протезов существенно роль играют ГМК и сложные взаимодействия между ГМК и ЭК. Миграция ЭК из зоны анастомозов, как правило, приводит к формированию неоинтимы в близлежащей области, однако отдельные участки, покрытые ЭК, встречаются и в отдаленных от зон анастомозов участках протезов, что может быть связано как с трансмуральным микрососудистым прорастанием, так и заселением участка протеза циркулирующими эндотелиальными прогениторными клетками (ЭПК) [134, 195]. Несмотря на то, что проводятся исследования по способам оптимальной эндотелизации сосудистых протезов, ЭК на стенке протезов могут способствовать прокоагуляции и пролиферации ГМК за счет активной экспрессии факторов роста. Например, в исследованиях на свиньях было показано, что при покрытии ПТФЭ протезов антителами к CD34 отмечалась более активная эндотелизация за счет рекрутинга эндотелиальных прогениторных клеток, однако спустя 4 месяца активная эндотелизация привела к более выраженной гиперплазии интимы в зоне дистальных анастомозов [151]. Не менее важную роль в развитии неоинтимы играют ГМК, которые в составе неоинтимы экспрессируют повышенное количество факторов роста, коллагена, внеклеточного матрикса [63].

Обобщая вышеизложенное, можно сказать следующее: эндотелий и вещества им продуцируемые играют важнейшую роль в развитии осложнений периферического атеросклероза, что делает пристальное изучение ЭК и их дисфункции краеугольным камнем ангиологии и сосудистой хирургии.

#### **1.4. Эндотелий в норме и патологии. Роль эндотелия в системе коагуляции**

Эндотелиоциты представляют собой внутреннюю оболочку сосудов и выполняют широкий спектр функций, включая поддержание барьерной функции, артериального давления и сосудистого тонуса, гемостаза, роста сосудов

и процессов воспаления [9, 15]. Дисфункция эндотелия ассоциирована с такими сложными заболеваниями и патологическими состояниями как атеросклероз, артериальная гипертензия, диабет, аутоиммунные, воспалительные, инфекционные, онкологические заболевания и другие.

Известно, что эндотелий представляет собой целую систему клеток с большой площадью (около 350м<sup>2</sup>), при этом сравнительно небольшой массой (приблизительно 110 г), и имеет характерные структурные особенности [10]. Среди широкого спектра выделяемых эндотелиоцитами веществ следует особо выделить мощные вазодилататоры: оксид азота II (NO), рассматриваемый в качестве интегрального показателя функции ЭК, простагландин, эндотелиальный гиперполяризирующий фактор, натрийуретический пептид (С), аденозин три- и дифосфорная кислота (аденозинтрифосфат - АТФ, аденозиндифосфат - АДФ) и прочие; вазоконстрикторы: ангиотензин-2, эндотелин-1, тромбоксан, 20-гидроксиэйкозатетраеновая кислота. Действие активных веществ сосудосуживающего и сосудорасширяющего характера на ЭК связано с наличием на клетках специфических рецепторов, активация которых способствует продукции вторичных медиаторов, которые оказывают соответствующее влияние на гладкомышечные клетки (ГМК) [124]. При этом оксид азота играет важную роль не только в регуляции сосудистого тонуса, но и в системе свертывания. Кроме того, ЭК вырабатывают широкий спектр веществ про- и противовоспалительного характера, представленных в табл. 1 [41].

Таблица 1 – Факторы эндотелиального происхождения и их эффекты

Эффекты	Эндотелиальные факторы
Вазодилатирующий	1. Оксид азота II (nitric oxide, NO) 2. Простагландин (простагландин I2) 3. Эндотелий-гиперполяризирующий фактор (endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF)
Вазоконстрикторный	1. Эндотелин 2. Ангиотензин I-AI, ангиотензин II-AII 3. Тромбоксан 4. 20-Гидроксиэйкозатетраеновая кислота 5. Экспрессия на поверхности эндотелиальных клеток ангиотензинпревращающего фермента, конверсия AI в AN

Продолжение Таблицы 1	
Тромбогенные (гиперкоагуляционные, гемостатические)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Фактор фон Виллебранда</li> <li>2. Фактор активации тромбоцитов</li> <li>3. Аденозиндифосфат</li> <li>4. Тромбоксан А2</li> <li>5. Ингибитор активатора плазминогена</li> <li>6. Тромбоспондин</li> <li>7. Коллаген и эластин</li> <li>8. Фибронектин</li> </ol>
Антитромбогенные	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Оксид азота II (nitric oxide, NO)</li> <li>2. Тканевой активатор плазминогена</li> <li>3. Простаглицлин (PGI<sub>2</sub>)</li> <li>4. Тромбомодулин (белок, способный связывать тромбин и гепариноподобные гликозаминогликаны)</li> </ol>
Противовоспалительный	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Оксид азота II в зависимости от уровня и активности</li> <li>2. Трансформирующий фактор роста (transforming growth factor, TGF)</li> <li>3. Интерлейкины-4, 10, 11, 13</li> <li>4. Фактор торможения миграции макрофагов (macrophage migration inhibitory factor MIF)</li> <li>5. Антагонист рецептора IL-1 (interleukin 1 receptor antagonist, IL-1 - RA)</li> </ol>
Провоспалительный	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Оксид азота II (nitric oxide, NO) в зависимости от уровня и активности</li> <li>2. Индуцибельная синтаза оксида азота</li> <li>3. P-селектин, E-селектин</li> <li>4. Молекулы межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1)</li> <li>5. Белок хемотаксиса моноцитов (monocyte chemoattractant protein-1- MCP-1)</li> <li>6. Колонiestимулирующий фактор макрофагов (macrophage colony-stimulating factor, MCSF)</li> <li>7. Гранулоцитарно-макрофагальный колонiestимулирующий фактор (colony stimulating factor 2 (granulocytemacrophage, GM-CSF)</li> <li>8. Фактор некроза опухоли (tissue necrosis factor, TNF)</li> <li>9. С-реактивный белок (c-reactive protein, CRP)</li> <li>10. Тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor, PDGF)</li> <li>11. Интерлейкины-1, 6, 8, 12</li> <li>12. Гамма-Интерферон</li> </ol>
Регуляция пролиферации гладкомышечных клеток (ГМК)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Сосудистый эндотелиальный фактор роста vascular endothelial growth factor, VEGF</li> <li>2. Факторы роста фибробластов (основной и кислый – fibroblast growth factor FGF, basic and acidic</li> <li>3. Эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor, EGF)</li> </ol>

Основное внимание в данной работе будет уделено веществам-продуктам ЭК, задействованным в гемостазе. К основным веществам с протромбогенными эффектами относят фактор фон Виллебранда, ингибитор активатора плазминогена

(PAI-1). К атромбогенным относятся оксид азота II, тромбомодулин, простациклин, а также тканевой активатор плазминогена [38]. При возникновении сосудистого повреждения либо воздействию патологических агентов возникает состояние дисфункции эндотелиоцитов, которое существенно изменяет секреторную функцию клеток.

В физиологических условиях эндотелий имеет атромбогенную поверхность, на которой экспрессируются сульфаты гепарина и хондроитина; кроме того, противосвертывающие свойства обеспечиваются синтезом простагландина I<sub>2</sub>, оксида азота (II) и АДФ-азы. Коагуляция запускается связыванием фактора VIIa с комплексом тканевого фактора; данный процесс может блокироваться ингибироваться на поверхности эндотелия за счет эффектов ингибитора пути тканевого фактора. АДФ, АТФ и тромбин являются ключевыми факторами, способствующими агрегации тромбоцитов. В патологических условиях поврежденная поверхность эндотелия с подлежащими гладкомышечными клетками (ГМК) подвержены воздействию прокоагулянтных факторов и циркулирующих моноцитов, нейтрофилов и тромбоцитов. Интересным представляется факт, что помимо простагландинов оксид азота (II) может обладать противосвертывающим воздействием [242].

Адгезия лейкоцитов к ЭК способствует развитию тромбоза [106, 224]. При этом хемотаксис лейкоцитов и модулирование процесса тромбообразования может быть опосредованно экспрессией ЭК особого хемокинового лиганда, CCL2 (C-C chemokine ligand 2). Есть данные о том, что vWF может опосредовать взаимодействие между эритроцитами и ЭК, что в итоге могло приводить к развитию тромбоза, по крайней мере, венозного [234].

Помимо экспрессии медиаторов с про- и антикоагулянтными свойствами, целостность эндотелия сама по себе играет важную роль в развитии тромбоза. Palekar и соавт. с целью снижения рисков кровотечения при системном введении ингибиторов тромбина, вводили наночастицы с мощным ингибитором тромбина в зоны атеросклеротических бляшек мышам: это позволило восстановить эндотелиальный барьер, ослабить атерогенное воспаление и снизить риск

развития тромбоза [153]. В модели атеросклероза на кроликах стенты, покрытые лигандами рецепторов PPAR- $\delta$ , приводили к реэндотелизации стентов и предотвращению активации тромбоцитов, что снижало риски рестеноза и тромбоза стентов [55].

Эндотелий поддерживает атромбогенность и нормальный ток крови за счет оптимальной регуляции реактивности тромбоцитов, коагуляции, тромболизиса путем синтеза широкого спектра вазоактивных молекул. Потеря нормальной структуры и функции эндотелия приводит к развитию тромбоза либо развитию хронических изменений, ассоциированных с атеросклерозом, рестенозом, диабетом, ожирением и пр. [128, 163, 218, 232].

Понимание механизмов регуляции эндотелием процессов тромбообразования не только углубит фундаментальные знания в патогенезе тромбозов и ассоциированных с ними патологических состояний, но и позволит разработать эффективные терапевтические меры с созданием антитромботических препаратов с минимальным риском кровотечений, что крайне актуально для современной медицины.

Интерес представляет взаимодействие антикоагулянтов С и S и гемостатических продуцентов эндотелиоцитов. Так, протеин С (protein C, PrC) и протеин S (protein S, PrS) могут инактивировать факторы свертываемости Va, VIIa, при этом активация непосредственно PrC возможна при участии тромбомодулина и рецепторов протеина С - EPCR. Последние имеют высокую аффинность к протеину С на поверхности эндотелиоцитов, в непосредственной близости от комплексов тромбомодулин-тромбин. Протеин С играет важную роль в патогенезе ряда сосудистых и прочих заболеваний [17]. Так, имеется связь между концентрацией PrC и его ингибитора и повышенным образованием тромбина, что было выявлено при изучении аневризмы аорты [53].

Важным антикоагулянтом является активированный протеин С, который секретируется интактным эндотелием, когда тромбин связывается со своим рецептором тромбомодулином. В присутствии своего кофактора PrS, PrC инактивирует факторы Va и VIIa, таким образом, угнетая активность

протромбиназного комплекса [147]. Другим природным антикоагулянтом является ингибитор пути тканевого фактора, который связывает комплекс тканевой фактор – фактор VIIa, что в итоге ингибирует активацию фактора X, следовательно, препятствуя образованию протромбиназы. При этом активность фактора IX не угнетается [143].

Основным естественным антикоагулянтом принято считать антитромбин, который связывается с тромбином и приводит к следующим эффектам: 1) ингибирование тромбина предотвращает отщепление фибринопептидов А и В от фибриногена, что в свою очередь препятствует образованию фибрина; 2) нарушается взаимодействие тромбина и факторов свертываемости V и VIII, что тормозит ход каскада коагуляции; 3) тромбин-опосредованная активация тромбоцитов и их агрегация также ослабляются. В присутствии гепарина ингибирование тромбина антитромбином выражено еще больше, что приводит к системным противосвертывающим эффектам. Также тромбин непосредственно ингибирует факторы свертывания VIIa, IXa, Xa, XIa и XIIa, таким образом, внешний и внутренний пути коагуляции тесно взаимосвязаны.

Классически к факторам внутреннего пути свертывания относили фактор XII, прекалликреин и высокомолекулярный кининоген, дефицит которых даже при неблагоприятных условиях не приводил к развитию кровотечений. Точная физиологическая роль внутреннего пути свертывания до конца не определена.

Внутренний путь коагуляции отвечает на спонтанное внутреннее повреждение сосудистого эндотелия. К нему в настоящее время принято относить факторы XII, XI, IX и VIII. Внешний путь рассматривается в контексте факторов VII и III (тканевой фактор). Общий путь свертывания, согласно классическим представлениям, включает факторы свертывания X, V, II, I и XIII. Активация фактора XII рассматривается в качестве первого шага во внутреннем каскаде коагуляции. Его активация индуцируется путем контактирования с субэндотелиальным коллагеном в присутствии высокомолекулярного кининогена. Активированный фактор XIIa, в свою очередь, активирует фактор XI, что ведет к активации фактора IX. Последний играет роль сериновой протеазы, для функции

которой важную роль играет фактор XIII. Когда факторы XIII и IXa связываются друг с другом на мембране тромбоцитов, запускается процесс протеолиза, а именно, сериновая протеаза отщепляет определенные участки зимогена, что приводит к последующей активации [72].

Современная модель гемостаза – клеточная [141]. Согласно текущим представлениям ключевую роль в активации, локализации и концентрации свертывающих белков обеспечивают клеточные рецепторы, фосфолипиды мембран, а также места соединения клеток, включая ЭК, тромбоциты и лейкоциты, что наиболее полно отражает процессы, текущие *in vivo*. Клеточная теория свертывания (2001 г.) не отрицает взаимодействия свёртывающей, противосвёртывающей и фибринолитической систем, описанных в классической каскадной модели свертывания 1964 года [146]. Она углубляет представление о внешнем и внутреннем каскадах коагуляции, не отрицая их наличие. Фазы коагуляции представлены следующим образом в контексте клеточной теории гемостаза:

1 фаза – инициация свертывания крови: образуется комплекс тканевой фактор – фактор VIIa в месте повреждения сосудистой стенки, что запускает процесс образования тромбина.

2 фаза – усиление (амплификация) свертывания крови: возникает активация тромбоцитов, тромбин в свою очередь активировывает факторы V, VIII, связанный с фактором Виллебранда (vWF), и XI факторы, расположенные непосредственно на мембране тромбоцитов.

3 фаза – распространение (пропагация) процесса свертывания крови с формированием теназного (фактор VIIIa/фактор IXa) и протромбиназного (фактор Va/фактор Xa/кальций/фактор III тромбоцитов) комплексов на активированных тромбоцитах, что приводит к «тромбиновому взрыву» с последующим образованием фибрина, образованием XIIIa-фактора и фибринового сгустка, что отражено на рисунке 2 [175].



### 1.5. Ключевые гемостатические маркеры дисфункции эндотелия

Эндотелиоциты продуцируют как антикоагулянтные, так и прокоагулянтные факторы, что делает эндотелий одним из ключевых звеньев в гемостазе и функции фибринолитической системы. К важным антикоагулянтным (гемостатическим) продуцентам эндотелия относят оксид азота (II) NO, рецепторы протеина С (EPCR), тромбомодулин, простациклин, гепарин, АДФ-аза, а также ингибитор пути тканевого фактора и активатор плазминогена тканевого типа. К активным веществам, выделяемым эндотелием, обладающим прокоагулянтным действием, относят фактор фон Виллебранда (vWF, или ФВ), ингибитор активатора плазминогена – 1 (PAI-1) и активируемые протеазами рецепторы (PAR). Помимо непосредственных продуцентов эндотелия важную роль в свертывающей системе крови играют PrC и PrS, антитромбин III, фибриноген, а также факторы свертывания, среди которых в контексте дисфункции эндотелия отдельно следует выделить фактор VIII. Традиционно считалось, что фактор VIII вырабатывается лишь в эндотелиоцитах печени, однако позже было показано, что выработка его активно происходит и во внепеченочных ЭК. Львиная доля (до 95%) фактора VIII находится в комплексе с фактором фон Виллебранда, что защищает его от инактивации протеином С [110]. Интересным фактом является то, что экспрессия тех или иных анти- или прокоагулянтных факторов происходит неравномерно в эндотелии разной локализации. Например, рецепторы протеина С EPCR преимущественно продуцируются эндотелиоцитами крупных артерий, в то время как тромбомодулин – в сосудах любого калибра и типа, активатор плазминогена – в легочных артериях и артериях центральной нервной системы [58]; подобное неравномерное распределение экспрессии анти- и прокоагуляционных веществ ответственно за наличие специфичных локализаций возникновения тромбоза.

Для эндотелиальной дисфункции характерны изменения в сторону гиперкоагуляции, воспаления и вазоконстрикции. При патологических условиях выброс активирующего тромбоциты фактора и эндотелина-1 способствует

вазоконстрикции, при этом секреция PAI-1, vWF, а также тканевого фактора и фактора V способствуют формированию тромбов [131].

В данном разделе описаны ключевые продуценты эндотелиоцитов, задействованные в регуляции системы гемостаза, изучению которых посвящена диссертационная работа.

#### *Ингибитор активации плазминогена I типа, PAI-1*

В физиологических условиях процессы тромбообразования и тромболитического уравнивания, что препятствует развитию внутрисосудистого свертывания. Плазмин является основным фибринолитическим ферментом, который помимо прочего препятствует опосредованной фактором фон Виллебранда адгезии тромбоцитов; активация плазминогена способствует локальной протеолитической активности [158].

Основным ингибитором активаторов плазминогена является PAI-1, который секретируется в печени и эндотелиоцитах и стабилизируется витронектином. В латентной форме PAI-1 содержится в тромбоцитах. PAI-1 представляет собой ингибитор сериновых протеаз (серпин) [115]. Основной его функцией является ингибирование фибринолиза за счет ингибирования активаторов плазминогенов, однако недавние исследования показали и прочие, помимо антифибринолитических, эффекты PAI-1 [194, 202]. PAI-1 преимущественно продуцируется эндотелиоцитами, но также жировой тканью. Повышение уровня PAI-1 является фактором риска тромбоза и атеросклероза [244]. Например, у трансгенных мышей со сверхэкспрессией PAI-1 отмечалось развитие коронарного артериального тромбоза с повышением возраста. Другие исследования показали, что PAI-1 может выступать медиатором клеточного старения. Нормализация/ингибирование повышенных уровней PAI-1 может стать новой стратегией для контроля ряда патологий, включая тромбоз, атеросклероз, т.е. состояний, где важную роль играют эндотелиальная дисфункция и эндотелиальное старение [200].

PAI-1 секретируется в активной форме эндотелием и печенью, стабилизируется витронектином, и, будучи связанным с последним, обладает

способностью ингибировать тромбин. PAI-1 может накапливаться в альфа-гранулах неактивных тромбоцитов [196]. Доказана роль повышения уровня PAI-1 при наличии полиморфизма 4G/4G в повышении риска развития венозных тромбоэмболических осложнений: так, наличие 4G аллеля в сочетании с другими тромбофилическими маркерами приводила к существенному повышению риска развития венозного тромбоза и тромбоэмболии легочной артерии [261].

Повышенный уровень PAI-1 может подавлять фибринолиз, соответственно, повышая склонность к тромбообразованию. При наличии сосудистого повреждения и воспаления, ЭК продуцируют ММР и активаторы плазминогена, которые конвертируют плазминоген в плазмин, которые в свою очередь деградирует фибрин, образованные вследствие каскада коагуляции. Фибрин представляет собой мощный митоген и хемоаттрактант для ГМК [116]. В норме этот процесс контролируется PAI-1, однако при нарушении целостности сосудистой стенки фибрин может депонироваться локально вследствие особенностей каскада коагуляции и повышения активности PAI-1: исследования показали, что сверхэкспрессия PAI-1 усиливала развитие гиперплазии интимы [92].

PAI-1 представляет собой основной физиологичный ингибитор активаторов плазминогена в крови. Помимо этого, PAI-1 участвует в тканевом ремоделировании за счет витронектин-зависимой клеточной адгезии и миграции. Врожденный дефицит PAI-1 встречается редко, приводя к удлинению времени кровотечения. Повышенные уровни PAI-1 в плазме уменьшают функциональную активность активаторов плазминогена, тем самым препятствуя удалению фибрина и нарушая фибринолиз [144]. Время полужизни PAI-1 в крови короткое и составляет менее 10 минут. Важно отметить, что PAI-1 вовлечен в регуляцию клеточной адгезии и миграции посредством механизма, не связанного с его активностью в качестве ингибитора протеаз. Его высокая аффинность с соматомедином В витронектина способствует его эффективной конкурентности с другими лигандами, которые также связываются с витронектином в данном домене, такими как рецепторы активатора плазминогена урокиназного типа и

интегрины, включая  $\alpha V\beta 3$  [235]. Способность конкурировать с такими лигандами предполагает важную роль PAI-1 в качестве регулятора клеточных взаимодействий с внеклеточным матриксом.

Роль PAI-1 изучалась в кардиологии: в одном из систематических обзоров и метаанализов были представлены результаты изучения ассоциации PAI-1 и крупных нежелательных сердечно-сосудистых событий (major adverse cardiovascular events, MACE) и рестеноза после коронарных вмешательств. Авторы пришли к выводу, что у пациентов с повышенным уровнем антигена PAI-1 более часто отмечались такие явления, как смерть, инфаркт миокарда, либо острое нарушение мозгового кровообращения. В это же время исследования, которые изучали активность PAI-1, не показали ассоциации с MACE. Однако работы по изучению коронарного рестеноза показали, что повышенные уровни антигена PAI-1 и его активность имели отрицательные ассоциации с развитием MACE. Авторы статьи делают заключение о том, что нужны окончательные исследования, которые покажут, является PAI-1 маркером рисков, либо потенциальной терапевтической целью для снижения количества сердечно-сосудистых осложнений [69].

Результаты влияния PAI-1 на исходы инвазивных вмешательств у пациентов с ИБС были опубликованы в 2019 году: уровень PAI-1 измерялся у 689 пациентов, которым проводилась коронароангиография. Изначально повышение уровня PAI-1 было отмечено у пациентов с диабетом 2 типа, предиабетом, курильщиков, пациентов с ожирением, гипертензией; также отмечалась взаимосвязь со временем забора крови и вариациями в проводимом вмешательстве. Авторы посчитали, что изучение уровня PAI-1 в качестве биомаркера сердечно-сосудистых заболеваний, наравне с натрий-уретическим пептидом и СРБ, является перспективным [190]. Российские ученые исследовали уровни PAI-1 у пациентов с коронарным атеросклерозом: исходно высокий уровень данного показателя, а также активности фактора фон Виллебранда явились предикторами неблагоприятных кардиальных событий после проведения коронарных вмешательств с имплантацией покрытых стентов

[16]. PAI-1 регулирует тканевый гомеостаз и процессы регенерации ран путем ингибирования плазмин-опосредованной активации ММП. Исследования, выполненные на различных моделях фиброза внутренних органов, показали, что низкие уровни PAI-1 или ингибирование его ослабляют проявления фиброза. Остается выяснить, свойственны ли кардиальным фибробластам с недостатком PAI-1 усиленные пролиферация, миграция и дифференцировка, что может помогать клеткам взаимодействовать в условиях повышенного уровня плазмينا и активности ММП [118].

То, что PAI-1 играет важную роль в фиброзе и процессах воспаления подтверждает исследование Rabcian R. и соавт (2018). Ученые выявили, что фактор роста опухоли-бета регулирует экспрессию гена PAI-1 посредством двух основных сигнальных путей, Smad-опосредованного и неклассического. Усиленная экспрессия PAI-1 ослабляла деградацию внеклеточного матрикса, при этом повышенный уровень PAI-1 был ассоциирован с угнетением протеолитических активаторов плазминогена обоих типов, что может способствовать избыточному депонированию внеклеточного матрикса и усилению воспаления в зоне повреждения [197]. Особый интерес представляет изучение эффекта ингибиторов PAI-1 на процессы ремоделирования сосудов, их влияние на ЭК и миграцию ГМК. В исследованиях Ji Y и соавт. (2016) было показано влияние ингибитора PAI-039 (типлактинин) на миграцию ЭК и ГМК. Авторы пришли к выводу, что PAI-039 способствовал выраженному ингибированию гиперплазии интимы и воспаления в эксперименте на мышах, при этом отрицательного воздействия на желательную реэндотелизацию не отмечалось. Таким образом, еще одно исследование подтвердило, что терапевтическое влияние на PAI-1 может быть перспективным в изучении и лечении стено-окклюзивных заболеваний артерий в контексте ингибирования гиперплазии неоинтимы [194].

*Эндотелиальные рецепторы протеина C (endothelial protein C receptors, EPCR) и протеин C*

Рецепторы протеина С, EPCR, экспрессируемые ЭК, структурно схожи с семейством белков 1/CD1 комплекса гистосовместимости HLA, задействованных в процессах иммунного ответа [121]. EPCR ускоряют опосредованную тромбином активацию протеина С, концентрируя его рядом с поверхностью сосудистой стенки. По сравнению с тромбомодулином, EPCR преимущественно экспрессируются в ЭК крупных сосудов, а также нейтрофилах [121]. Когда образуется активированный протеин С, он связан с EPCR в течение короткого времени до момента связывания с протеином S на поверхности тромбоцитов или ЭК, где он отщепляет свои субстраты, факторы Va/VIIIa, после чего инактивируется альфа1-антитрипсином, ингибитором протеина С и/или альфа-2 макроглобулином [123]. Помимо роли в активации протеина С, EPCR переключает субстратную специфичность активированного протеина С, аналогично тромбомодулину и тромбину. Когда активированный протеин С разобщается с EPCR, у него отмечаются антикоагулянтные свойства, при этом, транзиторно связываясь с EPCR, активированный протеин С отщепляет PAR1, инициируя внутриклеточный сигнальный путь, ассоциированный с анти-апоптотическим защитным действием [51, 52].

Некоторые литературные данные свидетельствуют о наличии ассоциации между мужским полом и повышенным уровнем sEPCR в физиологических условиях. Интерес представляют данные экспериментов, в ходе которых было выявлено, что экспрессия EPCR на поверхности ЭК не коррелировала с уровнем sEPCR в плазме в культуре клеток. ЭК с экспрессией высокого уровня мембранных рецепторов EPCR не выделяли при этом высоких уровней sEPCR по результатам изучения эфлюэнта от культуры клеток, т.е. не было выявлено какой-либо корреляции между экспрессией рецепторов на поверхности ЭК и уровнями sEPCR в крови [77]. Данное явление, вероятно, можно объяснить тем, что sEPCR могут экспрессироваться моноцитами и гладкомышечными клетками помимо ЭК [75, 146]. Точных причин и условий, способствующих отщеплению sEPCR от ЭК, в настоящее время достоверно неизвестно, однако есть работы, посвященные данной тематике. Так, Lattenist L. и соавт (2016) выявили, что

индуцируемое ферментом ADAM (сокр. от A Disintegrin And Metalloproteinase, «дизинтегрин и металлопротеиназа) отщепление рецепторов к протеину С усиливается в условиях гипергликемии [226].

Растворимые рецепторы протеина С (sEPCR) сохраняют способность связывать протеин С и активированный протеин С и ингибировать антикоагулянтные свойства активированного протеина С путем блокирования фосфолипидных взаимодействий, изменяя структуру активного домена активированного протеина С [171]. Интересно, что выброс sEPCR отмечается при сепсисе, когда он формирует комплексные структуры с эластазо-подобным протеином (протеиназа 3, PR3), которая выделяется активированными нейтрофилами [107]. Комплексы sEPCR–PR3 далее вступают в конкурентное взаимодействие с интегринами нейтрофилов CD11b/CD18 (Mac-1), что в свою очередь облегчает нейтрофильную адгезию к ЭК и экстравазацию во внесосудистое пространство в ответ на эндотоксин [108]. Кристаллизация EPCR подтверждает структурное и, вероятно, функциональное их сродство с семейством молекул CD1/МНС, которые непосредственно задействованы в иммунной системе, таким образом связывая систему тромбомодулин-протеин С-EPCR с системой врожденного иммунитета [186]. В целом, несмотря на то что полного понимания функций EPCR и sEPCR в настоящее время нет, предполагается, что подобно тромбомодулину и активированному протеину С, они могут изменять воспалительные ответы посредством сложных регуляторных механизмов. Особенности и механизмы открепления sEPCR от поверхности ЭК также активно изучаются. Известно, что на данный процесс может влиять конвертирующий ФНО-альфа фермент/ADAM17 (TACE) [220]. Потенциальное терапевтическое применение растворимых фрагментов EPCR в предотвращении воспалительных реакций исследуется в течение последних лет. Несмотря на то, что sEPCR препятствуют адгезии и экстравазации нейтрофилов, высокие уровни sEPCR могут ассоциироваться с повышенными рисками развития тромботических осложнений, в связи с чем, изучение механизмов молекулярного взаимодействия

sEPCR с лейкоцитами и сосудистыми эндотелием представляет несомненный интерес для науки [168].

Протеин С, также известный как фактор свертывания XIV, представляет собой зимоген (профермент). Активированный протеин С регулирует процессы коагуляции, воспаления, клеточной гибели, а также поддерживает сосудистую проницаемость [42, 66]. Эти функции осуществляются посредством протеолитической инактивации факторов Va и VIIIa. У пациентов с дефицитом протеина С отмечается повышенный риск развития тромбоза. Протеин С активируется, когда связывается с тромбином, активация протеина С усиливается в присутствии тромбомодулина и эндотелиальных рецепторов протеина С, таким образом, активация протеина С представляет собой действие комплекса «тромбин-тромбомодулин-эндотелиальные рецепторы протеина С». На поверхности эндотелия АПС играет важную роль в регуляции свертывания крови, воспалении и клеточной смерти. Несмотря на то, что рутинно используемые модели атеросклероза на грызунах не в полной мере подходят для изучения тромбозов ввиду резистентности к тромбообразованию, выключение протеина С у мышей, дефицитных по аполипопротеину Е, приводило к спонтанному атеротромбозу с небольшой частотой [187]. Не ясно, связан ли антитромботический эффект с антикоагулянтными свойствами АПС, либо с его цитопротективными эффектами, т.е. противовоспалительным, антиапоптотическим, цитостабилизирующим [90, 179].

Группой ученых из Венгрии в 2018 году было доложено о том, что протеин С и полиморфизмы его генов могут играть важную роль не только в развитии венозных, но и артериальных тромбозов, что требует дальнейшего изучения [241]. Guitton С и соавт. (2011) исследовали противовоспалительные эффекты АПС в сосудистых ЭК с параллельной оценкой взаимодействий между АПС и сигнальным путем фактора некроза опухоли. Авторы пришли к выводу, что АПС защищает ЭК путем ослабления экспрессии молекул САМ при воспалительных процессах. АПС участвует во взаимодействиях между рецепторами протеина С, внеклеточной сигнал-регулируемой киназой (extracellular signal-regulated kinases,

ERK), транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B, что в итоге оказывает отрицательное влияние на сигнальный путь фактора некроза опухоли [217].

*Фактор фон Виллебранда (von Willebrand factor, vWF)*

vWF представляет собой крупный мультидоменный адгезивный гликопротеин [161, 162]. vWF связывается с гликопротеинами Iba,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 тромбоцитов и субэндотелиальным коллагеном, что приводит к активации тромбоцитов, и запускает их агрегацию. Будучи носителем фактора коагуляции VIII, VWF играет важную роль в коагуляции. VWF синтезируется ЭК и мегакариоцитами, аккумулируется в виде ультракрупных мультимеров или высокомолекулярных мультимеров в тельцах Вайбеля-Паладе эндотелиоцитов или альфа-гранулах тромбоцитов [246]. Несмотря на то, что многочисленные исследования подтверждают роль VWF в гемостазе и коагуляции, разница между VWF эндотелиального и тромбоцитарного происхождения в патогенезе тромбоза и тромбоз-ассоциированных заболеваний остается неясной [6]. Dhanesha и соавт. изучали роль эндотелиального и тромбоцитарного VWF *in vivo* [99]. Используя трансплантацию костного мозга, они смогли создать мышей, которые экспрессировали VWF в гемоцитах, но не ЭК, и мышей, у которых VWF экспрессировался наоборот лишь ЭК. Результаты показали, что критическую роль в развитии индуцированного FeCl<sub>3</sub> тромбоза играл эндотелиальный VWF. Таким образом, именно эндотелиальный, но не тромбоцитарный VWF способствовал тромбообразованию, что предполагает возможность подавления экспрессии VWF в ЭК с терапевтической целью [100].

Помимо своей ключевой роли в системе свертывания фактор фон Виллебранда имеет важное значение в регуляции сосудистого воспаления. VWF и его молекулярный регулятор ADAMTS13 задействованы в процессах воспаления и иммунотромбоза, активации и миграции лейкоцитов, сосудистой проницаемости, ишемии и реперфузии, активации комплемента, а также программируемой клеточной гибели, сопровождающийся выбросом клетками нейтрофилами внеклеточной нейтрофильной ловушки (нетоз) [81]. VWF и ADAMTS13 участвуют в патогенезе атеротромбоза и атеросклероза, за счет

усиления рекрутинга макрофагов и нейтрофилов в зону сосудистого воспаления. VWF изучается в качестве потенциального прогностического маркера сердечно-сосудистых, метаболических и воспалительных заболеваний. Т.о. VWF наряду с PAI-1 может служить потенциальной мишенью для разработки фармакологических методов борьбы с сердечно-сосудистыми осложнениями [237].

Авторы работы по изучению периферического атеросклероза в 2019 году опубликовали данные, где описали повышение уровня vWF у пациентов с ЗПА, особенно у пациентов в группе рестеноза. Этот показатель был выбран в качестве независимого предиктора развития интракоронарного тромбоза у пациентов с острым ИМ. Несмотря на то, что предыдущие исследования не находили четкой ассоциации между vWF и рестенозом у пациентов с ЗПА; в данном исследовании авторы не исключают, что повышенные уровни vWF у пациентов с ЗПА могут быть показателями эндотелиальной дисфункции и влиять на развитие рестеноза. Повышенное образование тромбина и неблагоприятные свойства фибрина в составе тромба отмечались у пациентов с КИНК, несмотря на проведение оптимального эндоваскулярного и фармакологического лечения [227].

#### *Фактор свертывания VIII (FVIII)*

Прокофактор VIII или антигемофильный фактор, циркулирует в плазме в виде комплекса с фактором фон Виллебранда [148]. Фактор VIII активируется путем взаимодействия с альфа-тромбином с образованием кофактора фактора VIIIa. Далее уже активированный фактор VIII формирует комплекс с сериновой протеазой – фактором IXa, ионами Ca<sup>2+</sup>, что приводит к образованию «внутреннего» фактора – теназы. Фактор VIII на 40% гомологичен фактору V.

Y. Kamikubo и соавт. (2017) выявили, что тканевой фактор в составе внешнего пути свертывания может селективно активировать антигемофильный фактор, фактор VIII, и в целом внутренний путь свертывания вне зависимости от активности тромбина. Так, в экспериментальной модели на грызунах авторы работы установили, что зависящая от тканевого фактора активация фактора VIII задает определенный порог формирования тромба посредством контактной

активации фактора IX. В условиях *in vitro* активированный фактор Ха, стабильно ассоциированный с комплексом тканевой фактор-фактор VIIa, активирует фактор VIII, но не V. Кроме того, образующийся фактор Ха может транзиторно избежать инактивации ингибитором пути тканевого фактора и предпочитительно активирует фактор VIII. Таким образом, тканевой фактор синергичным образом способствует фактор IXa-зависимой генерации тромбина в независимости от активации тромбином кофакторов. Соответственно, авторы заявили о существовании ранее неизвестного пути свертывания, инициируемого тканевым фактором и приводящим к непосредственному образованию теназного комплекса факторов VIIa-IXa. Указанный путь может срабатывать перед запуском тромбин-зависимых путей свертывания [233].

#### *Оксид азота (II) NO*

Оксид азота является интегральным маркером дисфункции эндотелия, обладающий плеiotропным действием, в том числе активно участвующим в процессах коагуляции и агрегации [7]. Продуцируемый эндотелием оксид азота может проникать через мембрану тромбоцитов и связываться с его рецептором в виде гуанилциклазы, аналогично рецепторам в ГМК. Связывание оксида азота со своим рецептором приводит к повышению циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), что в свою очередь препятствует повышению внутриклеточной концентрации ионов кальция и активации интегринов, что в итоге приводит к угнетению агрегации тромбоцитов [252]. Изменение в продукции эндогенного оксида азота может служить механизмом, посредством которого регулируется процесс тромбообразования. Непосредственно тромб образуется агрегацией тромбоцитов путем связывания бивалентного фибриногена с гликопротеином IIb/IIIa. Выделяемый тромбоцитами и ЭК оксид азота предотвращает адгезию тромбоцитов к сосудистой стенке, таким образом, препятствуя распространению тромбообразования [183]. Оксид азота ингибирует функцию тромбоцитов путем стимуляции растворимой гуанилил-циклазы и усиления выработки цГМФ, что в свою очередь воздействует на цГМФ-зависимый киназный путь, и в итоге приводит к снижению способности фибриногена связываться с гликопротеином

Пб/Ша и изменению опосредованных фосфолипазами А2- и С реакций, в том числе за счет ингибирования увеличения количества свободных ионов кальция в цитозоле тромбоцитов и ингибирования тромбоцитарной фосфоинозитид-3-киназы [120].

Оксид азота II (NO) является ключевым эндогенным вазодилататором, который продуцируется ЭК. Современные исследования сосредоточены на поиске генетических и эпигенетических изменений в гене эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) как основного фермента, участвующего в синтезе оксида азота, которые могут быть вовлечены в патогенез развития артериальных тромбозов. Один из недавних систематических обзоров показал, что наиболее часто встречаемые полиморфизмы генов eNOS, ассоциированные с повышенными рисками артериальных тромбозов, это G894T, -786T/C и 4b/4a; при этом основное внимание авторов сфокусировано на влиянии метиляции ДНК, гистон/негистоновых модификаций и микроРНК, в частности miR-195 и miR-582, в регуляции синтеза оксида азота в контексте артериальных тромбозов [97].

Важная роль оксида азота в тромбообразовании подтверждается экспериментальными исследованиями на животных. Urmacis RK и соавт. (2011) показали, что индуцибельная NO-синтаза (inducible nitric oxide synthase, iNOS) обладает защитным действием при моделировании тромбоза на мышцах. Несмотря на то, что iNOS оказывает неблагоприятные эффекты в процессе атерогенеза, физиологические уровни iNOS могут оказывать положительное влияние в отношении развития тромботических осложнений [152].

Активно изучаются процессы, связанные с выработкой оксида азота в реконструктивной артериальной хирургии. Koki Tabata и соавт. (2017) опубликовали работу, в ходе которой изучали функцию оксида азота и эндотелиального гиперполяризующего фактора в артериальных графтах в эксперименте на сонных артериях кролика с целью уточнения, какие образом вышеуказанные параметры изменяются при инвазивных вмешательствах с учетом того, что венозные трансплантаты претерпевают существенные изменения. Авторы предположили, что кальций-зависимая выработка оксида азота

эндотелиоцитами позволяет компенсировать потерю функции эндотелий-зависимой гиперполяризации ГМК и минимизировать явления гиперплазии интимы, вызванной оперативным вмешательством в случае использования аутологичного артериального трансплантата [105].

Ряд ученых сообщает о том, что оксид азота обладает защитным действием в отношении развития гиперплазии интимы; это послужило основанием к поиску различных путей усиления продукции NO [39]. Несмотря на то, что патогенез неоинтимальной гиперплазии сложный и многокомпонентный, сигнальный путь, ассоциированный с оксидом азота, играет важную роль. В течение более чем 10 лет изучается роль нарушения сигнального пути аргинин/NO-синтаза/оксид азота в развитии гиперплазии интимы. Более того, не исключается возможное положительное влияние не только оксида азота, образованного при помощи NO-синтаз, но и продуцентов нитрата и нитрита посредством NOS-независимых сигнальных путей [71].

Изменения в обмене оксида азота изучаются в эндоваскулярной хирургии. Согласно литературным данным такие факторы, как дизайн стента, особенности раскрытия и повреждение эндотелия ассоциированы с рестенозом и тромбозом зоны стентирования. Liu X. и соавт. (2015) предположили, что особенности конструкции стента, его доставки и раскрытия, повреждения эндотелия оказывают влияние на уровень оксида азота. В исследовании изучалось распределение оксида азота в сосуде в зависимости от толщины ячеек стента, особенностей имплантации и геометрии стентов. Был сделан вывод о том, что снижение площади покрытия эндотелия, крупные ячейки стента, а также неоптимальное его раскрытие были ассоциированы с пониженной локальной концентрацией оксида азота [98]. Allagnat F. и соавт. (2016) показали в экспериментальных моделях, что дефицит оксида азота является важным аспектом сосудистого воспаления, пролиферации ГМК и развития гиперплазии интимы в условиях гипертензии [182]. Продолжающиеся исследования в ангиологии и кардиологии доказывают важную роль оксида азота в развитии

сердечно-сосудистых осложнений. Современным направлением в изучении ЭД, в том числе её гемостатического звена, являются *in vitro* исследования.

Таким образом, показатели гемостатического звена дисфункции эндотелия, включая фактор коагуляции 8, фактор фон Виллебранда, ингибитор активации плазминогена-1, эндотелиальные рецепторы протеина С и оксид азота II (NO) как интегральный показатель активности эндотелиоцитов, представляют научный интерес при изучении патогенезе атеросклероза и его осложнений.

## **1.6. Изучение гемостатического звена эндотелиальной дисфункции *in vitro***

### **1.6.1. Характеристика основных клеточных линий эндотелиальных клеток для *in vitro* исследований**

*In vitro* исследования, широко применяемые в сфере биологии, в настоящее время представляют собой несомненный интерес как с точки зрения изучения различных заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых, так и с позиции разработки и внедрения новых фармакологических подходов и медицинских изделий с целью коррекции патологических состояний, в патогенезе которых задействована эндотелиальная дисфункция. Основными объектами изучения для потенциального применения в клинической терапии являются прогениторные эндотелиальные ПЭК, клетки HUVEC и мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (ММСК). Кроме того, изучаются возможности активного изучения стволовых клеток жировой ткани и плюрипотентных стволовых клеток, имеющих способность дифференцироваться в клетки эндотелия [31].

Наиболее популярным объектом для *in vitro* изучения различных сосудистых заболеваний и патологических состояний являются эндотелиальные клетки пупочной вены человека – клетки HUVEC (human umbilical vein endothelial cells). Клетки HUVEC имеют ряд преимуществ: это удобство выделения, относительно низкая себестоимость, легкое культивирование в лабораторных условиях. HUVEC были впервые изолированы и культивированы *in vitro* в 1973 году Jaffe E. и коллегами [88]. Другие активно используемые клеточные линии – эндотелиальные клетки большой подкожной вены человека (human saphenous vein

endothelial cells, HSVEC), микрососудистые эндотелиальные клетки сердца человека (human heart microvascular endothelial cells, HHMEC), гладкомышечные клетки артерий человека (human arterial smooth muscle cells, HASMC), эндотелиальные прогениторные клетки, эндотелиальные клетки артерий человека (human arterial endothelial cells, HUAEC), эндотелиальные клетки микрососудов легких человека (human pulmonary microvascular endothelial cells, HUPEC).

Кроме того, при изучении ангиогенеза могут использоваться такие клеточные линии как HMEC-1 (human mammary epithelial cell), HDMEC, иммортализованные геном обратной транскриптазы теломеразы человека (human telomerase reverse transcriptase - microendothelial cells of human skin hTERT-HDMEC) [104]. Кроме того, могут применяться клеточные линии, призванные обеспечить оптимальные условия для специфичных исследований *in vitro*, например, клеточные линии от пациентов с саркомой Капоши AIDS-KSI (AIDS-derived Kaposi's Sarcoma), используемая для изучения заболеваний в сфере неврологии и нейроангиологии линия SV-HCEC (Human Cerebral Endothelial Cells) [91].

В культуральной работе *in vitro* используются два типа клеточных линий: 1) линии с лимитированным числом пассажей; 2) «иммортализованные», которым свойственен стабильный фенотип и спектр секретируемых биологически активных вещества в течение практически неограниченного числа пассажей. Помимо того в исследованиях ЭД *in vitro* исследованиях используются гибридные линии ЭК, например, EA.hy926, разработанная путем гибридизации первичной эндотелиальной линии HUVEC и клеток линии аденокарциномы легкого человека A549 [125]. Другими клеточными линиями, полученными от HUVEC, являются IVEC (*in vitro* expression cloning) и hTERT-HUVEC (human telomerase reverse transcriptase HUVEC) [104].

Большое количество исследований посвящено изучению гемостаза и коагуляции в условиях *in vitro*.

### 1.6.2. *In vitro* изучение гемостатического звена дисфункции эндотелия

Условия *in vitro* позволяют исследовать ЭД с воссозданием условий, максимально приближенным к физиологичным. Так, коллективом авторов во главе с Moriguchi T. В 2013 году оценена активность факторов коагуляции в условиях механическо-химической стимуляции. В лабораторных условиях на фоне создания ламинарного и пульсирующего потоков жидкости, при достижении 100%- и 50%-й конfluenceности в культуру клеток добавляли тромбин. Исследование показало, что эндотелиоцитам, которым создавали условия нарушенного потока жидкости, после добавления тромбина была свойственна более активная экспрессия тканевого фактора за счет активации фосфорилирования молекул адгезии молекул PECAM-1, что может в итоге способствовать более выраженному тромбообразованию [176].

Большое количество работ в предыдущую декаду было посвящено изучению эффектов тромбина в условиях *in vitro*. Wang B. и соавт. (2010) оценивали 24-часовое воздействие тромбина в концентрации 10 Ед/мл в культуре HUASMC. В результате после 24-х часового воздействия тромбином усиливалась пролиферация гладкомышечных клеток, а также экспрессия м-РНК VEGF. В то же время такое воздействие ослабляло опосредованный эндотелиальными клетками рост сосудистых трубочек и рост новых сосудистых структур [149]. Ku S.K. и соавт. (2013) оценивали влияние тромбина на отдельные сигнальные молекулы, включая NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  интерлейкин IL-6. В ходе исследования ученые пришли к заключению, что тромбин в низких концентрациях (25 – 75 пМ) ингибирует полифосфат индуцированную активацию ядерного транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, продукцию TNF- $\alpha$  и интерлейкина IL-6 и может обладать потенциальным терапевтическим потенциалом при различных системных воспалительных заболеваниях [159].

Процессы тромбообразования в условиях *in vitro* исследуются как в контексте общих закономерностей процессов гемостаза и коагуляции, так и в отношении отдельных веществ и материалов. Так, Zeng Y. и соавт. (2016) при изучении антитромботических и антиатеросклеротических эффектов глипикана-1

в культуре HUVEC пришли к выводу, что вышеупомянутое вещество опосредует активацию eNOS, при стрессовом напряжении включает защиту функции эндотелия от изменённого потока и усиливает чувствительность эндотелиальных клеток к ламинарному потоку. Таким образом, возможна антитромботическая и антиатеросклеротическая роль глипикана-1 [259].

В рамках изучения процессов тромбообразования изучаются эффекты различных фармакологических агентов на эндотелиоциты. Krychtiuk K.A. и соавт. (2017) изучали эффекты кардиотропного препарата левосимендана на экспрессию ингибитора активатора плазминогена и тканевого фактора в эндотелиальных клетках. Авторы пришли к выводу, что указанный препарат был способен регулировать экспрессию как тканевого фактора, так и PAI-1 в активированных эндотелиальных клетках человека, снижая их активность; этот факт может объяснять положительные эффекты лекарственных средств в коррекции реперфузионных повреждений [65]. Veher T. и соавт. (2016) при изучении процессов тромбообразования в культуре HUVEC пришли к выводу, что эзетимиб ослабляет активацию тромбоцитов: отмечается значительное снижение поверхностной экспрессии CD62P (P-селектин) и CD40L (лиганд, активация которого является одним из механизмов, вызывающих воспаление и тромбообразование); снижает уровень растворимого IL-6 [113].

Интерес представляют *in vitro* исследования, посвященные сигнальным путям и механизмам действия оксида азота (II). Magnifico M.C. и соавт. (2017) в культуре HUVEC изучали влияние iNOS и биодоступности оксида азота при инкубации клеток с предварительно окисленными липопротеидами очень низкой плотности (ЛПОНП); 24-х часовая инкубация с предварительно окисленными ЛПОНП активирует индуцибельную NO-синтазу (iNOS), одновременно снижает экспрессию мРНК эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), увеличивает концентрацию конечных метаболитов оксида азота и АФК, снижает биодоступность оксида азота, отрицательно влияет на функцию митохондрий [249]. Lee H.Y. и соавт. (2017) изучали сигнальный путь eNOS в стареющих эндотелиальных клетках. Повышенная активность НАДФ-оксидазы,

дисульфидизомеразы в стареющих эндотелиальных клетках приводит к окислительно-восстановительному дисбалансу, снижению синтеза eNOS и оксида азота [185]. Singh N. и соавт. (2018) изучали эффекты наночастиц на основе марганца-Mn3O4 в культуре эндотелиоцитов HUVEC и HPMEC. Используемые в исследовании наночастицы имитировали влияние трех ключевых клеточных антиоксидантных ферментов - супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы, при их использовании не снижался уровень оксида азота [166].

### 1.6.3. *In vitro* изучение процессов рестеноза

Ряд работ посвящен *in vitro* изучению процессов рестеноза при ИБС. Так, рестеноз встречается в 10-30% случаев после эндопротезирования коронарных артерий. Считается, что ионы никеля ассоциируются с данным патологическим процессом. J. Wang et al. (2018) исследовали механизмы рестеноза при имплантации стентов с высоким содержанием азота и пониженным содержанием никеля в сравнении со стентами SUS316L с более высоким содержанием никеля. Результаты *in vitro* исследований показали, что пролиферация клеток HUVEC была ниже, выброс клетками интерлейкина IL-6 также был снижен на 1 и 3 сутки в культуре клеток, подверженных воздействию стентов с пониженным содержанием никеля. Результаты *in vitro* и *in vivo* экспериментальных исследований по мнению авторов могут способствовать внедрению стентов новых поколений, которые будут ассоциированы со снижением случаев рестеноза [150].

Стенты с лекарственным покрытием широко используются в наши дни для снижения риска развития рестеноза в сравнении с голометаллическими стентами. Однако внедрение покрытых стентов сопряжено с риском позднего тромбоза ввиду отсроченной ре-эндотелизации, в то время как эндотелизация является важным процессом, ассоциированным как с рестенозом, так и тромбозом внутри стента. 316L является традиционным материалом для изготовления стента, однако отсутствие у него биоактивности связано с высоким риском развитием рестеноза. Авторы во главе с S. Jin (2017) изучали влияние как голометаллических стентов

из 316L, стентов с лекарственным покрытием, так и авторских стентов, где наряду с материалом 316L использовалась медь. Ученые по итогам *in vitro* эксперимента на клетках HUVEC пришли к выводу, что стенты с добавкой в виде меди способствовали лучшей пролиферации клеток, улучшали экспрессию генов, ассоциированных с процессами ангиогенеза, а также повышали способность эндотелиоцитов к формированию трубочек в условиях *in vitro* [110].

Wiedemanna E. и соавт. (2017) изучали процессы эндотелизации на клеточных линиях HUVEC и HUAEC путем исследования роли эфрина-A1 в механизмах реэндотелиализации. Экспрессия эфрина-A1 регулируется клеточной плотностью и является решающим фактором, определяющим пролиферацию эндотелия. Было выявлено, что эфрин-A1 активно участвовал в миграции эндотелиоцитов, влияя на такие ключевые аспекты как скорость, направление миграции и поляризация клеток, что подтвердило важную роль эфрина-A1 в реэндотелиализации [223].

Помимо изучения эффектов материала стентов в условиях *in vitro* активно исследуются процессы эндотелиального восстановления при ассоциированных с различными видами вмешательств повреждениях сосудистой стенки в контексте профилактики рестеноза и тромбоза. Так, Hu Hui et al. (2019) изучали экзомы, выделенные из клеток HUVEC и прогениторных эндотелиальных клеток. В условиях *in vitro* ученые исследовали эффекты вышеуказанных экзосом на миграцию и пролиферацию эндотелиоцитов. Исследователи пришли к выводу, что выделенные из HUVEC и EPC экзосомы, преимущественно последние, способствуют процессам репарации сосудистой стенки [80].

Кроме того, помимо эндотелизации, активно исследуются процессы избыточной пролиферации гладкомышечных клеток (ГМК) в патогенезе рестеноза после имплантации стентов. Имеющиеся в настоящее время методики визуализации не способны адекватно оценить степень ре-эндотелизации, в то время как имеются данные о том, что непосредственно сам стент может быть использован как электрод, и в сочетании со спектроскопическими техниками оценки электрического сопротивления, возможен мониторинг состояния стенки

сосуда после имплантации стента. I. Holland et al. (2018) в своей экспериментальной работе изучали различные виды эндотелиальных клеток (эндотелиоциты легочной артерии свиней, HUVEC, ГМК коронарных артерий свиней) с использованием импедансной спектроскопии. Анализ электрического сопротивления выявил различный профиль, характерный для тех или иных клеточных линий, что может способствовать неинвазивной оценке ответа сосудистой стенки на установку стента [142].

Помимо этого, существуют *in vitro* модели для изучения процессов взаимодействия непосредственно крови и эндотелия. Коллектив авторов во главе с S. Nordling (2014) изучали активацию процессов коагуляции путем инкубирования различных объемов цельной крови в присутствии либо отсутствии HUVEC. Большие объемы цельной крови были ассоциированы с более активным образованием комплексов тромбин-антитромбин, при этом присутствие клеток HUVEC привело к снижению активации коагуляции. Более того, ученые исследовали взаимодействие лейкоцитов с HUVEC, стимулированных фактором некроза опухоли TNF $\alpha$  и выявили, что присутствие CD16<sup>+</sup> клеток было существенно выше при стимуляции TNF $\alpha$  в сравнении с нестимулированными клетками после контакта с цельной кровью. Авторы пришли к выводу, что *in vitro* оценка взаимодействия цельной крови и эндотелия может иметь важную роль в изучении сердечно-сосудистой патологии [184].

#### **1.6.4. Микрожидкостные и пульсатильные устройства для *in vitro* изучения тромбозов**

*In vitro* изучение процессов коагуляции и тромбообразования занимает все более важную роль в сравнении с исторически сложившимися *in vivo* моделями на животных. Так, в настоящее время имеются новые методики для создания *in vitro* моделей тромбоза, как правило, сочетающихся с микрожидкостными устройствами, объединенных под общим названием системы «тромбоза на чипе», что позволяет в лабораторных условиях воспроизвести данный вид сосудистой патологии вне живого организма. Подобные платформы с применением

клеточных линий, полученных от человека, позволяют сохранить важные характеристики нативного тромбоза: сосудистые структуры и внеклеточный матрикс, клеточные элементы. Все это в итоге позволяет на *in vitro* моделях изучать большой кластер сосудистых заболеваний, а также разрабатывать индивидуальные подходы к лечению. Важная роль здесь отдается мягкой литографии и 3D-биопринтингу. Подобные модели имеют в своем составе гидрогелевый матрикс, имитирующий внеклеточный матрикс биологических тканей, эндотелизированные микроканалы, имитирующие кровеносные сосуды, а также возможность обеспечить ток цельной крови в сочетании с заданными специфичными агентами для индукции агрегации тромбоцитов *in situ* или цельной крови непосредственно для индукции коагуляции в микроканалах чипов. Несмотря на то, что данные виды микрочипов находятся в настоящее время на стадии разработки и оптимизации, Y. Zhang et al. (2017) полагают, что дальнейшее развитие таких моделей будет способствовать внедрению принципов персонализированного скрининга для выбора метода вмешательств при лечении тромбозов на основе специфичных для пациента данных [260].

Помимо вышеуказанных систем *in vitro* изучения тромбозов, коагуляция активно изучается с применением различных методик, обеспечивающих пульсатильный кровоток, представляющих собой специализированные камеры, осуществляющих заданный поток жидкостей. Так, существует опыт изучения тромбообразования на примере взаимодействия эритроцитов и эндотелия на примере клеточной линии HUVEC. J.K. Hansen (2017) в своей работе исследовала гипотезу о непосредственном взаимодействии красных кровяных клеток с поврежденным хлоридом железа эндотелием в условиях, симулирующих как венозный, так и артериальный кровоток. В ходе работы было выявлено, что подобное взаимодействие между эритроцитами и эндотелием затрагивает и фактор фон Виллебранда, о чем не было известно ранее. Кроме того, автор исследовала тромбоцитарный  $H_2O_2$ . Тромбоциты, как известно, играют важную роль в гемостазе и тромбозе, особенно посредством взаимодействия с коллагеном в субэндотелиальном матриксе при наличии сосудистого повреждения;

тромбоциты становятся гиперактивными в данных протромботических условиях, что приводит к их агрегации и в итоге к тромбозу. В ходе исследования было показано, что при повышенных уровнях  $H_2O_2$  как следствии генетической мутации, способствовавшей делеции глутатион пероксидазы 1, тромбоцитам была свойственна более активная агрегация [132].

Согласно проанализированным данным литературы, клеточная линия HUVEC наиболее часто используется в *in vitro* изучении патологических состояний, компонентом которых является эндотелиальная дисфункция. HUVEC используются для изучения нормальных физиологических процессов, протекающих в эндотелии, моделирования эндотелиальной дисфункции, фармисследований, подразумевающих изучение гемостаза, ангиогенеза, воспаления. Эти первичные неиммортиализованные клетки человеческого происхождения относительно легко изолируются из пуповинной вены человека без контаминации другими типами клеток. Работая с данной культурой клеток, относительно легко достигнуть требуемую конfluence (около 80%) и поддержания клеточной линии до оптимального пассажа (3й - 5й пассажи). При проведении фундаментальных исследований эндотелиальные клетки пуповины человека часто являются модельной системой выбора для биомедицинской промышленности и доклинических анализов.

*In vitro* исследования, выделение первичных эндотелиальных клеток и изучение их жизнедеятельности в различных условиях инкубации может играть важную роль в прикладной медицине, в частности ангиологии, кардиологии, сердечно-сосудистой хирургии.

### **Резюме**

Сосудистая эндотелиальная патология является центральной для целого ряда заболеваний, таких как атеросклероз, сахарный диабет, хроническое отторжение аллотрансплантата и многие другие.

Эндотелий играет важную роль, представляя собой структурный барьер кровотоку, регулируя сосудистый тонус, проницаемость, взаимодействуя с

различными типами клеток, включая ГМК, тромбоциты, лейкоциты, участвуя в процессах ангиогенеза, воспаления и иммунного ответа. Морфофункциональные нарушения сосудистого эндотелия имеют существенные патофизиологические последствия. Эндотелиальная дисфункция относится к глубоким изменениям эндотелия, способствующим развитию и клиническому проявлению сосудистых заболеваний.

Механизм поддержания атромбогенности эндотелием подразумевает выделение тромбомодулина с последующей активацией протеина С, экспрессию эндотелием гепарина и дерматана, ингибитора тканевого фактора, продукцию активатора тканевого плазминогена и активатора плазминогена урокиназного типа; кроме того, эндотелий синтезирует интерлейкин-10, простациклин и оксид азота, которые способствуют вазодилатации и ингибированию лейкоцитарной агрессии [253]. Ряд субстанций, продуцируемых эндотелием, обладают вазоконстрикторным (эндотелин-1) и протромбогенным действием, включая фактор фон Виллебранда, тканевой фактор, PAI-1. Важно отметить, что процессы воспаления и тромбообразования тесно связаны друг с другом. При воспалении отмечается повышенная активность тканевого фактора, фибриногена, фосфатидилсерина и PAI-1, в то время как количество тромбомодулина и, следовательно, активность протеина С, снижены [155, 255]. Потеря нормальной структуры и функции эндотелия приводит к развитию сосудистого воспаления, тромбоза либо развитию хронических изменений, ассоциированных с атеросклерозом, рестенозом, диабетом, ожирением.

*In vitro* и *in vivo* исследования эндотелиальной дисфункции в целом и её гемостатического звена в частности призваны получить новые данные в отношении фундаментальных и прикладных аспектов периферического атеросклероза и его осложнений.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационное исследование разделено на две части: экспериментальную и клиническую. Первая представляет собой *in vitro* изучение маркеров гемостатического звена дисфункции эндотелия на первичной культуре HUVEC, вторая - среди пациентов с ЗПА атеросклеротической этиологии.

### 2.1. Материалы и методы экспериментальной части исследования

Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол № 5 от 29.01.2019).

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 изучались активность фактора фон Виллебранда, фактора свертывания VIII - FVIII, уровень ингибитора активатора плазминогена 1, растворимых рецепторов к протеину С, а также уровень метаболитов оксида азота II (суммарную концентрацию нитратов и нитритов) как ключевых гемостатических маркеров дисфункции эндотелия. Исследование проводилось при инкубировании культуры клеток HUVEC с эндотелиальной ростовой средой и воздействии ключевых искусственных материалов, используемых в реконструктивной артериальной хирургии, включая политетрафторэтилен – ПТФЭ, полиэтилентерефталат – ПЭТ (дакрон), никелид титана – нитинол, аналогично применявшимся материалам для артериальных реконструкций в рамках клинической части диссертационного исследования.

#### 2.1.1. Выделение первичных культур HUVEC

Для выполнения данного эксперимента в рамках диссертационного исследования использовались:

- лабораторный пластик, включая флаконы культуральные 25 см<sup>2</sup> (Corning, каталожный номер 430639), 75см<sup>2</sup> (Corning, каталожный номер 430725), планшет 12-луночный (Corning каталожный номер 3512) с мембранными вставками Transwell (Corning, 6,5 мм, область роста 0,33 см<sup>2</sup>, поры 0,4 мкм каталожный номер 3413);

- питательная среда для эндотелиоцитов ECGM (Cell Applications Sigma/Aldrich, каталожный номер 211-500);

- желатин для покрытия планшетом 12-луночных (Stemcell Technologies, каталожный номер 07903);

- коллагеназа 1 типа (ThermoFisher, каталожный номер 17100017);

- трипсин-ЭДТА 0,25% (StemCell Technologies, каталожный номер 07901);

- буфер фосфатный Дульбекко DPBS (Gibco, каталожный номер 14190086);

- антибиотик пенициллин-стрептомицин 1% (Панэко, каталожный номер A063);

- набор антител для выполнения иммуноцитохимического исследования, включая вторичные антитела Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594 ab150080) и первичные антитела Anti-CD31 antibody, кроличьи поликлональные (Abcam ab28364) и антитела Anti-Von Willebrand Factor, кроличьи поликлональные (Abcam ab6994);

- лабораторное оборудование, включая ламинарный шкаф II класса защиты Mars 1200 ScanLaf (Дания), CO<sub>2</sub> инкубатор WS-180CS World Science (Корея), инвертированный лабораторный микроскоп CKX41 Olympus (США), автоматизированный счетчик количества и жизнеспособности клеток Countless (ThermoFisher, США).

### *Протокол эксперимента*

Пуповины забирались от здоровых женщин-доноров, подписавших информированное согласие. Биоматериал был получен после физиологических родов или операции кесарева сечения. Пуповина помещалась в стерильный транспортный контейнер с культуральной средой и 1% пенициллином-

стрептомицином. После поступления материала в Лабораторию клеточных технологий пуповина тщательно отмывалась от крови, обильно обрабатывалась 70% этиловым спиртом во избежание контаминации микроорганизмами и слегка массировалась для удаления сгустков из сосудов. Далее пуповинная вена промывалась от тромбов раствором DPBS, после чего вена заполнялась 0,1% раствором коллагеназы, пережималась зажимами и помещалась на 20 минут в CO<sub>2</sub>-инкубатор при 37 градусах С. После извлечения из CO<sub>2</sub> инкубатора содержимое пуповины помещалось в центрифужную пробирку с параллельным массированием пуповины и введением в просвет вены дополнительного количества DPBS. После центрифугирования в течение 5 мин при 500G супернатант удалялся, клеточный осадок ресуспендировался в DPBS и центрифугировался повторно в течение 5 мин при 500G для окончательного удаления коллагеназы, после чего супернатант вновь удалялся.

Далее полученный клеточный осадок ресуспендировался в культуральной ростовой среде ECGM и бережно гомогенизировался путем пипетирования. Далее клетки засеивались в культуральные флаконы 25 см<sup>2</sup>, предварительно обработанные 0,1% желатином, после чего клетки на 24 часа помещались в инкубатор при 37 градусах С и 5% CO<sub>2</sub>. Через сутки производилась смена среды и микроскопия клеток. Далее смена питательной среды осуществлялась 1 раз в 48 часов. По достижении 80-90 % плотности монослоя (конфлюэнтности) (рисунок 3) клетки после подсчитывания на автоматическом счетчике количества и жизнеспособности пересеивались на лабораторный пластик большей площади для наращивания количества с помощью 0,25% трипсина-ЭДТА.

#### *Подтверждение принадлежности полученных клеток к эндотелиальным*

Подтверждение принадлежности полученных клеток к эндотелиальным проводилась методом иммуноцитохимии с использованием антител к CD31 (рисунок 4) и vWF (рисунок 5) согласно протоколам, изложенным в инструкции производителей реагентов (Abcam, США).

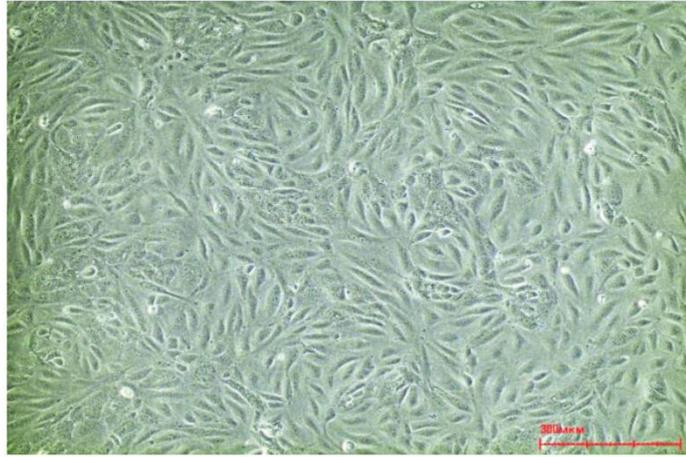


Рисунок 3 – Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) *in vitro*.  
Ув. X 200

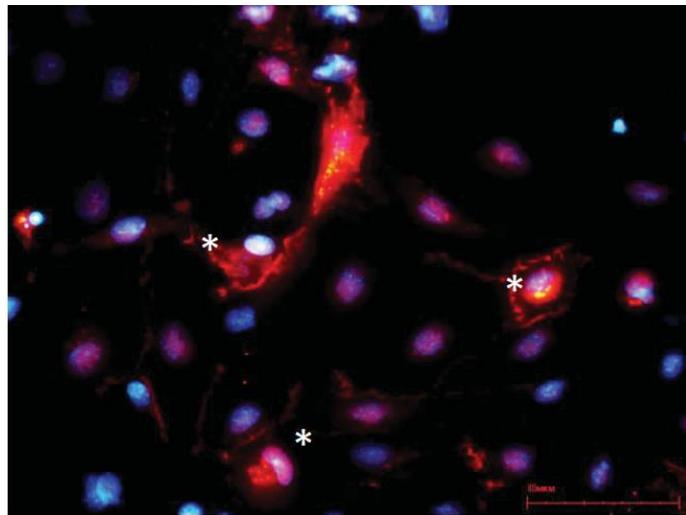


Рисунок 4 – CD31 на мембране культуры первичных эндотелиоцитов HUVEC (\*).  
Иммунофлюоресценция. Ядра окрашены DAPI. Ув. X 400

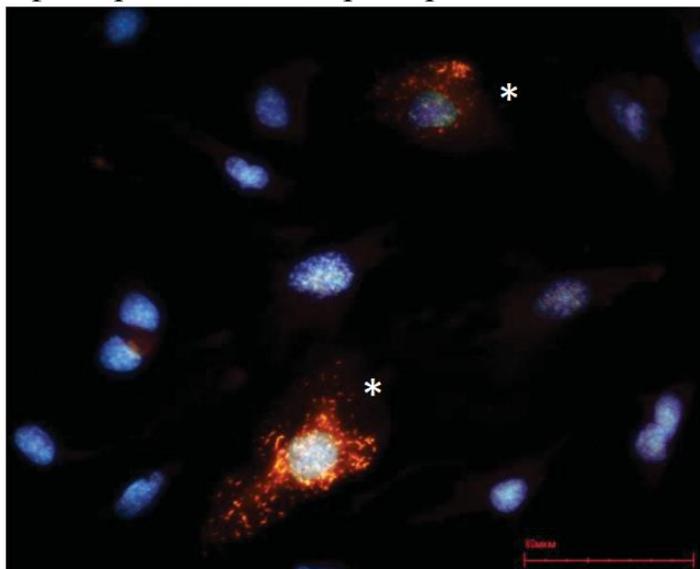


Рисунок 5 – Фактор фон Виллебранда (vWF) в цитоплазме культуры первичных  
эндотелиоцитов HUVEC (\*). Иммунофлюоресценция. Ядра окрашены DAPI.  
Ув. X 400

## 2.1.2. Изучение метаболической (митохондриальной) активности первичной культуры HUVEC при воздействии материалов для артериальных реконструктивных вмешательств

В рамках экспериментальной части исследования проведено *in vitro* изучение метаболической (митохондриальной) активности первичной культуры HUVEC при воздействии ключевых материалов, используемых в артериальной реконструктивной хирургии, включая ПТФЭ, ПЭТ (дакрон) и нитинол. В качестве методики избран MTS-тест, широко используемый в лабораторных исследованиях с привлечением клеточных технологий для оценки цитотоксичности.

MTS-тест основывается на угнетении активности митохондриальных дегидрогеназ в присутствии исследуемого в рамках эксперимента соединения и способности окислять субстрат MTS, химически представляющий собой 3-(4,5-диметил-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолиум в присутствии феназинметосульфата (PMS), который играет роль электрон-связывающего реагента. MTS восстанавливается клетками до продукта формазана (рисунок 6), обладающего определенным окрашиванием, что может быть измерено фотокolorометрически [2].

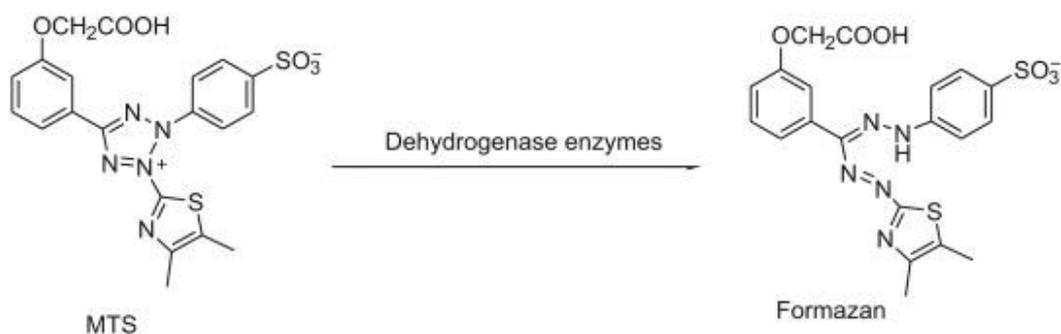


Рисунок 6 – Схема восстановления MTS до формазана под воздействием дегидрогеназ

Для изучения цитотоксичности материалов (метаболической (митохондриальной) активности первичной культуры HUVEC при их воздействии) в рамках диссертационного исследования использовались:

- линия первичной культуры HUVEC, пассаж 3;

- тестируемые объекты (ПТФЭ, ПЭТ (дакрон), нитинол);
- планшет 12-луночный (Corning каталожный номер 3512) с мембранными вставками Transwell (Corning, 6,5 мм, область роста 0,33 см<sup>2</sup>, поры 0,4 мкм каталожный номер 3413);
- планшет 96-луночный (Corning каталожный номер 3599);
- набор реактивов CellTiter 96® AQueous MTS Reagent (Promega, каталожный номер G111) и PMS (каталожный номер #S299116.0005);
- питательная среда для эндотелиоцитов HUVEC ECGM (Cell Applications Sigma/Aldrich каталожный номер 211-500);
- желатин для покрытия планшетом 12-луночных (Stemcell Technologies каталожный номер 07903);
- прибор для оценки оптической плотности – анализатор Stat Fax 3200 (microplate reader) Awareness technology Inc. Palm City Fl (США).

#### *Протокол эксперимента*

Количество засеиваемых клеток первичной культуры HUVEC в одну лунку 12-луночного планшета составило  $0,1 \times 10^6$ ; эксперимент выполнялся трижды с разными первичными линиями HUVEC для исключения погрешностей измерения; в каждом эксперименте засеивались 3 ряда лунок 12-луночного планшета с аналогичным распределением исследуемых материалов.

Срок роста клеток в 12-луночном планшете до внесения тестируемых объектов 48 ч до достижения 80-100% конфлюэнтности, при 37 °С в термостате с содержанием 5% CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> инкубатор WS-180CS World Science, Корея).

По достижении 80-100% конфлюэнтности в мембранные вставки для 12-луночного планшета вносились тестируемые объекты массой 25мг и инкубировались 24 часа при 37°С в с содержанием 5% CO<sub>2</sub>; использовались участки ПТФЭ и ПЭТ размером 5 x 5 мм, нитинол, все массой 25 мг; использованный в исследовании нитинол был произведен в России и соответствовал стандартному составу соединения никеля и титана (55% никель -

45% титан); нитинол вносился в мембранные вставки в виде порошка с размером частиц 43-105 мкм.

Выбранное количество нитинола использовалась с учетом расчета поверхности перекрытия ячейками стента стенки сосуда при периферических эндоваскулярных вмешательствах на примере стандартных используемых в клинике стентов в перерасчете на площадь монослоя первичной культуры HUVEC, культивируемой на лунках 12-луночного планшета.

В качестве контроля использовалось добавление в лунку планшета аналогичное остальным лункам количество ростовой среды; в рамках эксперимента проводился дополнительно отрицательный контроль с использованием 6% перекиси водорода.

Для выполнения MTS-теста проводилась экспозиция культур клеток тестовой и контрольной групп с реагентами CellTiter 96® AQueous MTS Reagent (Promega, каталожный номер G111) и PMS (каталожный номер #S299116.0005) в течение 90 минут при 37°C с содержанием 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе WS-180CS World Science (Корея).

Далее полученные растворы с разной степенью окраски (рисунок 7) переносились в 96-луночные планшеты (рисунок 8) (Corning, каталожный номер 3599) для оценки оптической плотности на анализаторе (Stat Fax 3200 (microplate reader), Awareness technology Inc. Palm City Fl., США) при 490 нм (референсное значение – 640 нм); бралось 5 проб из каждой лунки для исключения погрешности измерения.

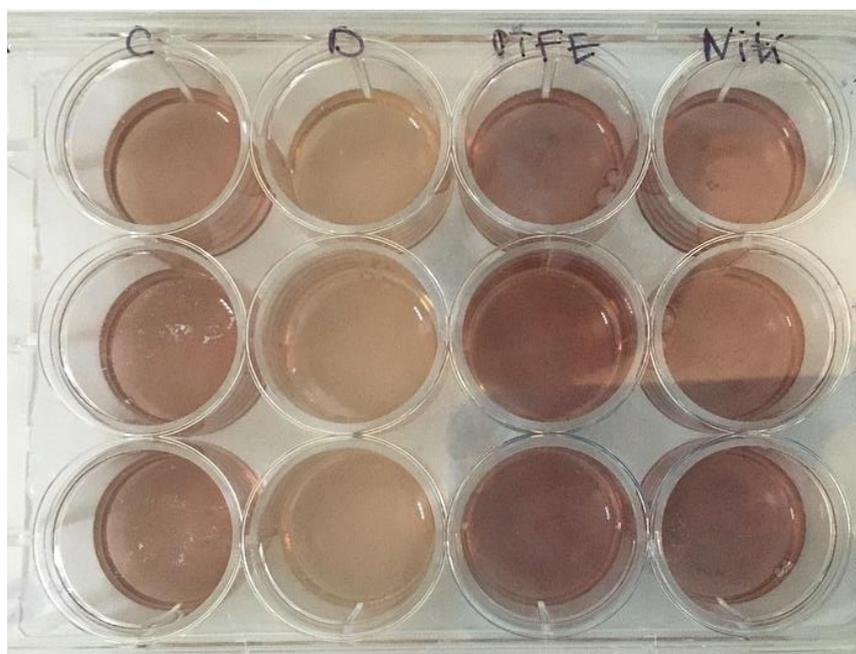


Рисунок 7 – Различное окрашивание содержимого лунок 12-луночного планшета (кондиционная среда после воздействия исследуемых материалов на первичную культуру HUVEC) через 1.5 часа инкубации с реагентами MTS/PMS. Обозначение на фото: С – контроль, D – ПЭТ (дакрон), PTFE – ПТФЭ, Niti – нинитиол  
 Примечание: по горизонтали три ряда лунок с аналогичным распределением исследуемых объектов

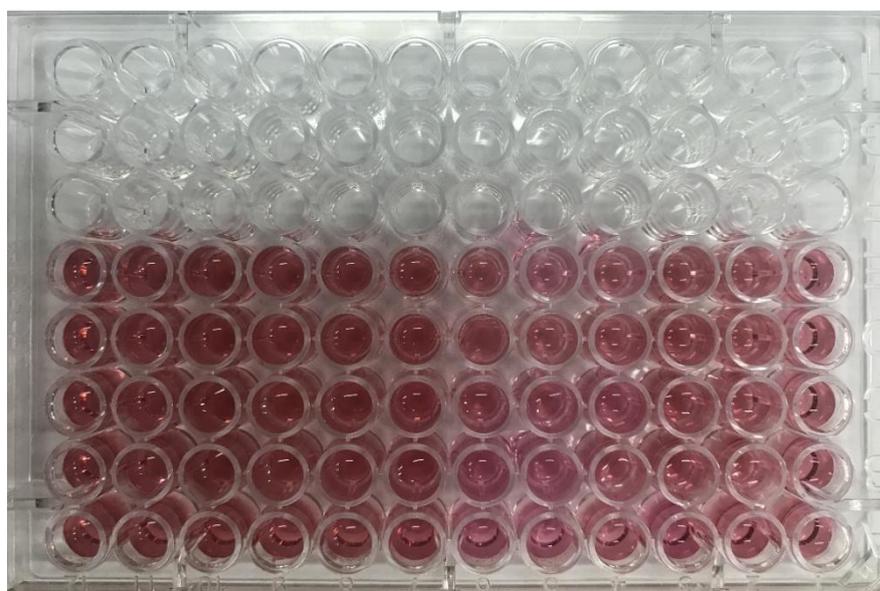


Рисунок 8 – 96-луночный планшет после распределения проб из лунок 12-луночного планшета перед выполнением исследования оптической плотности

### **2.1.3. Изучение миграционной активности первичной культуры HUVEC при воздействии материалов для артериальных реконструктивных вмешательств**

Изучение миграционной активности клеток *in vitro* имеет важную роль при проведении доклинических экспериментальных исследований по воздействию каких-либо специфических условий, фармакологических веществ или медицинских изделий на культуру клеток. В качестве экспериментальных моделей в зависимости от поставленных целей и задач используются различные клеточные культуры: первичные, раковые, иммортализованные, генно-модифицированные.

Для изучения миграционной активности клеток широкое распространение в рутинной лабораторной работе получила методика проведения теста «заживления повреждения (царапины)»; данный текст также может упоминаться в литературе как скарификационный тест, тест нанесения царапины, «wound healing test» или «scratch-test» [230]. Тест заключается в нанесении повреждения на монослой клеток вручную либо с использованием автоматизированных методик с последующей микроскопией и фотодокументацией изменений заполнения поврежденного пространства мигрирующими клетками непосредственно после повреждения и далее через определенные временные промежутки в ходе проводимого эксперимента.

Для изучения миграционной активности культуры HUVEC в рамках диссертационного исследования использовались:

- первичная культура HUVEC, пассаж 3; идентичные клеточные линии использовались в работе для изучения цитотоксичности/метаболической активности в отношении гемостатических маркеров дисфункции эндотелия при воздействии материалов, используемых для артериальных реконструктивных вмешательств.

- тестируемые объекты (ПТФЭ, ПЭТ (дакрон), нитинол);

- планшет 12-луночный (Corning каталожный номер 3512) с мембранными вставками Transwell (Corning, 6,5 мм, область роста 0,33 см<sup>2</sup>, поры 0,4 мкм каталожный номер 3413);
- питательная среда для эндотелиоцитов HUVEC ECGM (Cell Applications Sigma/Aldrich каталожный номер 211-500);
- желатин для покрытия планшетом 12-луночных (Stemcell Technologies каталожный номер 07903);
- инвертированный микроскоп лабораторного класса CKX41 Olympus (США);
- программное обеспечение ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, США).

#### *Протокол эксперимента*

Количество засеиваемых клеток первичной культуры HUVEC в лунку 12-луночного планшета составило  $0,1 \times 10^6$ ; в эксперименте засеивались 3 ряда лунок 12-луночного планшета с аналогичным распределением исследуемых материалов; срок роста клеток в 12-луночном планшете до внесения тестируемых объектов составил 48 ч до достижения 80% конфлюэнтности, при 37 °С в термостате с содержанием 5% CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> инкубатор WS-180CS World Science, Корея).

По достижении 80-100% конфлюэнтности наносилось линейное повреждение наконечником 1000мкл, после чего выполнялись микроскопия и фотодокументирование не менее чем в 10 полях зрения; далее в мембранные вставки для 12-луночного планшета вносились тестируемые объекты массой 25мг (участки протезов из ПТФЭ и дакрона размером 5 x 5 мм, нитинол в виде порошка), далее клетки инкубировались при 37 °С с содержанием 5% CO<sub>2</sub>; через 24 и 48 часов после нанесения повреждения повторно выполнялись микроскопия и фотодокументирование не менее чем в 10 полях зрения с последующей оценкой скорости миграции клеток при помощи программы ImageJ 1.48v.

#### 2.1.4. Изучение уровня и активности гемостатических маркеров дисфункции эндотелия *in vitro*

Для выполнения данного эксперимента в рамках диссертационного исследования использовались:

- линия первичной культуры HUVEC, пассаж 3;
- тестируемые объекты (ПТФЭ, ПЭТ (дакрон), нитинол);
- лабораторный пластик, включая флаконы культуральные 25 см<sup>2</sup> (Corning, каталожный номер 430639), 75 см<sup>2</sup> (Corning, каталожный номер 430725), планшет 12-луночный (Corning каталожный номер 3512) с мембранными вставками Transwell (Corning, 6,5 мм, область роста 0,33 см<sup>2</sup>, поры 0,4 мкм каталожный номер 3413);
- питательная среда для эндотелиоцитов ECGM (Cell Applications Sigma/Aldrich, каталожный номер 211-500);
- желатин для покрытия планшетом 12-луночных (Stemcell Technologies, каталожный номер 07903);
- наборы реагентов для изучения активности vWF, VIII, уровней PAI-1, sEPCR и метаболитов NO (оксида азота) (суммарной концентрации нитратов и нитритов), что в клинической части исследования.

#### *Протокол эксперимента*

Согласно общему протоколу исследования, аналогично ранее описанным экспериментам, проводилось засеивание 12-луночных планшетов клетками первичной линии HUVEC по  $0,1 \times 10^6$  в лунку. Эксперимент выполнялся трижды с разными первичными линиями HUVEC для исключения погрешностей измерения; в каждом эксперименте засеивались 3 ряда лунок 12-луночного планшета с аналогичным распределением исследуемых материалов; срок роста клеток в 12-луночном планшете до внесения тестируемых объектов 48 ч до достижения 80-100% конfluence, при 37 °C в термостате с содержанием 5% CO<sub>2</sub>.

По достижении 80-100% конfluenceности в мембранные вставки для 12-луночного планшета Corning вносились тестируемые объекты массой 25мг и инкубировались 24 часа при 37°C с содержанием 5% CO<sub>2</sub>; в качестве контроля использовалось добавление в лунку планшета аналогичное остальным лункам количество ростовой среды ECGM.

По истечению еще 24 часов мембранные вставки изымались из планшетов и проводился забор кондиционной среды для изучения уровня метаболитов оксида азота II (NO), ингибитора активатора плазминогена 1 (PAI-1), растворимых рецепторов к протеину С (sEPCR), а также активность фактора фон Виллебранда (VWF), фактора свертывания VIII (FVIII) как ключевых гемостатических маркеров дисфункции эндотелия (таблица 2).

Таблица 2 – Дизайн эксперимента по изучению гемостатических маркеров дисфункции эндотелия

	Контроль	ПЭТ (дакрон)	ПТФЭ	Нитинол
0 часов	HUVEC 0.1 x 10 <sup>6</sup>	HUVEC 0.1 x 10 <sup>6</sup>	HUVEC 0.1 x 10 <sup>6</sup>	HUVEC 0.1 x 10 <sup>6</sup>
48 часов	ECGM	25мг ПЭТ	25мг ПТФЭ	25мг нитинола
72 часа	забор кондиционной среды для изучения активности VWF, фактора свертывания VIII, уровней PAI-1, sEPCR, метаболитов NO (суммарной концентрации нитратов и нитритов)			

Для оценки коагуляционной активности первичной культуры HUVEC изучались показатели vWF, PAI-1 и sEPCR в кондиционной среде. Активность vWF определялась с использованием методики агглютинации тромбоцитов с использованием реагента VW Reagent согласно инструкции производителя (Siemens HDP GmbH, Германия, каталожный номер OUBD23). Уровни ингибитора активации плазминогена 1 типа (PAI-1) (каталожный номер TC12075 (Technoclone)) и растворимых эндотелиальных рецепторов к протеину С (sEPCR) (каталожный номер SEA022Hu (Cloud-Clone Corp.)) определялись в кондиционной среде методом иммуоферментного анализа на автоматическом иммуоферментном анализаторе Lazurit (Dyner, США).

Для определения уровня стойких метаболитов оксида азота 100мкл депротеинизированной кондиционной среды тестовой и контрольной групп вносилось в 96-луночные планшеты Corning. Методика заключалась в восстановлении нитратов в нитриты в присутствии хлористого ванадия и диазотировании нитритом сульфаниламида с последующим развитием разной окраски, интенсивность которой определялась спектрофотокориметрически при 540 нм на анализаторе Stat Fax 3200 Awareness technology Inc. Palm City Fl. (США).

Более подробно методики оценки активности и уровня изучаемых показателей приведены при описании материалов и методов клинической части диссертационного исследования.

#### **2.1.5. Оценка экспрессии маркеров гемостатического звена дисфункции эндотелия в культуре HUVEC методом вестерн-блот**

С учетом результатов проведенных экспериментов и получения статистически значимых межгрупповых различий, было проведено изучение экспрессии белков-маркеров гемостатического звена дисфункции эндотелий при помощи метода вестерн-блот, vWF и PAI-1.

После окончания эксперимента согласно вышеописанным схемам (инкубирование первичной культуры HUVEC с ПТФЭ, ПЭТ, нитинолом в тех же количествах и в те же сроки), клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия). Клетки трехкратно промывали фосфатным буфером с рН 7,4 («ПанЭко», Россия) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo («ThermoFisher Scientific», США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (аминоэтилбензенсульфонил флуорида гидрохлорид (AEBSF) 2 мМ, апротинин 0,3 мкМ, бестатин 130 мкМ, ЭДТА 1мМ, эпоксисукциниллейцингуанидинобутиламид (E-64) 14 мкМ, лейпептин 1мкМ, «Sigma-Aldrich», Германия) в течение 30 минут при +4<sup>0</sup>С и постоянном перемешивании из расчета 10<sup>7</sup> клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 минут («Avanti JXN-3»,

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

20 мкг белков подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free Fast Cast Acrylamide Kit, 7,5% («Bio-Rad», США) при 100 В в течение 90 мин. Перед загрузкой в гель пробы смешивали с 4-кратным буфером для образцов Laemmli («Bio-Rad», США), содержащим 10% β-меркаптоэтанола («Helicon», Россия), в соотношении 3:1 и нагревали до 95°C в течение 5 минут.

Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose, «Bio-Rad», США) с использованием Trans-Blot Turbo Transfer System («Bio-Rad», США) в течение 10 мин при 25 В и 1,3 А.

Белки на мембране блокировали 1% раствором Casein Blocker («Bio-Rad», США), содержащим 0,5% Tween-20 («Sigma-Aldrich», Германия), при инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре.

Детекцию белков vWF и PAI-1 проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных антител к PAI-1 (Thermo Fisher, артикул PA598307) и к vWF (Thermo Fisher PA516634) в концентрации 1:200 в блокирующем растворе в течение 16 часов (в течение ночи) при +4°C с последующим интенсивным трехкратным (каждый раз в течение 10 мин) промыванием в TBS-T (трис-буфер с 0,5% Tween-20) («Bio-Rad», США).

Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных козлиных антител (Thermo Fisher артикул 31460) в разведении 1:5000 в блокирующем растворе в течение 1 часа при комнатной температуре с последующим интенсивным трехкратным (каждый раз в течение 10 мин) промыванием TBS-T.

Молекулярная масса PAI-1 и vWF была подтверждена путем сравнения с предварительно нанесенными маркерами молекулярного размера (Precision plus protein standards Dual Color, «Bio-Rad», США).

Белки визуализировали хемилюминесценцией с помощью ChemiDoc XRS+ («Bio-Rad»). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали

денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad»). Количество исследуемых белков оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), «ThermoFisherScientific», вторичные антитела).

## **2.2. Материалы и методы клинической части исследования**

### *Критерии включения и невключения в исследование*

Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России и зарегистрирована на международном портале [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) (идентификационный номер NCT04391374). В исследование включено 167 пациентов со 2б-4 стадией хронической ишемии по классификации А.В. Покровского-Фонтейна (категории 3-5 Rutherford) вследствие заболевания периферических артерий атеросклеротической этиологии. 4 стадия заболевания (категория 5 Rutherford) была представлена ограниченными сухими некрозами. Пациенты разделены на 3 группы в зависимости от выбранной тактики лечения:

Группа I – консервативное лечение согласно клиническим рекомендациям, принятым на территории Российской Федерации (n=52) [4];

Группа II – рентгенэндоваскулярные ангиопластика (чрескожная транслюминальная баллонная ангиопластика, ЧТБА) и/или стентирование артерий нижних конечностей (n=55);

Группа III – реконструктивные шунтирующие операции на артериях нижних конечностей с использованием синтетических протезов (n=60).

Пациентам выполнялось функциональное тестирование для определения дистанции безболевого ходьбы по протоколу Гарднера [33]. Выбор в пользу того или иного вида лечения был сделан после тщательного изучения клиники и анамнеза заболевания, данных общелабораторных, биохимических и инструментальных методов диагностики, с учетом индивидуальных анатомических особенностей пациента, а также воли самого больного в случае отказа от предложенного рентгенэндоваскулярного или открытого реконструктивного вмешательства на артериях конечностей.

*Критерии включения в исследование:*

1. возраст пациента от 40 до 85 лет;
2. наличие Пб-IV стадии хронической ишемии по классификации А.В. Покровского-Фонтейна (категории 3-5 по R. Rutherford) вследствие периферического атеросклероза;
3. получение информированного согласия на участие в исследовании.

*Критерии невключения в исследование:*

1. заболевания периферических артерий вследствие аутоиммунных заболеваний, а также болезнь Бюргера, аортоартериит Такаясу, осложнения сахарного диабета, последствия лучевой терапии или ятрогенного повреждения, травм и других причин помимо атеросклероза;
2. пациенты моложе 40 лет;
3. беременные женщины, либо женщины в период лактации;
4. наличие вирусных гепатитов, ВИЧ, туберкулеза, либо прочих активных инфекционных заболеваний;
5. наличие активного рака, либо ремиссия сроком менее 5 лет;
6. декомпенсированный сахарный диабет либо сахарный диабет 1 типа;
7. наличие тромбо- либо гемофилий в анамнезе;
8. наличие аутоиммунных заболеваний в анамнезе;
9. отказ пациента от участия в исследовании;
10. невозможность соблюдения пациентом рекомендаций по лечению вследствие когнитивных расстройств;
11. существенного ограничения подвижности либо прочих причин;
12. ожидаемая продолжительность жизни менее 1 года;
13. сопутствующий прием антикоагулянтных препаратов.

*Методы физикального и инструментального исследования*

Пациентам, включенным в исследование, проведены следующие виды исследований:

## 1. Физикальный осмотр.

Физикальный осмотр с регистрацией жизненно важных показателей проводился всем пациентам, включенным в исследование, в установленные сроки: пациентам группы I при включении в исследование и через 12 месяцев, пациентам групп II и III при включении в исследование, через 3, 6 и 12 месяцев после выполнения реконструктивных вмешательств.

## 2. Инструментальные методы диагностики:

Всем пациентам в исследовании выполнялись нижеперечисленные инструментальные обследования в установленные сроки; проводились актуальные на время проведения исследования оценки кровообращения в конечностях, в том числе дистального артериального русла [25]:

- ультразвуковая доплерография с измерением лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ) с использованием портативного доплера «АНГИОДИН ПК» и ультразвукового сканера Sono Scape S20 (Китай);

- ультразвуковое исследование артерий нижних конечностей с использованием сканеров Sono Scape S20 (Китай) и eSaote Lab Seven (Италия) при помощи линейного и конвексного датчиков;

- ангиографическое исследование при наличии показаний, с целью определения тактики и контроля лечения на ангиографических комплексах Philips «Integris 5000» (Германия) и Siemens Axiom Artis (Германия) с использованием ангиографической инъекционной системы MEDRAD Mark V ProVis (Германия);

- электрокардиография при помощи электрокардиографа Kaden ECG-9012 (Китай).

Пациентам в группах II и III вышеуказанные исследования выполнялись при включении в исследование, через 3, 6 и 12 месяцев после рентгенэндоваскулярного либо открытого оперативного вмешательства.

Пациентам группы I выполнены аналогичные обследования при включении в исследование и через 12 месяцев.

Регистрация ЭКГ проводилась при включении в исследование и повторно при наличии к тому показаний при повторных осмотрах.

*Методы лабораторной оценки активности и уровня маркеров гемостатического звена дисфункции эндотелия у пациентов с периферическим атеросклерозом*

При включении в исследование всем пациентам выполнен забор периферической венозной крови для исследования уровня и активности гемостатических маркеров дисфункции эндотелия с использованием вакуумных пробирок S-Monovette (Sarstedt, Германия):

- активность фактора Виллебранда определялась в плазме крови с использованием мануальной методики агглютинации тромбоцитов в присутствии VWF и антибиотика ристоцетина А с использованием реагента Von Willebrand Reagent (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Германия (каталожный номер OUBD23));

- антиген фактора фон Виллебранда (антиген vWF) в плазме крови определялся методом иммуноферментного анализа с использованием реagens Technozym vWF:Ag ELISA (Diapharma Group, Inc. США, каталожный номер 5450201) на автоматическом иммуноферментном анализаторе Lazurit (Dyplex, США);

- активность фактора свертываемости VIII определялась в плазме крови клоттинговым гемостазиологическим методом на оптическом, полуавтоматическом коагулометре SYSMEX CA 50 (Япония) с использованием субстратной дефицитной по VIII фактору плазме (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Германия, каталожный номер OTXW17);

- уровень ингибитора активатора плазминогена 1 типа (PAI-1) определялась в сыворотке крови определялась с использованием набора для количественного определения ингибитора активации плазминогена 1 типа (PAI-1) методом иммуноферментного анализа (Technoclone, Австрия, каталожный номер TC12075) на автоматическом иммуноферментном анализаторе Lazurit (Dyplex, США);

- уровень растворимых эндотелиальных рецепторов к протеину С (sEPCR)) в сыворотке крови с использованием набора для количественного определения эндотелиального рецептора протеина С методом иммуноферментного анализа

(Cloud-Clone Corp., США, каталожный номер SEA022Hu) на автоматическом иммуноферментном анализаторе Lazurit (Dynex, США).

- дополнительно с целью изучения системы протеина С определялась непосредственно его активность с использованием хромогенного метода с субстратом на автоматическом коагулометре SYSMEX CA 660 (Япония) с использованием реагента Berichrom ProteinC (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Германия (арт. OUVV15);

- уровень метаболитов оксида азота II (NO) как интегрального показателя функционального состояния эндотелия определялась в сыворотке крови спектрофотоколометрическим методом на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 3200 («Awareness Technology, Inc.», США) с использованием 96% этилового спирта, реактива Грисса и раствора ванадия хлорида.

Контрольные исследования проводились пациентам групп II и III через 3 месяца после выполнения рентгенэндоваскулярных либо открытых оперативных вмешательств. Схематично исследование представлено в таблице 3.

Таблица 3 – Дизайн исследования

Сроки обследования/ Вид обследования	0 мес (день 1)	3 мес ±5 дней	6 мес ±10 дней	12 мес ±14 дней
Информированное согласие	V			
Демографические данные	V			
Сбор анамнеза	V			
Регистрация жизненно важных показателей*	V	V	V	V
ЭКГ	V			
Измерение лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ)*	V	V	V	V
Ультразвуковое исследование артерий нижних конечностей	V	V	V	V
Ангиографическое исследование артерий нижних конечностей**	V			
Забор периферической венозной крови для исследования уровня (PAI-1, sEPCR, метаболиты NO, АГ vWF) и активности (VWF, фактор коагуляции VIII – FVIII) гемостатических маркеров дисфункции эндотелия**	V	V		

Примечание: \* - для пациентов группы I исследование проводилось в день 1 (включение в исследование) и срок 12 месяцев (окончание исследования); \*\* - ангиографическое исследование артерий нижних конечностей выполнялось пациентам групп II и III при включении в исследование, далее – при наличии клинических показаний; \*\*\* - для пациентов группы III исследование проводилось в день 1 (включение в исследование).

*Методы статистической обработки полученных результатов*

Статистический анализ результатов клинического и экспериментального исследований проводился с использованием программы STATISTICA 13.0. В ходе статистического анализа выборочных данных применялись методы и средства, относящиеся к следующим основным разделам математической статистики: предварительная обработка данных, описательная статистика (графический анализ данных, исследование законов распределения данных, расчет основных статистических характеристик), статистическая проверка гипотез, корреляционный анализ.

Проверка нормальности распределения осуществлялась при помощи критерия Шапиро-Уилка (W-критерий). Критерий Шапиро-Уилка W в настоящее время является наиболее эффективным, так как он обладает большей мощностью по сравнению с альтернативными критериями проверки нормальности. Все результаты выражались как среднее (стандартное отклонение, доверительный интервал (ДИ) 95%) для количественных признаков, имеющих нормальное распределение. При отклонении от нормального распределения для дальнейшего анализа использовались непараметрические тесты, данные которых были представлены в формате Me (Q1 – Q3), где Me – медиана, Q1 - нижний квартиль, Q3 - верхний квартиль. Медиана делит ряд упорядоченных значений пополам с равным числом этих значений как выше, так и ниже ее (левее и правее медианы на числовой оси). В случае нормального распределения переменных при оценке межгрупповых различий для зависимых и независимых выборок использовали t-критерий Стьюдента. В случае ненормального распределения переменных для установления статистически значимых различий между двумя независимыми выборками применялся U-тест Манна-Уитни, для сравнения двух зависимых выборок – W - критерий Уилкоксона. Множественные сравнения в зависимости от распределения и характера совокупности производились с использованием однофакторного дисперсионного анализа, критериев Фридмана или Краскелла-Уоллиса. При апостериорных сравнениях учитывалась поправка Бонферрони. Все различия считались статистически значимыми при уровне  $p \leq 0,05$ .

С помощью метода бинарной логистической регрессии исследовалась зависимость дихотомических переменных (бинарных, имеющих лишь два возможных значения) от независимых переменных, имеющих любой вид шкалы. В случае с дихотомическими переменными речь идёт о некотором событии, которое может произойти или не произойти (например, развитие рестеноза или тромбоза в рамках клинической части диссертационного исследования). Бинарная логистическая регрессия использовалась для расчета вероятности наступления события в зависимости от значений независимых переменных (например, активности или уровня гемостатического маркера дисфункции эндотелия). Вероятность наступления события в случае использования бинарной логистической регрессии рассчитывалась по формуле:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-z}}$$

где  $z = b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + \dots + b_n \cdot X_n + a$ ,  $X_1$  — значения независимых переменных,  $b_1$  — коэффициенты, расчёт которых является задачей бинарной логистической регрессии,  $a$  — константа. «e» — основание натурального логарифма, равное примерно 2,718282.

В качестве отдельного анализа при построении модели логистической регрессии применялся анализ ROC-кривых (Receiver Operator Characteristic). ROC-анализ использовался для расчета оптимального порогового значения вероятности для классификации. ROC-кривые использовались для представления результатов бинарной классификации и оценки эффективности классификации. При анализе ROC-кривых оперировали абсолютными и относительными показателями верно классифицированных исходов (чувствительностью — долей истинно положительных случаев, которые были правильно классифицированы моделью; специфичностью — долей истинно отрицательных случаев, которые были правильно классифицированы моделью). В рамках текущего исследования применялись ROC-анализ и анализ четырехпольных таблиц для оценки чувствительности и специфичности изучаемых критериев, при этом статистически достоверными считались значения  $p < 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Метаболическая (митохондриальная) активность первичной культуры HUVEC при воздействии материалов для артериальных реконструктивных вмешательств

В ходе *in vitro* эксперимента по изучению метаболической (митохондриальной) активности первичной культуры HUVEC при воздействии материалов, используемых для артериальных реконструктивных вмешательств, включая ПТФЭ, ПЭТ (дакрон) и нитинол, наименьшие средние значения оптической плотности отмечались в группе дакрона, наибольшие – в группе контроля (рисунок 9).

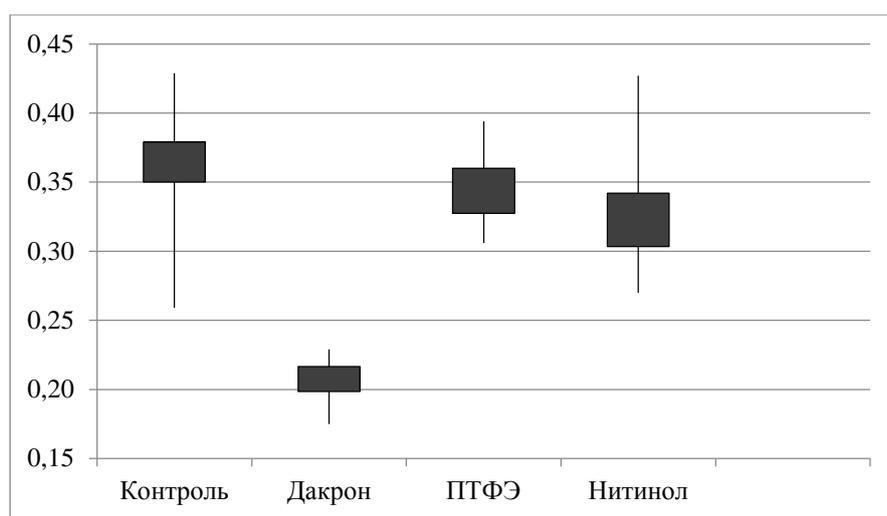


Рисунок 9 – Сравнение значение оптической плотности в исследуемых группах

Примечание: статистически значимые различия были обнаружены между группой контроля и дакрона ( $p < 0,001$ ), контроля и ПТФЭ ( $p = 0,037$ ), контроля и нитинола ( $p < 0,001$ ), дакрона и ПТФЭ ( $p < 0,001$ ), ПТФЭ и нитинола ( $p = 0,006$ ), дакрона и нитинола ( $p < 0,001$ )

В ходе эксперимента было показано, что в аналогичном объеме материала (участки протезов размером приблизительно 5 x 5 мм, все массой 25мг) наибольшее угнетение метаболической (митохондриальной) активности

первичной культуры HUVEC показал ПЭТ (дакрона). Исследование оптической плотности для данного материала продемонстрировало минимальные показатели; это соответствовало угнетению метаболической активности культуры клеток на 41,7% по сравнению с группой контроля. По данным MTS-теста, через 24 ч после инкубации первичной культуры HUVEC с нитинолом общая метаболическая активность клеток составила 0,32 (0,30-0,34) ед. опт. пл. по сравнению с 0,36 (0,35-0,38) ед. опт. пл. в контроле ( $p < 0,001$ ), т.е. воздействие нитинола характеризовалась умеренным снижением метаболической активности культуры клеток (на 11,1% по сравнению с группой контроля). Метаболическая активность культуры HUVEC, подверженных воздействию ПТФЭ, была близкой к группе контроля, то есть соответствовала оптимальным условиям функционирования клеток *in vitro*.

Анализ метаболической активности/цитотоксичности подразумевает исследование возможности какого-либо материала оказывать влияние на жизнеспособность клеток, например, метаболическую активность, целостность клеточных мембран, клеточный рост. *In vitro* изучение цитотоксичности и/или жизнеспособности клеток имеет ряд преимуществ, таких как быстрота выполнения исследований, относительно невысокая стоимость, а также возможность использования человеческих клеток без рисков для здоровья пациентов; кроме того, *in vitro* использование клеточных линий, полученных от человека, может давать более точные данные, чем некоторые эксперименты на животных *in vivo*. Существует большое количество методик, используемых для оценки данного явления: 1) методики, исключаящие использование каких-либо красителей / видов окрашивания; 2) колориметрические методы; 3) флуориметрические методы; 4) люцинометрические методики. Используемый в рамках текущей работы MTS-тест, наряду с методиками MTT, XTT, WST-1, WST-8, LDH, SRB и NRU, относится к колориметрическим методикам [68]. MTS-тест представляет собой быструю, чувствительную и специфичную методику изучения цитотоксичности (метаболической, или митохондриальной активности культуры клеток) *in vitro*. Ограничением метода может служить влияние на результаты

времени инкубации и типа клеток. Однако, результаты исследований показывают, что выбор оптимального времени воздействия MTS дает надежные результаты экспериментов. MTS-тест может применяться для изучения цитотоксичности материалов, используемых в различных сферах медицины как при оценке прямого контакта с клетками, так и непрямого, например, с использованием мембранных систем [59]. Изучение цитотоксичности играет и важную роль в сердечно-сосудистой хирургии. Так, ведутся работы по изучению клапанных протезов на основе полиэтилена LLDPE, ПТФЭ, дакрона, бычьего и свиного перикарда, покрытых гиалуроновой кислотой, в рамках которых активно применялись методики оценки цитотоксичности (LDH-методика) [135].

В ходе проведенного эксперимента было показано, что наибольшее угнетение митохондриальной активности в отношении первичной культуры клеток HUVEC показал ПЭТ - дакрон: исследование оптической плотности кондиционной среды, полученной от культур клеток, инкубированных с данным материалом, продемонстрировало минимальные показатели, что соответствует угнетению метаболической активности клеток на 41,7% по сравнению с группой контроля. Данное наблюдение можно трактовать как особенность адаптации культуры эндотелиоцитов к вышеуказанному материалу, что может гипотетически ограничивать процессы эндотелизации протезов *in vivo*, при этом потенциально препятствуя процессам формирования неоинтимы, что требует дальнейшего изучения. Метаболическая активность клеток, подверженных воздействию ПТФЭ, была близкой к группе контроля (снижение оптической плотности не более чем 2,8%), т.е. соответствовала оптимальным условиям функционирования эндотелиальных клеток *in vitro*.

Проведенная в рамках данного исследования работа по изучению метаболической (митохондриальной) активности первичной культуры HUVEC при воздействии материалов, используемых в сосудистой хирургии, с применением MTS-теста, представляющего собой удобный и доступный метод для *in vitro* исследований, показала, что возможна относительно простая и доступная лабораторная оценка влияния искусственных протезов на ключевые

элементы сосудистой стенки. Данная методика воспроизводима, о чем свидетельствуют результаты повторных экспериментов. Используемый в рамках данной работы подход может позволить рутинно изучать влияние различных условий внеклеточной среды, покрытий протезов, воздействия химических агентов, на метаболическую активность клеток, что может способствовать расширению знаний о процессах гемосовместимости, эндотелизации сосудистых протезов и гиперплазии интимы в условиях *in vitro*.

Таким образом, в рамках проведенного исследования было выявлено, что в сравнении с нитином и дакреном, ПТФЭ обладает минимальным повреждающим действием на первичную культуру эндотелиоцитов по параметру оценки митохондриальной активности клеток ( $p=0,037$ ).

### 3.2. Миграционная активность HUVES при воздействии материалов для артериальных реконструктивных вмешательств

Средние сроки зарастания области повреждения (миграционная активность) при инкубации первичной культуры HUVES с ключевыми материалами, используемыми для артериальных реконструкций, представлены на рисунках 10 и 11.

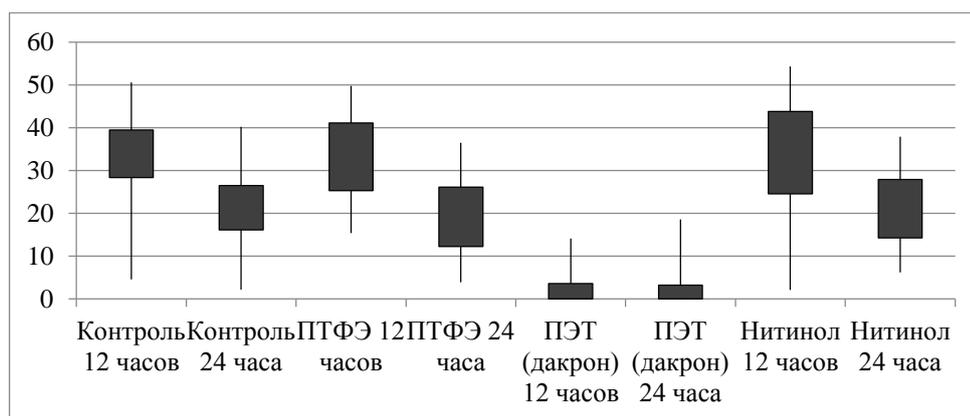


Рисунок 10 – Скорость зарастания области повреждения в разные сроки, мкм/ч

Примечание. Статистически значимые межгрупповые различия в срок 0-12 часов и 12-24 часа получены между группой контроля и дакреном ( $p<0,001$ ), ПТФЭ и дакреном ( $p<0,001$ ), нитином и дакреном ( $p<0,001$ )

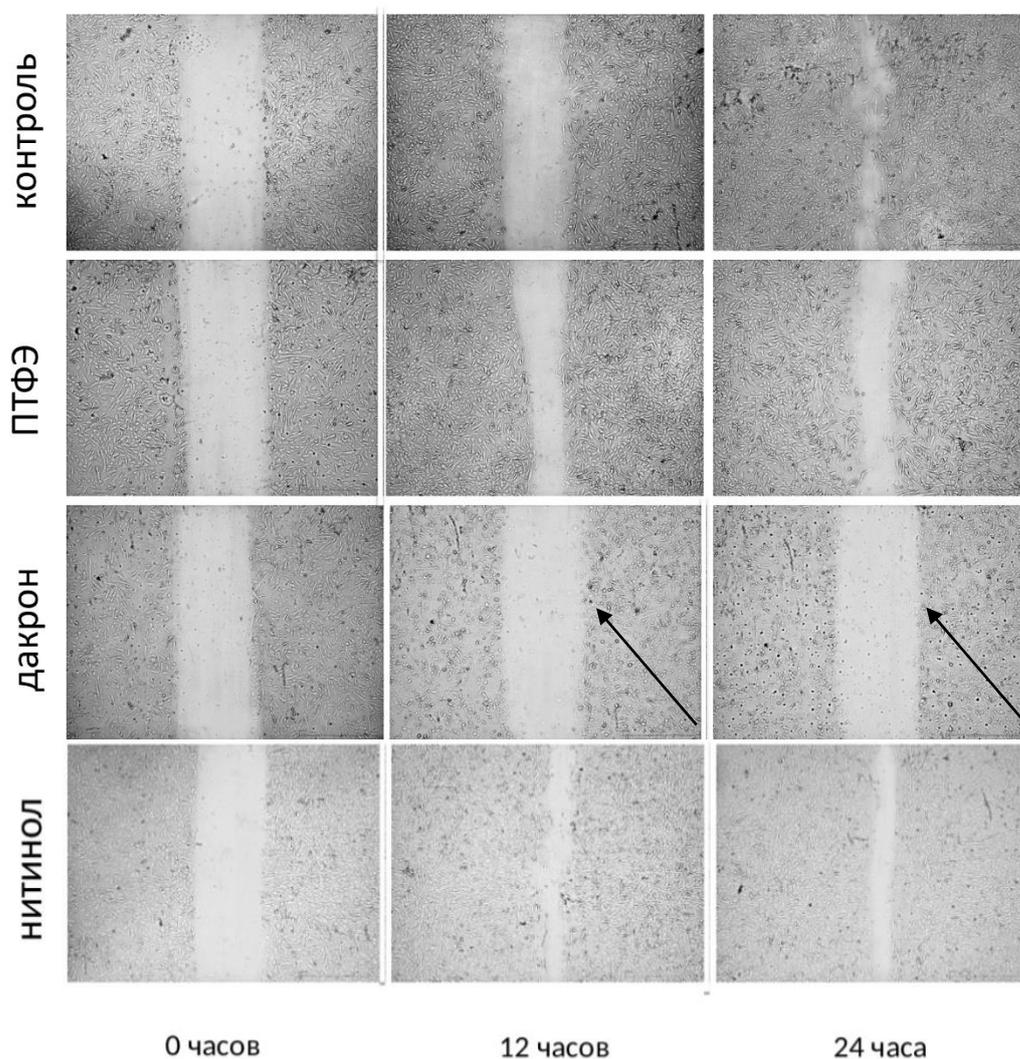


Рисунок 11 – Визуальное представление оценки миграционной активности культуры эндотелиоцитов HUVEC при воздействии изучаемых материалов  
Примечание. Стрелками указана низкая миграционная активность культуры HUVEC при инкубации с ПЭТ (дакроном) в сроки 12 часов и 24 часа

Изучение миграционной активности культуры клеток, которое оценивалась с помощью теста «заживления повреждения» (англ. «scratch-test») в сроки 12 и 24 часа после инкубации с ПТФЭ, ПЭТ и нитинолом показало, что воздействие полиэтилентерефталата (ПЭТ) на первичную культуру эндотелиоцитов *in vitro* характеризовалось угнетением миграционной активности культуры клеток по сравнению с политетрафторэтиленом (ПТФЭ), группой контроля и нитинола.

Снижение миграционной активности культуры HUVEC при воздействии ПЭТ можно рассматривать как ограничивающий фактор в отношении потенциальной эндотелизации сосудистых протезов *in vivo*, при этом может благоприятным образом сказываться на процессах формирования неоинтимы.

Оценка влияния на миграционную активность культуры эндотелиоцитов ПТФЭ и нитинола позволяет предполагать отсутствие возможного неблагоприятного влияния на процессы эндотелизации.

Влияние синтетических материалов на процессы рестеноза *in vitro* требуют дополнительного изучения, так как в формировании неоинтимы существенную роль играют не только эндотелиальные, но и гладкомышечные клетки.

### 3.3. Активность и уровни гемостатических маркеров дисфункции эндотелия в кондиционной среде при воздействии ПТФЭ, ПЭТ и нитинола

#### *Уровень PAI-1 в кондиционной среде*

Средние значения уровня ингибитора активации плазминогена-1 (PAI-1) в кондиционной среде составили 165,21 нг/мл (1,88, ДИ 95% 164,17 – 166,25) в группе контроля, 159,83 нг/мл (3,25, ДИ 95% 157,77 – 161,90) в группе ПЭТ (дакрон), 166,33 нг/мл (2,39, ДИ 95% 165,00 – 167,65) в группе ПТФЭ и 165,06 нг/мл (2,23, ДИ 95% 163,82 – 166,30) в группе нитинола (рисунок 12).

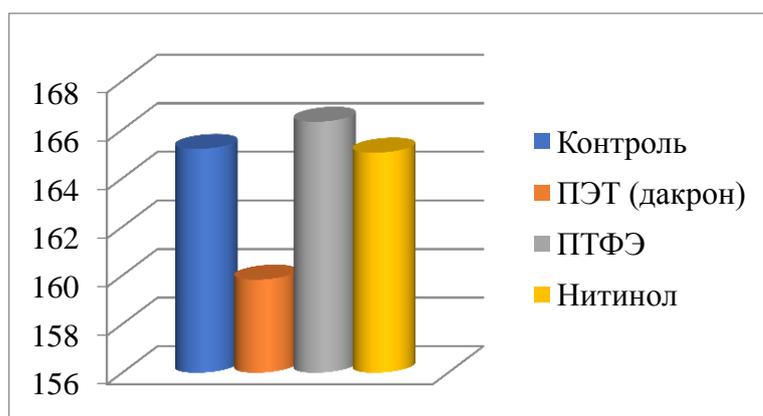


Рисунок 12 – Уровень PAI-1 в кондиционной среде, нг/мл

Примечание. Статистически значимые различия были получены между группами контроля и дакрона ( $p < 0,001$ ), дакрона и ПТФЭ ( $p < 0,001$ ), дакрона и нитинола ( $p < 0,001$ )

*Уровень эндотелиальных рецепторов к протеину С (sEPCR) в кондиционной среде*

Средние значения уровня sEPCR в кондиционной среде составили 0,4 нг/мл (0,4-0,5) в группе контроля, 2,0 нг/мл (0,5-3,0) в группе ПЭТ (дакрона), 1,0 нг/мл (0,2-4,0) в группе ПТФЭ и 1,0 нг/мл (1,0-2,0) в группе нитинола (рисунок 13).

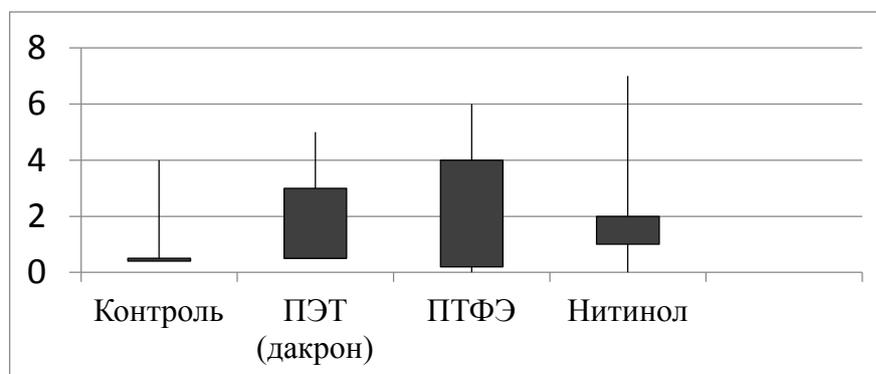


Рисунок 13 – Уровень sEPCR в кондиционной среде, нг/мл

Примечание. Статистически значимых межгрупповых различий не выявлено ( $p > 0,05$ )

*Активность фактора фон Виллебранда (vWF) в кондиционной среде*

Средние значения активности vWF составили 1,0% (1,0-1,35) в группе контроля, 0,5% (0,5-0,5) в группе ПЭТ (дакрон), 1,0% (1,0-1,0) в группе ПТФЭ и 1,5% (1,0-1,5) в группе нитинола (рисунок 14).

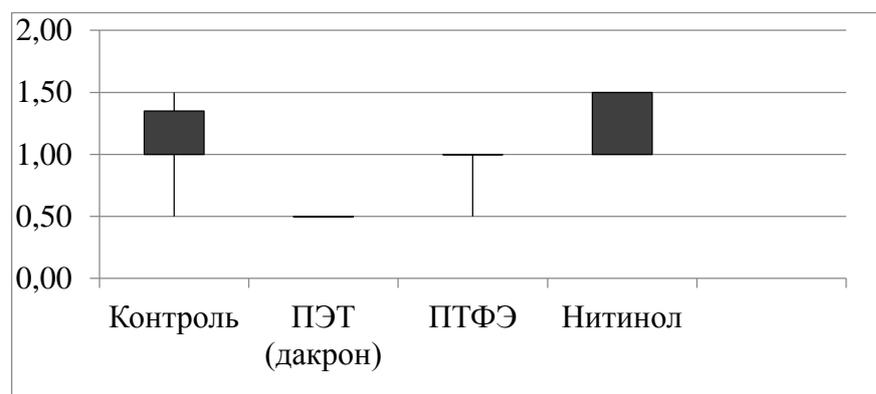


Рисунок 14 – Активность фактора vWF в кондиционной среде, %

Примечание. Статистически значимые изменения получены между группами контроля и дакрона ( $p < 0,001$ ), дакроном и ПТФЭ ( $p = 0,002$ ), дакроном и нитинолом ( $p < 0,001$ ), ПТФЭ и нитинолом ( $p < 0,001$ )

### *Активность фактора VIII в кондиционной среде*

Средние значения активности фактора FVIII составили 2,2% (2,1-2,3) в группе контроля, 2,2% (2,2-2,3) в группе ПЭТ (дакрона), 2,2% (2,2-2,35) в группе ПТФЭ и 2,3% (2,2-2,4) в группе нитинола (рисунок 15).

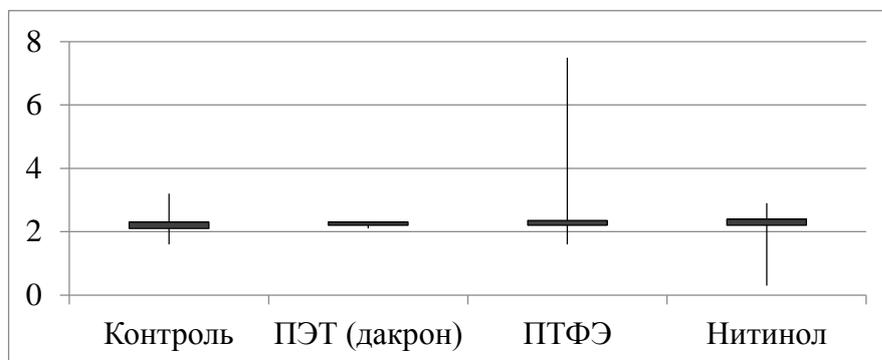


Рисунок 15 – Активность фактора FVIII в кондиционной среде, %

Примечание. При сравнении полученных величин статистически значимых различий между группами не получено ( $p > 0,05$ )

### *Уровень метаболитов оксида азота II*

*(суммарная концентрация нитратов и нитритов)*

Средние значения уровня метаболитов оксида азота II (NO) составили 19,22 мкмоль/мл (13,43 – 25,37) в группе контроля, 12,15 мкмоль/мл (4,96-16,51) в группе ПЭТ (дакрона), 19,88 мкмоль/мл (13,05-24,99) в группе ПТФЭ и 19,88 мкмоль/мл (12,28-26,91) в группе нитинола (рисунок 16).

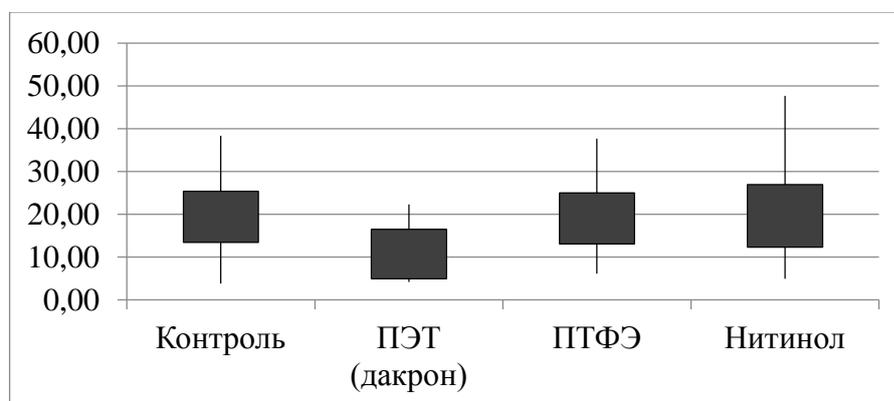


Рисунок 16 – Уровень метаболитов оксида азота II в кондиционной среде, мкмоль/мл

Примечание. Статистически значимых различий между группами получено не было ( $p > 0,05$ )

Статистически значимые различия были получены в отношении активности vWF в кондиционной среде, при этом наибольшая активность vWF отмечена в группе нитинола 1,5% (1,0-1,5), минимальная – в группе ПЭТ (дакрона) 0,5 % (0,5-0,5); в отношении уровня PAI-1, максимальный уровень показателя в кондиционной среде зарегистрирован в группе ПТФЭ и составил 166,33 нг/мл (2,39, ДИ 95% 165,00 – 167,65), минимальный – в группе ПЭТ 159,83 нг/мл (3,25, ДИ 95% 157,77 – 161,90).

Несмотря на широкий спектр *in vitro* исследований, посвященных изучению роли PAI-1 в поддержании целостности эндотелиального монослоя, процессов тромбоза, атеросклероза, фиброза и клеточного старения, влияния vWF и его ингибиторов, а также sEPCR на процессы воспаления и тромбоза, количество информации по влиянию внутрисосудистых стентов на активность vWF, секрецию эндотелиальными клетками PAI-1 и sEPCR, ограничено [19, 140, 168, 200, 244].

*In vitro* изучение ЭД с позиции оценки плеiotропных эффектов оксида азота является объектом изучения биологов в течение многих лет. Помимо ключевой роли в регуляции сосудистого тонуса, важное значение оксиду азота придается в поддержании состояния покоя эндотелиоцитов и коагуляции, что продемонстрировали в своей работе Vekebdam RH и соавт. (2018) [219]. Влияние стентов на уровень оксида азота в контексте наносимого эндотелию повреждения при раскрытии стентов изучались в работах Liu X. и соавт. (2015): в эксперименте было выявлено, что более крупные по толщине ячейки стента и неоптимальное позиционирование способствовали понижению концентрации NO [98].

В данной работе изучалось влияние ПТФЭ, ПЭТ и нитинола на коагуляционную активность первичной культуры HUVEC по параметрам активности VIII, vWF, уровням PAI-1, sEPCR, а также на метаболическую активность первичной культуры HUVEC, по оценке уровня стойких метаболитов оксида азота. Несмотря на то, что отмечалось повышение активности VIII при инкубации культуры HUVEC с ПТФЭ и нитинолом, статистически значимых различий выявлено не было.

Инкубация культуры эндотелиоцитов с ПЭТ сопровождалась статистически значимым снижением активности фактора фон Виллебранда (vWF) и уровня ингибитора активации плазминогена (РАI-1) в кондиционной среде по сравнению с контролем ( $p=0,000497$ ), что может обладать протекторным действием в отношении гиперкоагуляции и рестеноза.

Инкубация культуры HUVEC с ПТФЭ характеризовалась повышенным уровнем РАI-1 в кондиционной среде по сравнению с воздействием ПЭТ ( $p=0,000003$ ).

Влияние нитинола на культуру HUVEC характеризовалось повышенной активностью vWF по сравнению с влиянием ПЭТ ( $p=0,000144$ ) и ПТФЭ ( $p=0,00726$ ); склонность к повышенной активности vWF и т.о. гиперкоагуляции/сосудистому воспалению при воздействии нитинола следует учитывать при возможной экстраполяции данных *in vitro* на *in vivo* исследований.

Влияние нитинола на первичную культуру эндотелиоцитов характеризовалось повышенным уровнем sEPCR в кондиционной среде, однако статистически значимых межгрупповых различий, равно как для показателя РАI-1, выявлено не было.

Статистически значимых изменений уровня стойких метаболитов оксида азота как интегрального показателя функции ЭК выявлено не было. Таким образом, достоверного сдвига в сторону гиперкоагуляции по исследуемым параметрам не зафиксировано.

#### **3.4. Экспрессия vWF и РАI-1 в культуре HUVEC при воздействии материалов для артериальных реконструктивных вмешательств методом вестерн-блот**

Вестерн-блот показал пониженную экспрессию РАI-1 в первичной культуре HUVEC, инкубированной с нитинолом, по сравнению с контролем ( $p=0,04$ ). Отмечалась повышенная экспрессия РАI-1 при инкубации культуры эндотелиоцитов с ПЭТ, однако межгрупповые различия не были статистически значимыми ( $p>0,05$ ); статистически значимых межгрупповых различий при

оценке экспрессии PAI-1 при инкубации культуры HUVEC с ПТФЭ выявлено не было ( $p>0,05$ ) (рисунки 17, 18).

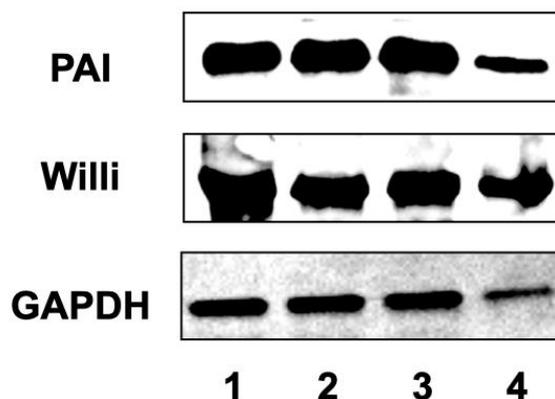


Рисунок 17 – Экспрессия PAI-1 и vWF в первичной культуре HUVEC в сравнении с белком домашнего хозяйства GAPDH после инкубации с исследуемыми материалами

Примечание. 1 – контроль, 2- ПТФЭ, 3 – ПЭТ (дакрон), 4 – нитинол

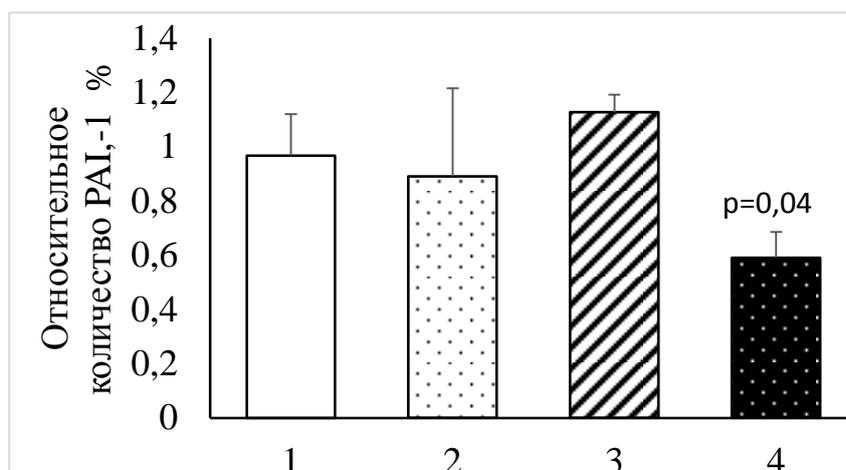


Рисунок 18 – Экспрессия PAI-1 в первичной культуре HUVEC: относительное количество в пересчете на GAPDH

Примечание. 1 – контроль, 2 – ПТФЭ, 3 – ПЭТ (дакрон), 4 – нитинол

Несмотря на то, что по сравнению с воздействием ПЭТ - дакрона, инкубация культуры HUVEC с нитинолом характеризовалась повышенном уровнем PAI-1 в кондиционной среде ( $p<0,001$ ), содержание PAI-1 в последней статистически значимо не отличался между инкубацией с нитинолом и контролем; т.о. можно предположить, что основная часть PAI-1 при воздействии нитинола не выходит во внеклеточную среду. Отмечалась повышенная

экспрессия PAI-1 при инкубации культуры эндотелиоцитов с ПЭТ ( $p>0,05$ ), при этом инкубация культуры эндотелиоцитов с ПЭТ характеризовалась статистически значимым пониженным содержанием PAI-1 в кондиционной среде ( $p<0,001$ ). Как указано выше, статистически значимого изменения экспрессии PAI-1 при инкубации культуры HUVEC с ПТФЭ выявлено не было ( $p>0,05$ ), что соответствует данным, полученным при изучении уровня PAI-1 в кондиционной среде. Изучение экспрессии vWF в первичной культуре HUVEC под воздействием исследуемых материалов показало пониженное количество vWF при инкубации культуры эндотелиоцитов с ПТФЭ, однако различия не были статистически значимыми ( $p>0,05$ ) (рисунок 19).

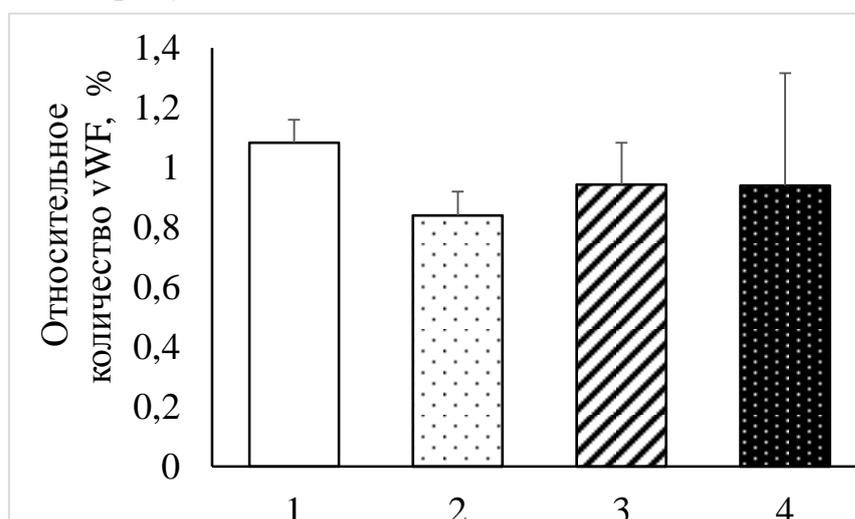


Рисунок 19 – Экспрессия vWF в первичной культуре HUVEC: относительное количество в пересчете на GAPDH

Примечание. 1 – контроль, 2- ПТФЭ, 3 – ПЭТ (дакрон), 4 – нитинол

Статистически значимых изменений активности vWF в кондиционной среде при воздействии ПТФЭ также выявлено не было ( $p>0,05$ )

Понимание особенностей влияния материала внутрисосудистых стентов на функцию клеток сосудистой стенки может дать основание к поиску оптимальных материалов для создания стентов, а также способов покрытия стентов и тактики послеоперационного лечения с целью снижения количества осложнений, включая тромботические.

## ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. Характеристики пациентов, включенных в исследование

Всего в проспективное продольное когортное исследование было включено 167 пациентов с хронической ишемией нижних конечностей Пб-IV стадии заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна; средний возраст больных составил 63 (57 - 67) года.

Подавляющее большинство пациентов было мужского пола (142 человека, 85%), при этом возраст пациентов мужского пола был статистически значимо ниже, чем возраст больных женского пола, 61,34 (7,97 ДИ95% 60,01-62,68) и 68,84 (6,33 ДИ95% 66,23-71,45) лет, соответственно.

Все пациенты в исследовании были распределены в 3 группы в зависимости от проведенного вида лечения: консервативное лечение, эндоваскулярное лечение, открытое оперативное (шунтирующее) вмешательство.

Исследование показало, что большинство пациентов, включенных в исследование, были мужского пола, при этом больные периферическим атеросклерозом мужчины были в среднем на 7,5 лет моложе, чем женщины ( $p < 0,001$ ). Данное явление можно связать с тем, что женская популяция в целом менее представлена в исследованиях ЗПА за счет частого асимптомного либо малосимптомного течения заболевания, а также возможного более позднего дебюта атеросклероза по сравнению с мужчинами [180].

Общая характеристика пациентов, включенных в исследование, в том числе подробное описание уровня поражения артериального русла, стадия заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна, сопутствующая патология и исходы (конечные точки) в течение 1 года наблюдения представлены в сводной таблице 4.

Таблица 4 - Общая характеристика пациентов, включенных в исследование

Уровень поражения (n=167)					
	Бедренно-подколенная окклюзия	Подвздошно-бедренная окклюзия	Подколенно-берцовая окклюзия	Многоуровневое поражение	Синдром Лериша
N	101	33	4	19	10
%	60,47	19,76	2,39	11,38	6
Стадия заболевания	II Б	III	IV		
N	63	75	29		
%	37,72	44,91	17,37		
Сопутствующая патология (n=167)					
N (%)	Вид патологии				
20 (11,98)	Артериальная операция в анамнезе				
31 (18,56)	ПИКС				
54 (32,34)	ИБС				
23 (13,77)	СД 2 типа				
101 (60,48)	ГБ в анамнезе				
Исходы (n =154)					
N (%)	Тип исхода				
21 (13,64)	Прогрессирование заболевания				
13 (8,44)	Онкология				
10 (6,49)	ОИМ				
11 (7,14)	Тромбоз				
6 (3,9)	Ампутация				
8 (5,19)	Летальные исходы				
2 (1,3)	Инсульт				

Как указано ранее, всем пациентам при включении в исследование был выполнен забор периферической крови для оценки уровня и активности основных маркеров гемостатического звена дисфункции эндотелия.

Основные исследуемые параметры на момент включения в исследование представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Основные исследуемые параметры среди всех пациентов при включении в исследование, n=167

	Среднее значение	Доверительный интервал (ДИ)-95%	Доверительный интервал (ДИ)-95%	Медиана	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Нижний квартиль (НК)	Верхний квартиль (ВК)	Стандартное квадратичное отклонение (СКО, $\sigma$ )
Возраст, лет	62,5	61,2	63,7	63,0	39,0	83,0	57,0	67,0	8,2
FVIII, %	147,8	138,2	157,5	135,0	36,6	347,5	99,6	180,9	63,1
vWF, %	457,3	400,9	513,6	300,0	120,0	1200,0	160,0	600,0	368,7
РАI-1, нг/мл	85,2	78,5	91,8	79,0	13,0	247,2	53,0	117,0	43,0
sEPCR, нг/мл	56,8	53,9	59,8	52,1	26,8	101,9	42,2	67,8	19,0
PrC, %	100,0	96,9	103,1	98,7	37,0	194,6	90,0	113,0	20,3
NO, мкмоль/мл	80,7	75,8	85,5	80,9	19,0	207,9	56,0	104,0	32,0
АГ к vWF, мкг/мл	1,0	0,9	1,0	0,9	0,3	1,4	0,8	1,1	0,2
ЛПИ	0,5	0,5	0,6	0,5	0,0	1,3	0,3	0,7	0,3

*Сравнение показателей среди всех пациентов в исследовании в зависимости от уровня поражения*

Уровни исследуемых показателей в зависимости от уровня поражения артериального русла представлены в таблице 6 у пациентов с окклюзией артерий бедренно-подколенного сегмента, в таблице 7 – с окклюзией артерий подвздошно-бедренного сегмента, в таблице 8 – с окклюзией подколенной артерии, в таблице 9 – с синдромом Лериша, в таблице 10 – при многоуровневом поражении.

Таблица 6 – Исследуемые параметры среди пациентов с окклюзией артерий бедренно-подколенного сегмента, n=101

	Среднее значение	ДИ 95%	ДИ 95%	Медиана	Min	Max	НК	БК	СКО, $\sigma$
Возраст, лет	63,0	61,3	64,8	64,0	40,0	83,0	57,0	68,0	8,7
FVIII, %	145,6	132,5	158,7	131,8	36,6	347,5	96,6	178,3	66,1
vWF, %	483,8	406,9	560,6	300,0	120,0	1200,0	160,0	640,0	389,4
РАI-1, нг/мл	79,8	70,9	88,7	76,2	13,0	247,2	41,7	107,8	44,9
sEPCR, нг/мл	54,2	50,5	57,9	50,2	26,8	101,0	40,5	64,0	18,5
PrC, %	100,9	96,7	105,0	102,6	37,0	194,6	88,8	113,1	20,9
NO, мкмоль/мл	81,5	74,9	88,0	80,1	28,0	207,9	57,0	105,1	33,2
АГ к vWF, мкг/мл	0,94	0,89	0,99	0,93	0,30	1,35	0,84	1,06	0,20
ЛПИ	0,54	0,48	0,59	0,50	0,00	1,30	0,37	0,71	0,27

Таблица 7 – Исследуемые параметры среди пациентов с окклюзией артерий подвздошно-бедренного сегмента, n=33

	Среднее значение	ДИ 95%	ДИ 95%	Медиана	Min	Max	НК	БК	СКО, $\sigma$
Возраст, лет	60,7	58,0	63,4	61,0	47,0	78,0	55,0	66,0	7,5
FVIII, %	150,6	133,9	167,3	151,1	68,7	250,0	112,0	187,0	47,1
vWF, %	392,7	274,8	510,7	300,0	150,0	1200,0	160,0	320,0	332,6
РАI-1, нг/мл	96,1	81,6	110,6	88,3	28,0	162,3	65,3	119,7	40,9
sEPCR, нг/мл	66,4	58,9	73,8	63,7	30,2	101,9	50,8	79,2	21,0
PrC, %	98,0	90,9	105,1	98,0	46,0	130,0	90,0	113,0	20,0
NO, мкмоль/мл	79,9	70,3	89,6	80,1	36,0	131,8	55,0	100,5	27,3
АГ к vWF, мкг/мл	0,92	0,84	1,01	0,92	0,49	1,34	0,83	1,03	0,20
ЛПИ	0,48	0,37	0,60	0,57	0,00	1,00	0,21	0,64	0,29

Таблица 8 – Исследуемые параметры среди пациентов с окклюзией подколенной артерии, n=4

	Среднее значение	ДИ 95%	ДИ 95%	Медиана	Min	Max	НК	БК	СКО, $\sigma$
Возраст, лет	64,5	62,9	66,1	65,0	63,0	65,0	64,0	65,0	1,0
FVIII, %	162,1	18,4	305,7	128,6	96,1	295,0	107,5	216,6	90,3
vWF, %	375,0	136,3	613,7	300,0	300,0	600,0	300,0	450,0	150,0
РАI-1, нг/мл	73,3	43,3	103,2	72,1	56,9	92,0	57,1	89,5	18,8
sEPCR, нг/мл	44,6	32,9	56,3	42,3	38,8	55,2	39,7	49,6	7,4
PrC, %	114,7	85,3	144,1	118,0	92,8	130,0	99,4	130,0	18,5
NO, мкмоль/мл	72,3	39,1	105,5	82,1	41,1	84,0	61,0	83,7	20,9
АГ к vWF, мкг/мл	0,88	0,62	1,13	0,90	0,67	1,04	0,75	1,00	0,16
ЛПИ	0,75	0,21	1,28	0,84	0,50	0,90	0,50	0,90	0,22

Таблица 9 – Исследуемые параметры среди пациентов с синдромом Лериша, n=10

	Среднее значение	ДИ 95%	ДИ 95%	Медиана	Min	Max	НК	БК	СКО, $\sigma$
Возраст, лет	64,3	60,5	68,0	65,5	49,0	76,0	60,5	69,0	7,1
FVIII, %	145,6	117,9	173,4	141,0	81,5	293,6	111,2	168,1	52,1
vWF, %	431,9	241,9	621,9	320,0	120,0	1200,0	160,0	620,0	356,6
РАI-1, нг/мл	102,7	79,8	125,6	102,9	32,1	159,3	67,3	142,5	39,7
sEPCR, нг/мл	56,8	49,2	64,4	55,3	38,5	90,1	44,3	67,3	14,3
PrC, %	97,6	85,5	109,7	98,0	49,4	130,0	83,3	114,0	22,7
NO, мкмоль/мл	77,5	58,8	96,2	76,1	19,0	142,5	57,0	100,5	35,0
АГ к vWF, мкг/мл	1,12	0,93	1,31	1,09	0,78	1,40	1,02	1,26	0,20
ЛПИ	0,50	0,29	0,71	0,52	0,00	1,00	0,28	0,64	0,29

Таблица 10 – Исследуемые параметры среди пациентов с многоуровневым поражением, n=19

	Среднее значение	ДИ 95%	ДИ 95%	Медиана	Min	Max	НК	БК	СКО, $\sigma$
Возраст, лет	60,1	55,2	64,9	62,0	39,0	67,0	59,0	66,0	8,0
FVIII, %	156,2	105,2	207,2	115,0	47,7	294,0	101,1	250,0	84,4
vWF, %	471,5	248,1	695,0	300,0	150,0	1200,0	160,0	640,0	369,7
РАI-1, нг/мл	83,4	61,7	105,1	79,5	30,2	133,5	56,1	113,4	34,1
sEPCR, нг/мл	56,6	45,4	67,8	52,2	29,2	95,0	43,5	72,6	18,5
PrC, %	96,3	89,4	103,2	94,7	79,0	119,0	90,0	103,9	11,4
NO, мкмоль/мл	82,6	61,1	104,2	90,0	27,0	142,1	56,7	104,3	35,7
АГ к vWF, мкг/мл	0,95	0,77	1,13	0,99	0,64	1,21	0,76	1,12	0,22
ЛПИ	0,40	0,24	0,56	0,42	0,00	0,69	0,33	0,50	0,20

Уровень РАI-1 при включении в исследование у пациентов с подвздошно-бедренной окклюзией был статистически значимо выше, чем у больных с бедренно-подколенной окклюзией, и составил 88,3нг/мл (65,3-119,7) и 76,2нг/мл (41,7-107,8), соответственно ( $p=0,042$ ). Таким образом, уровень РАI-1 при включении в исследование у пациентов с подвздошно-бедренной окклюзией был в среднем на 13,7% выше, чем у больных с бедренно-подколенной окклюзией.

Уровень sEPCR отличался в зависимости от уровня поражения артериального русла: при подколенно-берцовой окклюзии уровень изучаемого параметра составил 42,25нг/мл (39,7-49,55), при бедренно-подколенной окклюзии - 50,2нг/мл (40,5-64), при подвздошно-бедренной окклюзии - 63,7нг/мл (50,8-79,2); все межгрупповые различия были статистически значимыми ( $p<0,001$ ).

В среднем уровень метаболитов оксида азота II (суммарная концентрация нитратов и нитритов) при включении в исследование составил 80,7 (56-104)

мкмоль/мл, что в целом соответствовало уровню нитритов (72-80 мкмоль/мл) среди здоровых добровольцев согласно проведенным ранее исследованиям (Калинин Р.Е. и соавт., 2018) [27]. Проведенный дальнейший анализ связи содержания метаболитов оксида азота (нитратов и нитритов) и развития осложнений ЗПА позволил выявить характер изменения уровня показателя в зависимости от степени выраженности дисфункции эндотелия.

*Сравнение показателей среди всех пациентов в исследовании в зависимости от стадии заболевания*

Уровни исследуемых показателей в зависимости от стадии заболевания представлены в таблице 11 у пациентов с IIб стадией заболевания, в таблице 12 – с III стадией заболевания, таблице 13 – с IV стадией заболевания.

Таблица 11 – Исследуемые параметры среди пациентов с IIб стадией заболевания, n=63

	Среднее значение	ДИ 95%	ДИ 95%	Медиана	Min	Max	НК	ВК	СКО, $\sigma$
Возраст, лет	60,2	58,4	62,0	61,0	40,0	73,0	56,0	66,0	7,2
FVIII, %	137,2	123,3	151,2	130,4	46,6	295,0	96,6	163,8	55,4
vWF, %	339,8	276,4	403,3	300,0	150,0	1200,0	160,0	320,0	252,0
РАI-1, нг/мл	84,8	73,2	96,3	78,0	21,3	166,1	43,1	133,5	45,8
sEPCR, нг/мл	49,4	46,2	52,6	48,2	28,1	100,0	40,6	54,0	12,8
PrC, %	103,1	97,6	108,6	103,3	37,0	194,6	92,1	113,8	21,9
NO, мкмоль/мл	81,2	73,5	89,0	80,1	33,6	207,9	56,7	97,4	30,8
АГ к vWF, мкг/мл	0,92	0,88	0,97	0,91	0,53	1,40	0,83	1,00	0,16
ЛПИ	0,59	0,53	0,65	0,58	0,17	1,30	0,46	0,72	0,22

Таблица 12 – Исследуемые параметры среди пациентов с III стадией заболевания, n=75

	Среднее значение	ДИ 95%	ДИ 95%	Медиана	Min	Max	НК	БК	СКО, $\sigma$
Возраст, лет	64,3	62,4	66,2	66,0	43,0	83,0	59,0	68,0	8,2
FVIII, %	164,2	148,7	179,6	155,8	38,4	347,5	107,9	205,6	66,7
vWF, %	531,9	438,6	625,1	320,0	120,0	1200,0	160,0	640,0	405,4
РАI-1, нг/мл	83,3	73,8	92,8	78,5	18,0	247,2	57,3	103,5	40,1
sEPCR, нг/мл	62,6	58,1	67,2	61,8	28,9	101,9	48,6	72,6	19,7
PrC, %	99,5	95,5	103,5	98,7	46,0	130,0	90,0	111,2	17,4
NO, мкмоль/мл	80,5	72,8	88,2	77,8	19,0	184,8	56,0	106,0	33,5
АГ к vWF, мкг/мл	0,97	0,90	1,03	1,00	0,30	1,35	0,83	1,15	0,24
ЛПИ	0,46	0,38	0,54	0,42	0,00	1,08	0,25	0,64	0,30

Таблица 13 – Исследуемые параметры среди пациентов с IV стадией заболевания, n=29

	Среднее значение	ДИ 95%	ДИ 95%	Медиана	Min	Max	НК	БК	СКО, $\sigma$
Возраст, лет	62,8	59,3	66,4	62,5	39,0	78,0	60,0	67,5	9,1
FVIII, %	129,1	105,9	152,3	130,0	36,6	274,0	81,6	146,0	60,9
vWF, %	519,3	357,5	681,2	300,0	120,0	1200,0	160,0	800,0	425,5
РАI-1, нг/мл	90,6	73,6	107,5	84,0	13,0	162,3	56,0	126,4	44,6
sEPCR, нг/мл	58,2	49,3	67,1	52,9	26,8	100,7	40,8	79,0	23,4
PrC, %	94,2	85,5	102,9	92,0	49,4	130,0	85,0	107,0	22,8
NO, мкмоль/мл	79,8	67,7	91,8	82,0	27,0	139,8	55,0	105,1	31,7
АГ к vWF, мкг/мл	0,94	0,85	1,03	0,95	0,58	1,34	0,85	1,05	0,18
ЛПИ	0,44	0,31	0,57	0,40	0,00	1,00	0,20	0,61	0,27

Отмечались статистически значимые различия уровня ЛПИ в зависимости от стадии заболевания, значения которого составили 0,59 (0,22; 0,53-0,65) при IIб стадии заболевания, 0,46 (0,3; 0,38-0,54) при III стадии заболевания и 0,44 (0,27; 0,31-0,57) при IV стадии заболевания ( $p < 0,05$ ).

Уровень sEPCR статистически значимо различался в зависимости от стадии заболевания, составив при IIб стадии заболевания 48,2 нг/мл (40,6-54), при III стадии заболевания – 61,8 нг/мл (48,6-72,6) ( $p < 0,001$ ). Изучение показателя sEPCR показало, что наиболее высокий его уровень отмечался при проксимальных поражениях артериального русла с максимальными значениями sEPCR, выявленными у пациентов с подвздошно-бедренной окклюзией – 63,7 нг/мл (50,8-79,2) ( $p < 0,01$ ). Кроме того, для более тяжелой стадии хронической ишемии также были характерны повышенные уровни sEPCR: так, у пациентов с III стадией заболевания показатель был на 22% выше, чем у больных с IIб стадией ( $p < 0,001$ ). Ранее проведенные исследования показали, что повышенные уровни sEPCR были ассоциированы с полом, уровнем тканевого фактора, диабетом, а также маркерами нарушенной функции почек, креатинином и цистатином C [70].

Активность vWF была статистически значимо выше у пациентов при III стадии заболевания по сравнению с IIб стадией и составила 320 % (160-640) и 300 % (160-320), соответственно ( $p = 0,024$ ). В рамках текущего исследования в целом у пациентов отмечалась повышенная по сравнению с нормальными значениями (70-150%) активность vWF, что может свидетельствовать о тяжести дисфункции эндотелия и сосудистого воспаления, степень выраженности которых растет по мере прогрессирования ишемии [1].

Активность фактора VIII отличалась в зависимости от стадии заболевания: при IIб стадии заболевания активность VIII составила 130,4% (96,6-163,8), при III стадии заболевания - 155,8% (107,9-205,6), при IV стадии заболевания - 130% (81,6-146); все межгрупповые различия были статистически значимыми ( $p < 0,05$ ). Фактор VIII (FVIII) циркулирует совместно с фактором Виллебранда, который его стабилизирует. Нами было выявлено, что аналогично повышенной активности vWF при III стадии заболевания, отмечалась более высокая активность фактора

FVIII по сравнению с IIb стадией ( $p < 0.05$ ). Интересным представляется факт, что при IV стадии заболевания было выявлено статистически значимое снижение активности FVIII ( $p < 0,05$ ), что может свидетельствовать об истощении коагуляционного (гемостатического) потенциала у пациентов с тяжелыми формами критической ишемии. Эти данные соответствуют недавней публикации 2020г., авторы которой сообщают о том, что среди пациентов с ишемией угрожающей потерей конечностей отмечалось снижение активности как естественных антикоагулянтов (протеинов C и S), так и факторов коагуляции IX, XI, XII [258].

Данные по активности и уровню маркеров гемостатического звена дисфункции эндотелия и факторов свертывания у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями довольно противоречивы. Недавнее исследование, проведенное группой исследователей во главе с Small A.M. (2020) и посвященное изучению менделевской рандомизации, показало, что генетически детерминированные уровни VIII и vWF ассоциированы с заболеваниями периферических артерий [79].

*Сравнение показателей среди всех пациентов в исследовании в зависимости от сопутствующих заболеваний*

Лодыжечно-плечевой индекс в среднем был ниже у пациентов с сопутствующей гипертонической болезнью по сравнению с лицами без артериальной гипертензии, составив 0,47 (0,26 ДИ95% 0,42-0,53) и 0,59 (0,27 ДИ95% 0,51-0,67), соответственно ( $p = 0,014$ ). Таким образом, лодыжечно-плечевой индекс в среднем был на 0.12 ниже у пациентов с сопутствующей гипертонической болезнью ( $p = 0,014$ ), что следует учитывать при интерпретации показателей ЛПИ у больных с артериальной гипертензией; полученные данные соответствуют имеющимся эпидемиологическим данным по изучению ЛПИ в разных популяциях в зарубежных странах [62].

Уровень PAI-1 в срок 3 месяца у пациентов с ИБС составил 104,1нг/мл (64,45-150,55) по сравнению с 80нг/мл (56-105,4) у лиц без ИБС ( $p = 0,027$ ). Кроме

того, уровень PAI-1 при наличии постинфарктного кардиосклероза (ПИКС) в анамнезе был статистически значимо выше по сравнению с лицами без инфаркта в анамнезе, составив 105 нг/мл (96-151) и 82,8 нг/мл (56-113,8), соответственно ( $p=0,021$ ). О связи PAI-1 и тромботических событий известно, однако большинство проведенных исследований подтвердили связи с инсультом [198] и ВТЭО [203], в то время как информация о связи между PAI-1 и ЗПА ограничена. Влияние PAI-1 на неблагоприятные исходы атеросклероза может быть связано с непосредственным эффектом PAI-1 на ингибирование фибринолиза, а также с его функцией в регуляции миграции гладкомышечных клеток в сосудистой стенке [122]. Выявление нами повышенных уровней PAI-1 у пациентов с ЗПА атеросклеротической этиологии, в том числе с сопутствующей ИБС, соответствует опубликованной в 2018г. информации, свидетельствующей о том, что уровень PAI-1 ассоциирован с неблагоприятными сердечно-сосудистыми исходами. Таким образом, PAI-1 может рассматриваться в качестве маркера сердечно-сосудистой патологии, такой как ЗПА и ИБС, а также в качестве потенциальной терапевтической мишени [69].

У пациентов с гипертонической болезнью отмечался повышенный уровень sEPCR по сравнению с лицами без артериальной гипертензии, составив 53,2 нг/мл (44,9-72,3) и 48,7 нг/мл (40,6-61,2), соответственно ( $p=0,028$ ).

#### *Сравнение исследуемых показателей в зависимости от исходов заболевания*

К статистическому анализу через 1 год наблюдения были доступны данные 158 пациентов. Общее количество случаев выявления прогрессирования заболевания в течение года наблюдения составило 21 (13,3%), инфарктов миокарда – 10 (6,3%), летальных исходов – 8 (5%), злокачественных новообразований – 13 (8,2%), ишемического инсульта – 1 (0,6%). Структура исходов заболевания, включая развитие рестеноза и тромбоза зоны реконструкции, подробно представлена в последующих разделах при описании групп в зависимости от проведенного вида лечения для возможности детального

анализа развития осложнений и их связи с параметрами гемостатического звена дисфункции эндотелия.

У пациентов, у которых в течение года наблюдения развился инфаркт миокарда, отмечалась повышенная активность FVIII по сравнению с пациентами, у которых не отмечался инфаркт, 191,9 % (138,2-274) и 133,9 % (100-178,4), соответственно ( $p=0,047$ ).

Антиген к фактору vWF (уровень vWF) в срок 3 месяца после инвазивных вмешательств был статистически значимо выше у пациентов, у которых в течение года развился летальный исход: 1,075мкг/мл (0,96-1,16) против 0,9мкг/мл (0,73-1,08) ( $p=0,032$ ). Полученные данные свидетельствуют о том, что повышенные активность FVIII и уровни антигена к фактору vWF у пациентов с ЗПА, кому выполняются инвазивные вмешательства, могут служить важными маркерами развития тяжелых неблагоприятных исходов.

Пониженные значения ЛПИ в срок 3 месяца после инвазивного лечения ассоциировались с прогрессированием периферического атеросклероза в течение года после вмешательств, составив 0,57 (0,5-0,76) у лиц с прогрессированием и 0,92 (0,65-1,035) без ( $p=0,006$ ).

Оценка динамики ЛПИ в зависимости от проведенного исследования показала, что пониженные значения ЛПИ в срок 3 месяца после инвазивного лечения ассоциировались с прогрессированием атеросклероза в течение года после вмешательств ( $p=0,006$ ), т.о. данный простой и малоинвазивный метод исследования, выполненный в послеоперационном периоде, может достоверно свидетельствовать о неблагоприятном прогнозе в отношении прогрессирования заболевания.

#### *Оценка корреляционных связей среди всех пациентов в исследовании*

Оценка корреляционных связей среди пациентов в исследовании показала следующие связи:

1. Активность FVIII и vWF ( $r=+0,503$ ) (рисунок 20);

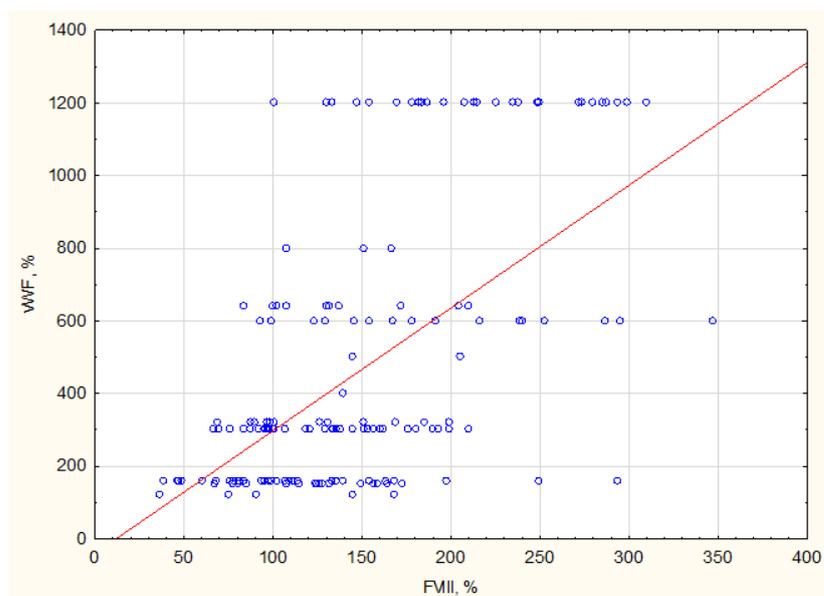


Рисунок 20 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности vWF и FVIII у пациентов в исследовании

2. уровень sEPCR и ЛПИ ( $r=-0,362$ ) (рисунок 21).

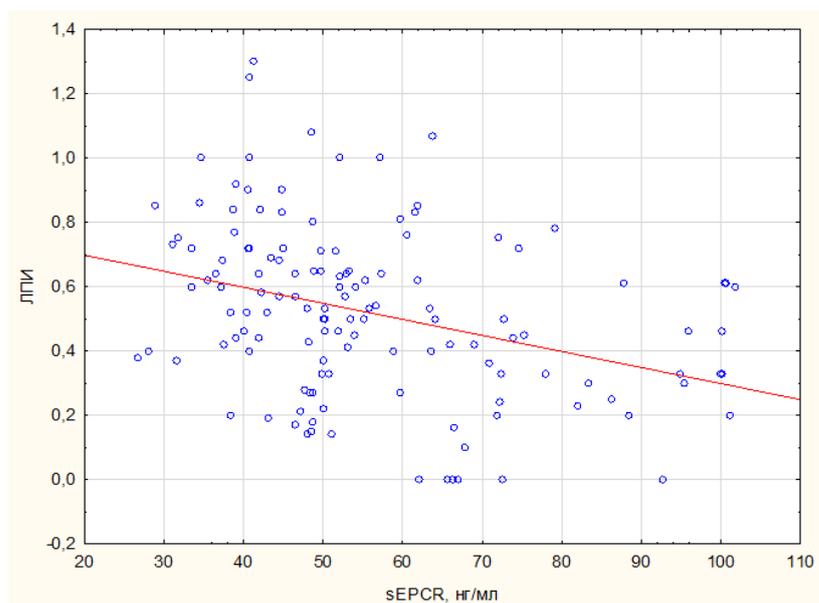


Рисунок 21 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров уровня sEPCR и ЛПИ у пациентов в исследовании

Наличие корреляционных связей между активностью FVIII и vWF соответствует биологии данных двух факторов, циркулирующих в виде комплекса и играющих важную роль в процессах гемостаза и сосудистого воспаления: vWF – мультимерный адгезионный гликопротеин, который в плазме

крови образует комплекс с VIII фактором, стабилизируя его и защищая от протеолиза протеином С [222]. Обратная корреляционная связь между уровнями sEPCR и ЛПИ соответствует полученным данным, отражающим зависимость степени тяжести дисфункции эндотелия по показателю sEPCR от степени тяжести ишемии и распространенности поражения артериального русла.

Таким образом, оценка показателей гемостатического звена дисфункции эндотелия у пациентов с ЗПА атеросклеротической этиологии показала, что данной когорте больных свойственны явления гиперкоагуляции, при этом в зависимости от уровня поражения артериального русла, стадии заболевания и сопутствующей патологии отмечаются различия в характере и степени выраженности ЭД.

#### **4.2. Роль показателей гемостатического звена дисфункции эндотелия в развитии осложнений при различных стадиях заболевания**

##### *Сравнение показателей при IIб стадии заболевания*

Оценка несвязанных совокупностей по критерию Краскелла-Уоллиса с попарными сравнениями по критерию Манна-Уитни с поправкой Бонферрони показала статистически значимые различия уровня sEPCR в консервативной и оперативной группе ( $p=0,014$ ); по критерию Манна-Уитни между активностью FVIII по ПИКС ( $p=0,006$ ), уровнем PAI-1 по СД ( $p=0,015$ ). Связь между различиями в уровнях sEPCR в зависимости от группы лечения можно объяснить тем, что в целом в группе открытых (шунтирующих) операций количество пациентов с более тяжелым поражением артериального и более высокой степенью выраженности ишемии преобладало. То есть несмотря на наличие 2б стадии заболевания, на фоне которой большинство больных успешно находились на консервативном лечении, часть пациентов с 2б стадией заболевания требовали хирургического лечения. Можно предположить, что помимо деления на стадии заболевания по дистанции ходьбы, наличию болей покоя или язвенно-некротических проявлений, должно существовать разделение пациентов по

«биохимическим» и/или «коагуляционным» степеням тяжести заболевания, которые соответствуют степени выраженности эндотелиальной дисфункции. Изучение связи активности FVIII и наличием ПИКС в анамнезе соответствует мировым литературным данным о том, что активность факторов свертывания, в т.ч. FVIII, играет важную роль в развитии больших сердечно-сосудистых событий: так, высокая активность FVIII отмечалась у пациентов с острым коронарным синдромом [84].

#### *Оценка корреляционных связей при IIб стадии заболевания*

Оценка корреляционных связей при IIб стадии заболевания показала, что значимых корреляций по Пирсону нет. По Спирмену отмечены корреляции между активностью FVIII и vWF ( $\rho=+0,448$ ,  $p<0,001$ ) (рисунок 22), активностью FVIII и уровнем sEPCR ( $\rho=-0,25$ ,  $p=0,048$ ) (рисунок 23), активностью vWF и уровнем PAI-1 ( $\rho=-0,331$ ,  $p=0,008$ ) (рисунок 24), а также уровнями PAI-1 и метаболитов NO ( $\rho=-0,255$ ,  $p=0,044$ ) (рисунок 25).

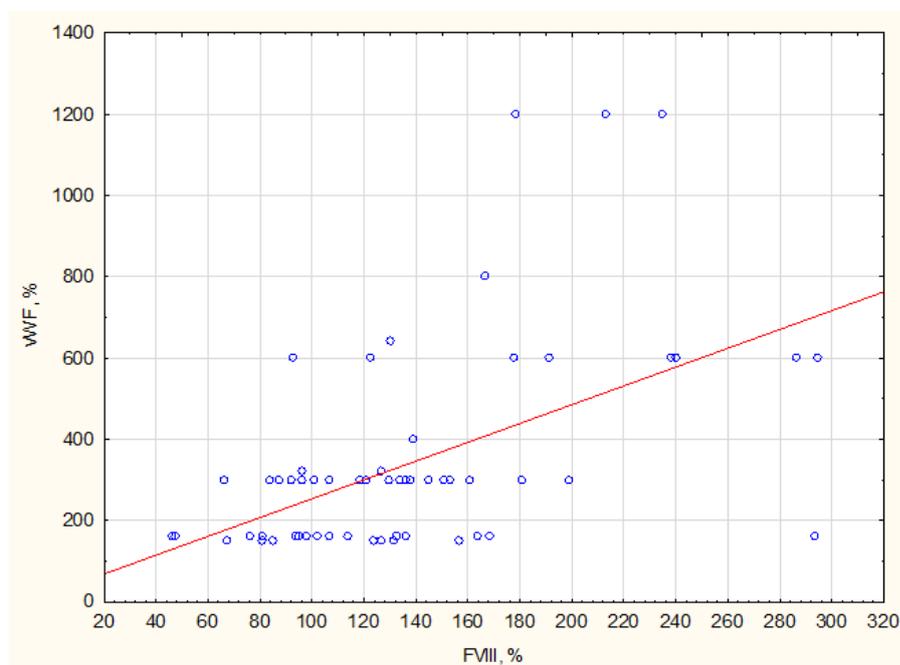


Рисунок 22 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности vWF и FVIII у пациентов с IIб стадией заболевания

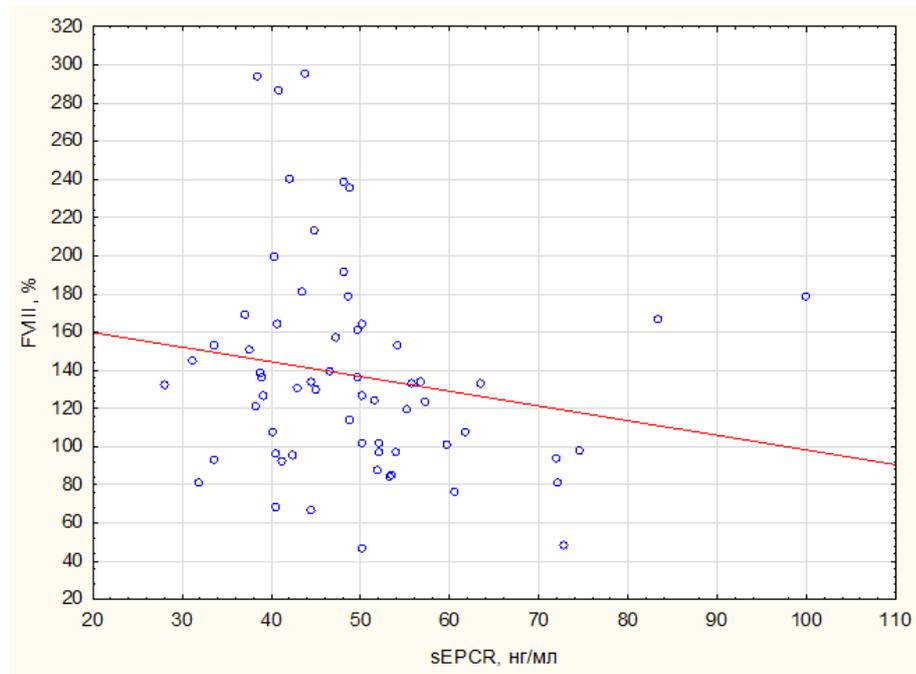


Рисунок 23 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности FVII и уровня sEPCR у пациентов с Пб стадией заболевания

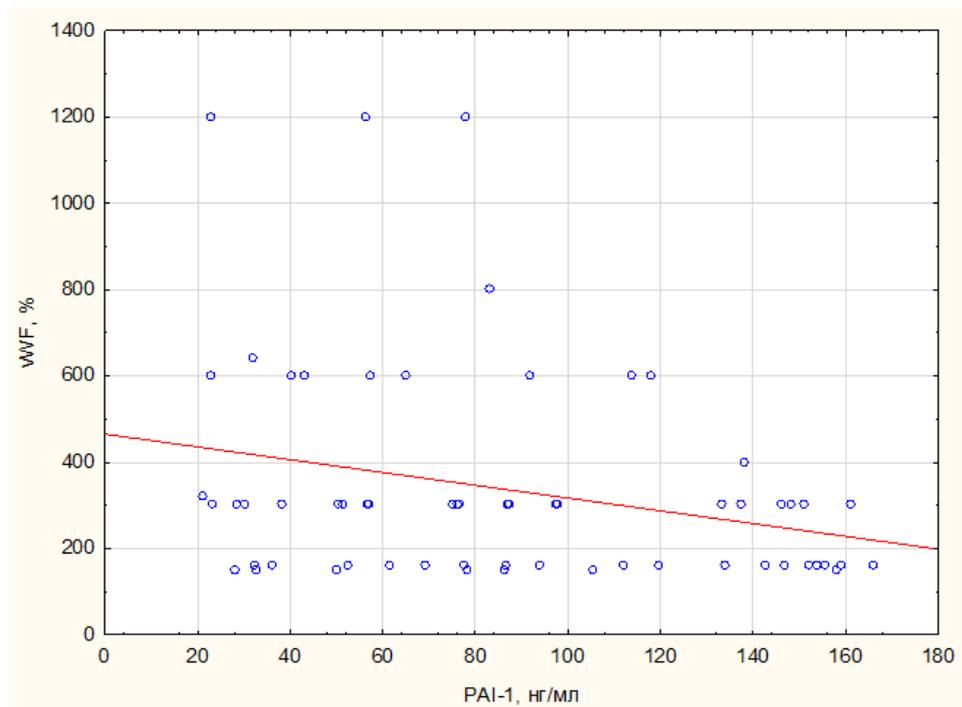


Рисунок 24 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности vWF и уровня PAI-1 у пациентов с Пб стадией заболевания

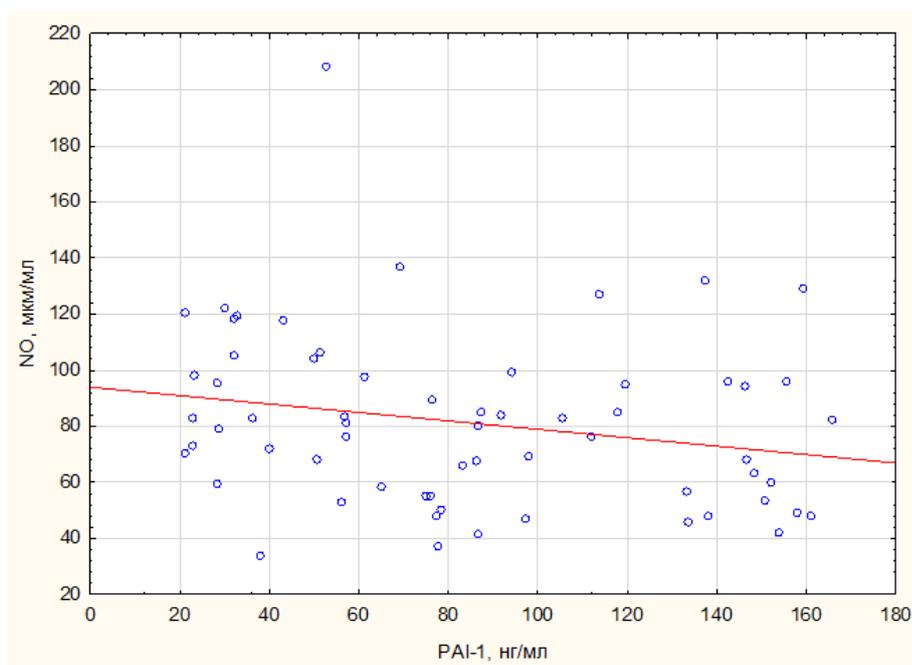


Рисунок 25 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров уровней метаболитов NO и уровня PAI-1 у пациентов с IIб стадией заболевания

Выявленные корреляции между активностью FVIII и vWF объясняются особенностями обмена этих гликопротеинов: FVIII образует комплекс с фактором Виллебранда [117]; корреляции между активностью FVIII и vWF и уровнем NO отражают степень выраженности ЭД: более высокие уровни активности FVIII, характерные для гемостатического звена дисфункции эндотелия, соответствовали более низким уровням метаболитов NO.

Статистическая обработка данных показала обратную связь между активностью FVIII и уровнем sEPCR, а также активностью vWF и уровнем PAI-1, несмотря на ожидаемое наличие прямой связи, с учетом того, что все указанные показатели являются показателями ЭД коагуляционного и/или воспалительного профиля. Вероятно, данные явления могут быть связаны с особенностями тонких биохимическим механизмов, лежащих в основе гемостаза, нацеленных на поддержание баланса между свертывающей и противосвертывающей системами; важную роль при этом играет непосредственно эндотелий.

Корреляция между уровнями PAI-1 и метаболитов оксида азота II может быть объяснена имеющейся информацией о том, что оксид азота задействован в различных сигнальных путях, которые оказывают влияние на экспрессию PAI-1 эндотелиальными клетками [95].

#### *Оценка качественных данных при IIб стадии заболевания*

Выявлены статистически значимые различия наблюдаемых и ожидаемых частот у пациентов мужского и женского пола, страдающих гипертонической болезнью по точному критерию Фишера ( $p=0,019$ ), связь по критерию Фи положительная (+0,317). Гипертоническая болезнь наблюдается скорее у лиц мужского пола с ЗПА. При оценке связей между предполагаемыми факторами риска и исходами по критериям Хи-квадрат, точному критерию Фишера, Фи, Крамер V значимых различий не выявлено. Исследование показало, что гипертоническая болезнь наблюдалась чаще среди лиц мужского пола с ЗПА по сравнению с лицами женского пола, что диктует целесообразность четкого контроля факторов риска у больных с ЗПА атеросклеротической этиологии с учётом пола пациентов.

#### *Сравнение показателей при III стадии заболевания*

Оценка несвязанных совокупностей показала статистически значимые различия уровня sEPCR по мужскому и женскому полу ( $p=0,011$ ), активности FVIII и уровню sEPCR по ИБС ( $p=0,003$  и  $p=0,032$ , соответственно), активности FVIII по исходу инфаркт миокарда ( $p=0,005$ ).

Межполовые различия в уровне sEPCR могут быть ассоциированы с возможным наличием генетической предрасположенности: литературные данные говорят о том, что наличие гаплотипа A3 гена EPCR было ассоциировано с более высокими уровнями sEPCR в крови у женщин [46].

Изучение связи активности FVIII и развитием инфаркта миокарда соответствует литературным данным о важной взаимосвязи между активностью факторов коагуляции, ИБС и ее осложнениями.

### Оценка корреляционных связей при III стадии заболевания

Оценка корреляционных связей при III стадии заболевания по Пирсону показала корреляции между активностью FVIII и уровнем метаболитов NO ( $r_{xy} = -0,416$ ,  $p < 0,001$ ) (рисунок 26), уровнями PAI-1 и уровнем метаболитов NO ( $r_{xy} = +0,289$ ,  $p = 0,015$ ) (рисунок 27), уровнем sEPCR и ЛПИ ( $r_{xy} = -0,368$ ,  $p = 0,006$ ) (рисунок 28).

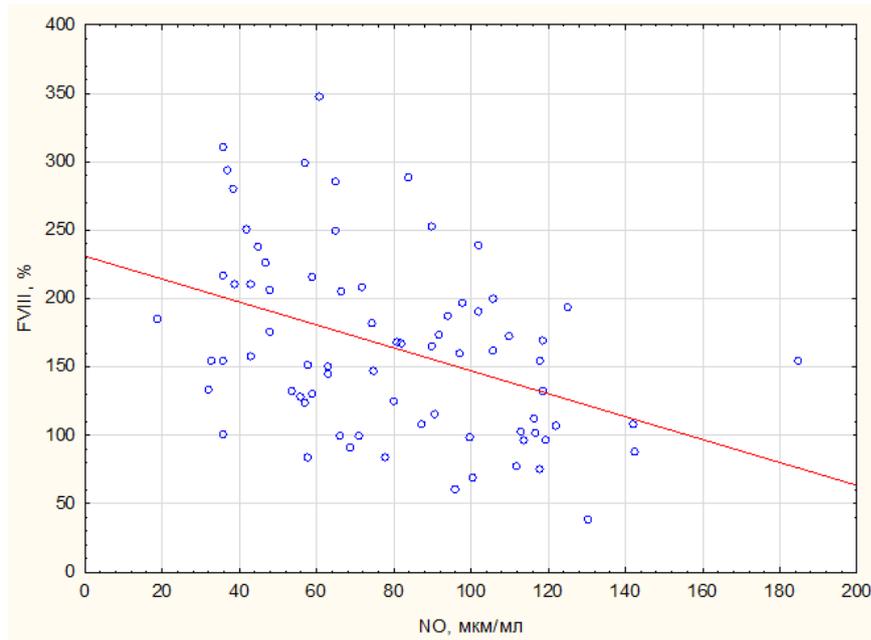


Рисунок 26 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности FVIII и уровня метаболитов NO у пациентов с III стадией заболевания

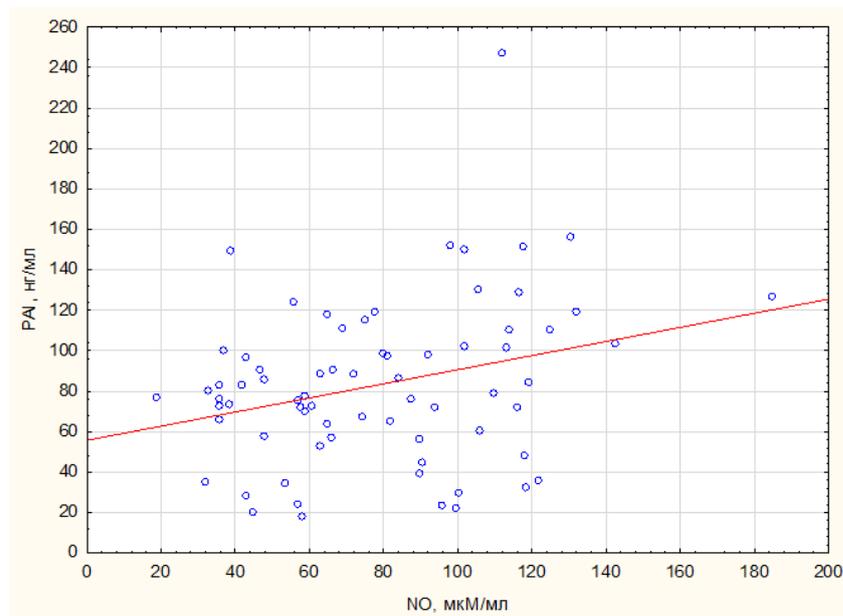


Рисунок 27 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров уровня PAI-1 и метаболитов NO у пациентов с III стадией заболевания

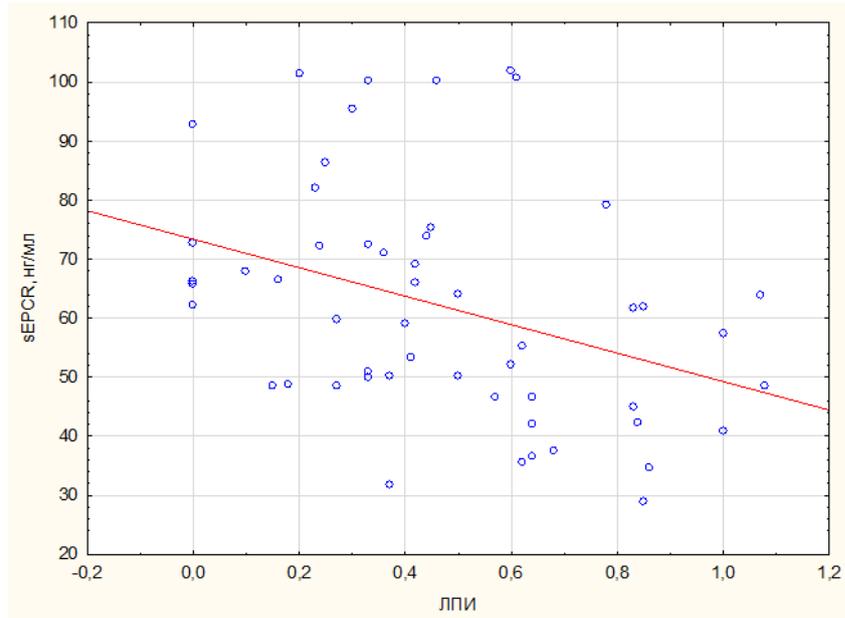


Рисунок 28 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров уровня sEPCR и ЛПИ у пациентов с III стадией заболевания

Оценка корреляционных связей при III стадии заболевания по Спирмену показала корреляции между активностью FVIII и vWF ( $\rho=+0,537$ ,  $p<0,001$ ) (рисунок 29), а также активностью vWF и уровнем метаболитов NO ( $\rho=-0,32$ ,  $p=0,005$ ) (рисунок 30).

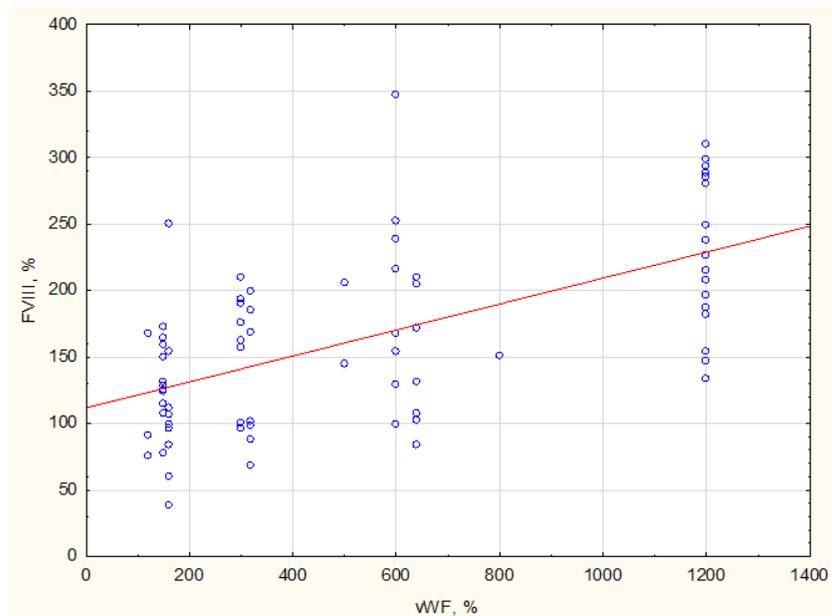


Рисунок 29 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности vWF и FVIII у пациентов с III стадией заболевания

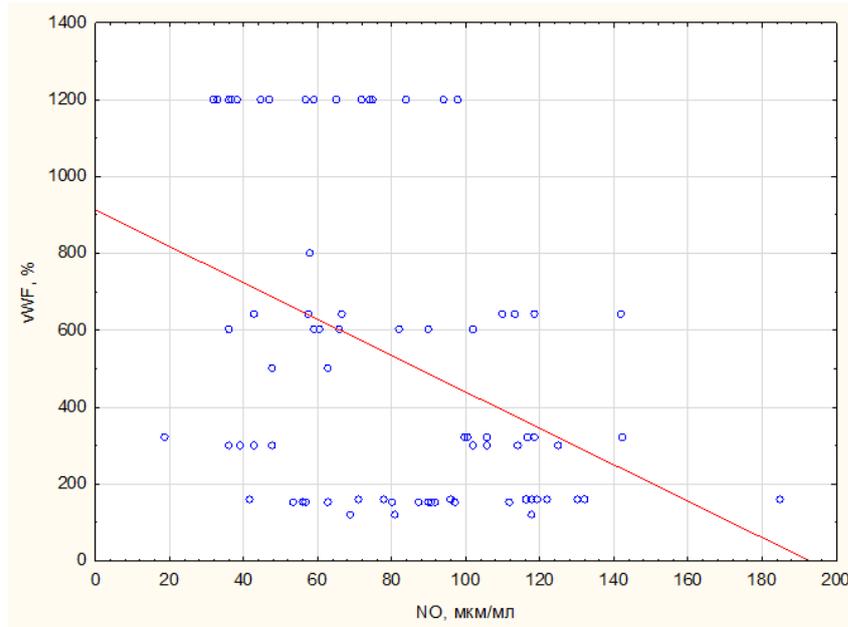


Рисунок 30 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности vWF и уровня метаболитов NO у пациентов с III стадией заболевания

Корреляции между активностью FVIII и vWF, а также между уровнями PAI-1 и метаболитов оксида II (NO) описаны выше при анализе показателей среди пациентов с II стадией заболевания. Корреляция между уровнем sEPCR и ЛПИ соответствует приведенным ранее данным: чем выраженнее протяженность и степень поражения артерий (и ниже ЛПИ), тем выше был уровень sEPCR.

#### *Оценка качественных данных при III стадии заболевания*

Выявлены статистически значимые различия наблюдаемых и ожидаемых частот у пациентов с ИБС и смертельным исходом по точному критерию Фишера ( $p=0,021$ ), связь по критерию Фи положительная (+0,296), У пациентов с ИБС более высока вероятность наступления смертельного исхода. Отношение рисков – 8,846 с 95% ДИ 1,091-71,698. Риск смертельного исхода у пациентов с ИБС в 8.846 раз выше, чем у пациентов без ИБС. Полученные данные подтверждают важность системного подхода к лечению пациентов с ЗПА ввиду высоких рисков развития осложнений, включая летальные исходы, в случае наличия мультифокального атеросклероза с вовлечением коронарных артерий [74].

### Сравнение показателей при IV стадии заболевания

Оценка независимых выборок по критерию Манна-Уитни показала следующие статистически значимые различия: активности FVIII в зависимости от пола ( $p=0,017$ ), ЛПИ в зависимости от наличия СД ( $p=0,007$ ), уровня sEPCR по исходу рестеноз ( $p<0,001$ ). Разница в активности факторов свертывания между лицами мужского и женского пола описана в литературе [250]. В нашем исследовании межполовые различия были зафиксированы в отношении активности FVIII. Различия уровня ЛПИ в зависимости от наличия СД 2 типа также широко описаны в литературе [50]. Подробное описание ассоциации sEPCR и рестеноза будет приведено ниже при описании исходов лечения среди пациентов группы эндоваскулярного лечения.

### Оценка корреляционных связей при IV стадии заболевания

Оценка корреляционных связей при 4 стадии заболевания показала следующие результаты: по Пирсону корреляция между PAI-1 и NO ( $r_{xy} = +0,455$ ,  $p=0,013$ ) (рисунок 31); по Спирмену корреляция между активностью FVIII и vWF ( $\rho = +0,531$ ,  $p=0,03$ ) (рисунок 32).

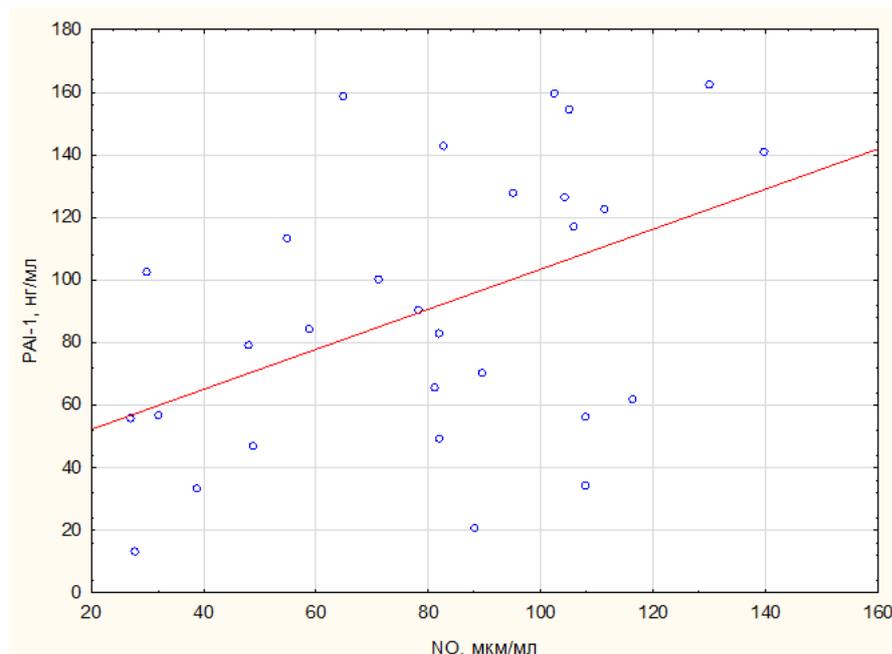


Рисунок 31 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров уровня PAI-1 и метаболитов NO у пациентов с IV стадией заболевания

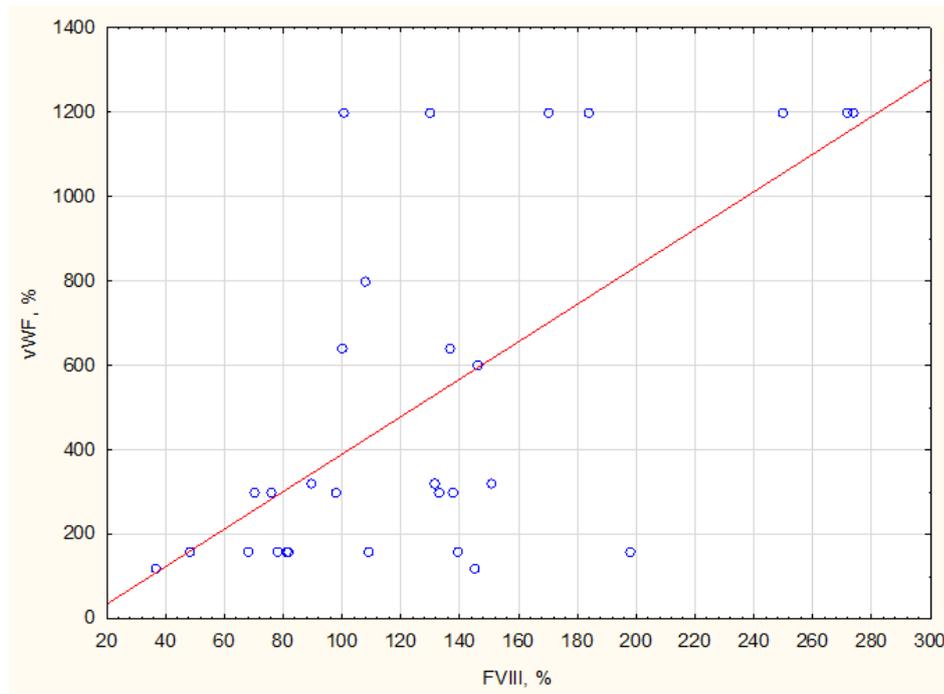


Рисунок 32 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности vWF и FVIII у пациентов с IV стадией заболевания

Корреляция между FVIII и vWF объяснима с учетом особенностей биологии вышеуказанных факторов [222]; корреляция между уровнями PAI-1 и метаболитов оксида азота описана выше.

#### *Оценка качественных данных при IV стадии заболевания*

Выявлены статистически значимые различия наблюдаемых и ожидаемых частот у пациентов с IV стадией заболевания с СД и рестенозу по точному критерию Фишера ( $p=0,044$ ), связь по критерию Фи положительная (+0,434). У пациентов с СД более высока вероятность развития рестеноза. Отношение рисков – 4,75 с 95% ДИ 1,078-20,925. Риск рестеноза у пациентов с СД в 4,75 раз выше, чем у пациентов без СД. Полученные результаты соответствуют литературным данным, свидетельствующим о повышенных рисках рестеноза после чрескожных вмешательств при наличии СД [181].

В рамках данного исследования пациенты с IV стадией заболевания были только в группах эндоваскулярного и оперативного лечения. Принадлежность к той или иной группе (по точному критерию Фишера и при расчёте отношения

рисков) никак не отразилась на исходах пациентов с IV стадией, в частности на рестенозе. Можно говорить о том, что вид вмешательства у пациентов с IV стадией заболевания не имеет значения, вероятность развития того или иного исхода у таких пациентов значимо не отличается.

Таким образом, оценка показателей гемостатического звена дисфункции эндотелия у пациентов с ЗПА атеросклеротической этиологии в зависимости от стадии заболеваний показала, что с нарастанием степени тяжести ишемии от IIб к III стадии заболевания отмечалось статистически значимое повышение активности FVIII и уровня sECPR, в то время как для больных с IV стадией заболевания было характерно снижение активности FVIII; это можно рассматривать как истощение «гемостатического потенциала» у лиц с декомпенсацией кровообращения в нижних конечностях.

### **4.3. Изучение роли показателей гемостатического звена дисфункции эндотелия в развитии осложнений в зависимости от выбранного метода лечения**

#### **4.3.1. Группа консервативного лечения**

В консервативную группу было включено 52 пациента, средний возраст которых составил 61,5 (55,5 – 66,5) лет. Больных мужского пола было 43 (82,7%) человека. Среднее значение ЛПИ составило 0,6 (0,48-0,72). Уровень поражения артериального русла, стадия заболевания, сопутствующая патология и исходы в течение года наблюдения среди пациентов консервативной группы представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Характеристики пациентов и исходы в группе консервативного лечения, n=52

Уровень поражения					
	Бедренно-подколенная окклюзия	Подвздошно-бедренная окклюзия	Подколенно-берцовая окклюзия	Многоуровневое поражение	Синдром Лериша
N	35	10	3	2	2
%	67,3	19,23	5,77	3,85	3,85
Стадия заболевания	II Б	III	IV		
N	49	3	0		
%	94,23	5,77	0		
Сопутствующая патология					
N (% в подгруппе)	Вид патологии				
11 (21,15%)	Артериальная операция в анамнезе				
3 (5,77%)	ПИКС				
10 (19,23%)	ИБС				
3 (5,77%)	СД 2 типа				
20 (38,46%)	ГБ в анамнезе				
Исходы					
N (%)	Тип исхода				
7 (13,46 %)	Прогрессирование заболевания				
3 (5,77%)	Онкология				
4 (7,69%)	ОИМ				

В связи с компенсацией кровообращения в нижних конечностях необходимости в оперативном вмешательстве не возникло у 6 из 7 пациентов с прогрессированием заболевания; одному пациенту потребовалось выполнение реконструктивного артериального вмешательства через 9 месяцев с момента включения в исследование. Летальных исходов не было.

Основные исследуемые параметры среди пациентов консервативной группы представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Основные исследуемые параметры среди пациентов консервативной группы, n=52

	Среднее	ДИ - 95%	ДИ 95%	Медиана	Min	Max	НК	БК	$\sigma$
Возраст, лет	60,69	58,40	62,98	61,50	40,00	81,00	55,50	66,50	8,23
FVIII, %	133,11	120,73	145,48	131,10	66,70	286,50	97,25	153,70	44,45
vWF, %	291,73	249,30	334,16	300,00	150,00	640,00	160,00	300,00	152,41
PAI-1, нг/мл	83,90	70,84	96,96	77,65	21,30	166,10	39,25	129,90	46,89
sEPCR, нг/мл	47,44	44,74	50,13	48,15	28,10	74,60	40,50	52,75	9,68
PrC, %	105,65	99,77	111,52	106,25	49,40	194,60	94,05	115,40	21,10
NO, мкмоль/мл	82,19	73,49	90,88	79,53	33,60	184,82	55,70	103,05	31,23
АГ к vWF, мкг/мл	0,89	0,85	0,93	0,90	0,53	1,20	0,83	1,00	0,13
ЛПИ	0,60	0,54	0,66	0,59	0,15	1,25	0,48	0,72	0,20

*Оценка внутригрупповых различий в группе консервативного лечения  
Сравнение показателей среди пациентов консервативной группы в зависимости от уровня поражения*

Отмечалась схожая тенденция аналогично результатам, полученным среди всех пациентов в исследовании, в отношении уровня PAI-1 между подвздошно-бедренной (128,6нг/мл (97,5-152,2)) и бедренно-подколенной окклюзией (69,2нг/мл (32,8-105,6)) ( $p=0,004332$ ), а также в уровне sEPCR между подвздошно-бедренной (55,5нг/мл (11,5 ДИ95% 47,21-63,71)) и бедренно-подколенной окклюзией (46,1нг/мл (8,6 ДИ95% 43,12-49,03)) ( $p=0,007273$ ).

Полученные данные свидетельствуют о том, что для различной степени поражения артериального русла нижних конечностей характерна неодинаковая степень выраженности дисфункции эндотелия гемостатического профиля: для проксимального характера поражения с вовлечением артерий подвздошно-бедренного сегмента характерны более высокие уровни PAI-1 и sEPCR по сравнению с поражением артерий бедренно-подколенного сегмента ( $p<0,05$ ).

*Сравнение показателей среди пациентов консервативной группы в зависимости от исходов заболевания*

Отмечался повышенный уровень sEPCR среди пациентов, у которых в течение года было вновь выявлено онкологическое заболевание, до 60,2 нг/мл (12,5 ДИ95% 29,12-91,28) по сравнению с лицами без опухолей 46,7 нг/мл (9,1 ДИ95% 44,05-49,26) ( $p=0,017$ ). Активность vWF была повышена у подавляющего большинства пациентов в исследовании; однако, при прогрессировании заболевания активность vWF была ниже по сравнению с лицами без такового в течение года, составив 160 % (150-300) и 300 % (160-300), соответственно ( $p=0,049$ ). Вероятно, что при прогрессировании атеросклероза не исключено «истощение» гемостатического потенциала, аналогично снижению активности FVIII у пациентов с IV стадией заболевания по сравнению с IIб и III стадиями, а также более низкими уровнями sEPCR у больных с рестенозом после эндоваскулярных операций по сравнению с лицами без рестеноза.

*Оценка корреляционных связей среди пациентов консервативной группы*

Корреляционный анализ показал наличие связи между активностью FVIII и vWF ( $r=+0,32$ ) (рисунок 33), FVIII и уровнем Ag vWF ( $r=+0,362$ ) (рисунок 34).

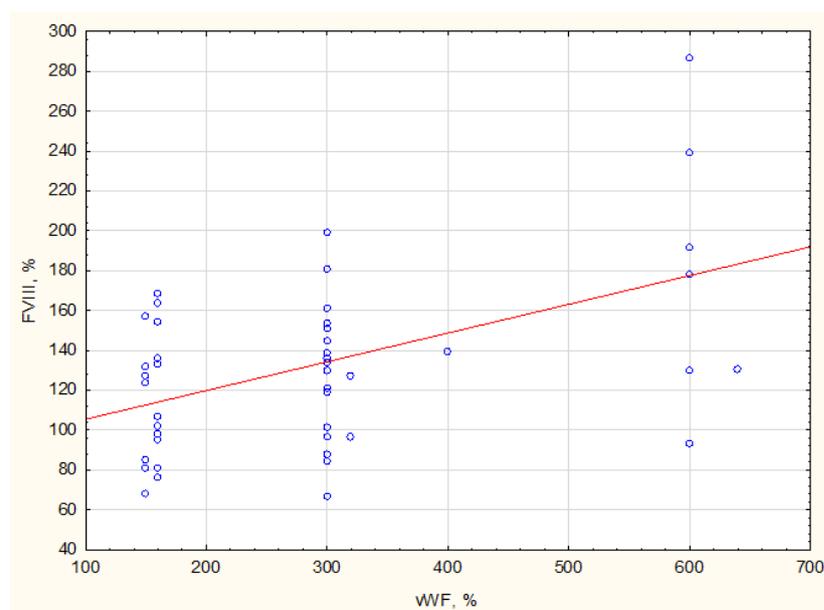


Рисунок 33 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности FVIII и vWF у пациентов консервативной группы лечения

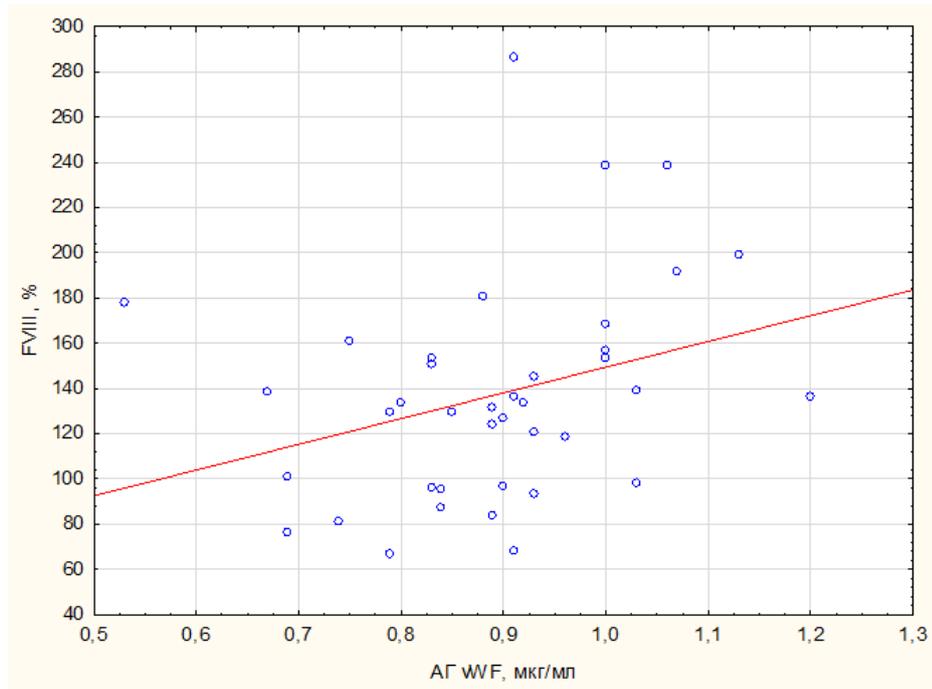


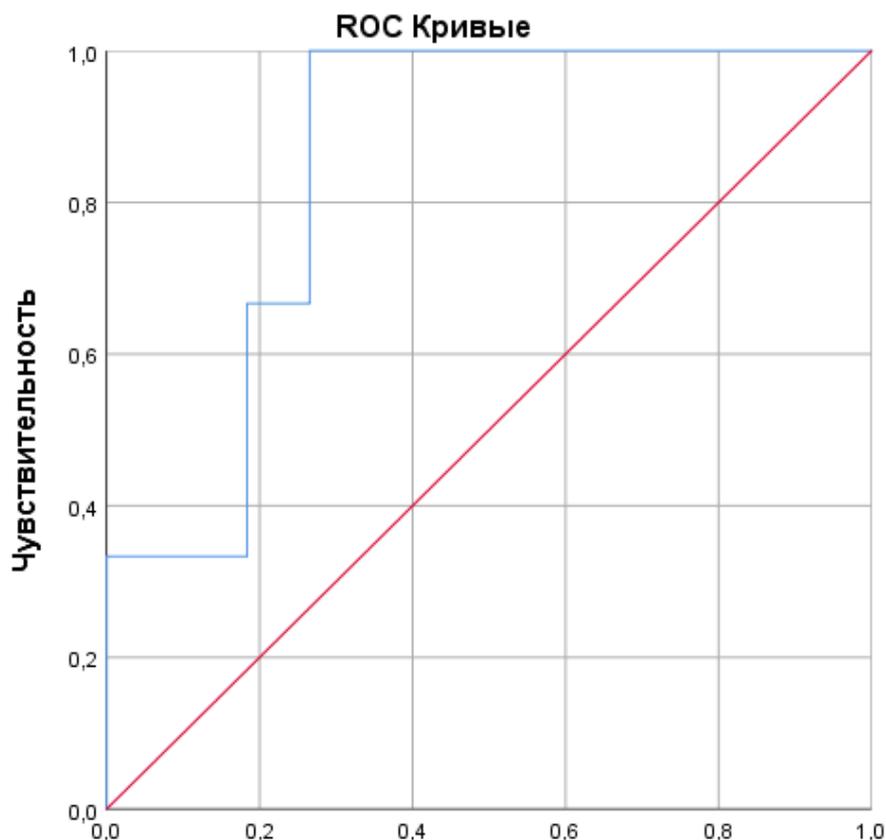
Рисунок 34 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности FVIII и уровня АГ vWF у пациентов консервативной группы лечения

Корреляционная связь между фактором коагуляции FVIII и фон Виллебранда vWF, как в отношении активности, так и уровня (антиген vWF), объясняется особенностями биологии вышеуказанных гемостатических маркеров, описанными ранее [222].

#### *Рос-анализ в группе консервативного лечения*

При проведении ROC-анализа в группе пациентов консервативного лечения с целью оценки ассоциации изученных параметров гемостатического звена дисфункции эндотелия и неблагоприятных исходов была выявлена прогностическая роль уровня sEPCR и развития онкологических заболеваний в течение года наблюдения.

Прогностическая модель зависимости уровня sEPCR и развития онкологических заболеваний в группе консервативного лечения: площадь под ROC-кривой (рисунок 35) составила  $0,85 \pm 0,076$  с 95% ДИ: 0,701-1.



### 1 - Специфичность

Рисунок 35 – ROC-кривая в прогностической модели зависимости уровня sEPCR и развития онкологических заболеваний в группе консервативного лечения

Значимость модели – 0,043. Пороговое значение sEPCR в точке cut-off, определенное с помощью индекса Юдена, – 53,75 нг/мл.

То есть ROC-анализ подтвердил связь уровня sEPCR и развития злокачественных новообразований: так, при значении sEPCR выше 53,75 нг/мл прогнозируется развитие онкологического заболевания в течение года наблюдения, при этом чувствительность и специфичность метода составили 66,7% и 81,6%, соответственно.

Полученные данные соответствуют имеющейся информации о том, EPCR могут играть важную роль в гиперкоагуляции на фоне злокачественных новообразований; известно, что рецепторы к протеину С могут выделяться злокачественными клетками, например, при лейкемии, и что уровень растворимых рецепторов протеина С может служить важным инструментом в

оценке тромботических рисков у пациентов со злокачественным новообразованиями [96, 256].

Активность vWF у пациентов с прогрессированием заболевания в течение года была ниже по сравнению с больными со стабильным течением заболевания ( $p=0,049$ ).

Не исключено, что аналогично пониженной активности FVIII у пациентов с декомпенсированной ишемией нижних конечностей, для пациентов с прогрессированием заболевания может быть характерно снижение активности vWF, отражающее истощение «гемостатического потенциала» эндотелиального профиля и высокую степень выраженности дисфункции эндотелия.

#### **4.3.2. Группа эндоваскулярного лечения**

В группу эндоваскулярного лечения вошло 55 пациентов, средний возраст которых составил 63 (57 - 69) года. Пациентов мужского пола было 48 (87,3%). Среднее значение ЛПИ составило 0,63 (0,41-0,84).

Девятнадцати (34,55%) пациентам было выполнено стентирование артерий нижних конечностей с использованием непокрытых нитиноловых стентов, тридцати шести (65,45%) – чрескожная баллонная ангиопластика.

Информация, которая отражает уровень поражения артериального русла, стадию заболевания, сопутствующую патологию и исходы (конечные точки) в течение года наблюдения среди пациентов группы эндоваскулярного лечения, доступных к анализу через 1 год (51 человек) с момента включения в исследование, представлена в табл. 16.

Таблица 16 – Характеристики пациентов и исходы в группе эндоваскулярного лечения

Уровень поражения, n=55					
	Бедренно-подколенная окклюзия	Подвздошно-бедренная окклюзия	Подколенно-берцовая окклюзия	Многоуровневое поражение	Синдром Лериша
N	34	14	1	6	0
%	61,82	25,45	1,82	10,91	0
Стадия заболевания, N=55	II Б	III	IV		
N	8	33	14		
%	14,55	60	25,45		
Сопутствующая патология, n=55					
N (% в подгруппе)	Вид патологии				
6 (10,91%)	Артериальная операция в анамнезе				
18 (32,73%)	ПИКС				
27 (49,1%)	ИБС				
18 (32,73%)	СД 2 типа				
37 (67,27%)	ГБ в анамнезе				
Исходы, n=51					
N (%)	Тип исхода				
11 (21,6 %)	Прогрессирование заболевания				
13 (25,49%)	Рестеноз				
1 (1,96%)	Тромбоз				
5 (9,8%)	Онкология				
4 (7,84%)	ОИМ				
1 (1,96%)	Ампутация				
6 (11,76%)	Летальные исходы				
(1,96%)	Инсульт				

У одного 1 (1,96%) пациента через 3 месяца после вмешательства развился тромбоз зоны реконструкции, подтвержденный данными ультразвукового исследования артерий нижних конечностей. В связи с неэффективностью реперфузионной терапии и развитием необратимой ишемии пациенту была проведена ампутация нижней конечности. Выявление рестеноза у пациентов в постинтервенционном периоде при помощи тактики проведения ультразвукового исследования артерий нижних конечностей и оценки ЛПИ каждые 3 месяца после

ЧТБА и/или стентирования позволило своевременно выполнить повторные вмешательства, упреждающие тромбоз и развитие необратимой ишемии, что позволило сохранить пациентам конечность и улучшить прогноз заболевания и жизни. Дальнейший статистический анализ данных позволил выявить гемостатические прогностические маркеры развития рестеноза, что призвано далее улучшить результаты лечения пациентов с ЗПА атеросклеротической этиологии. Летальные исходы составили 6 (11,76%) случаев; известно, что причиной двух смертей стало развитие инфаркта миокарда, еще двух – злокачественное новообразование (точная локализация не установлена), причина двух оставшихся смертей неизвестна. Основные исследуемые параметры среди пациентов группы эндоваскулярного лечения представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Основные исследуемые параметры среди пациентов группы эндоваскулярного лечения до и через 3 месяца после вмешательства, n=55

	Среднее	ДИ - 95%	ДИ 95%	Медиана	Min	Max	НК	ВК	$\sigma$
Возраст, лет	63,5	61,2	65,8	63,0	43,0	83,0	57,0	69,0	8,5
FVIII, %	157,7	140,3	175,2	146,5	48,5	299,0	107,0	196,0	64,0
FVIII 3мес, %	190,4	158,2	222,5	159,5	62,7	562,0	113,5	220,0	115,5
vWF, %	535,5	421,0	649,9	300,0	120,0	1200,0	160,0	1200,0	423,3
vWF 3мес, %	519,6	421,2	618,0	320,0	150,0	1200,0	300,0	800,0	353,4
РАI-1, нг/мл	83,0	71,3	94,7	84,0	13,0	162,3	48,0	117,0	42,4
РАI-1 3мес, нг/мл	98,9	86,6	111,2	101,0	21,0	176,0	56,0	137,0	43,7
sEPCR, нг/мл	62,1	56,1	68,1	57,1	28,9	101,9	42,2	79,2	22,1
sEPCR 3мес, нг/мл	63,5	56,8	70,2	55,2	30,2	103,5	43,6	86,3	24,0
PrC, %	99,9	94,2	105,6	102,0	37,0	130,0	90,0	114,0	21,1
PrC 3мес, %	105,4	100,7	110,1	103,0	66,0	130,0	94,0	118,4	16,7
NO, мкмоль/мл	82,6	74,8	90,4	83,0	28,0	139,8	58,0	106,0	28,8
NO 3мес, мкмоль/мл	68,4	60,3	76,5	62,5	28,0	156,7	43,0	85,9	29,1
АГ к vWF, мкг/мл	0,9	0,8	1,0	0,9	0,3	1,4	0,8	1,0	0,2
АГ к vWF 3мес, мкг/мл	0,9	0,8	1,0	0,9	0,2	1,2	0,8	1,1	0,2
ЛПИ	0,6	0,6	0,7	0,6	0,1	1,3	0,4	0,8	0,3

*Сравнение показателей среди пациентов группы эндоваскулярного лечения до и после вмешательства*

Выполнение чрескожных вмешательств способствовало статистически значимому увеличению ЛПИ, составив 0,64 (0,28; 0,55-0,72) при включении в исследование и 0,8 (0,28; 0,71-0,88) спустя 3 месяца после лечения ( $p=0,017$ ).

На фоне проведения эндоваскулярного лечения у пациентов отмечалось увеличение уровня PAI-1, которое составило 84 нг/мл (48-117) при включении и 101 нг/мл (56-137) через 3 месяца после ( $p<0,001$ ). На фоне проведения эндоваскулярного лечения у пациентов отмечалось увеличение уровня PAI-1 на 20,2% по сравнению с изначальными показателями ( $p<0,001$ ). Согласно международным исследованиям, в послеоперационном периоде у пациентов с КИНК отмечалось снижение уровня и активности PAI-1 [201]. Разница в полученных данных может быть объяснена разными сроками определения уровня PAI-1 (1 месяц в исследовании Björck (2013) и 3 месяца в рамках текущего исследования) и малым количеством пациентов, включенных в вышеприведенное исследование (26 человек). В рамках текущей работы увеличение уровня PAI-1 через 3 месяца после интервенции можно объяснить тем, что на фоне ангиопластики и/или стентирования артерий, несмотря на восстановление магистрального кровотока, наносится повреждающее воздействие на стенку артерий, что может проявляться повышением активности PAI-1 как важного показателя целостности и нормальной функции эндотелиоцитов.

Уровень метаболитов оксида азота NO после эндоваскулярных реконструкций снизился с 83 мкмоль/мл (58-106) до 62,5 мкмоль/мл (43-85,9) ( $p=0,01$ ).

*Сравнение показателей среди пациентов группы эндоваскулярного лечения по виду вмешательства*

У пациентов, кому выполнялось стентирование, отмечался статистически более высокий уровень sEPCR в срок 3 месяца, по сравнению с больными, которым проводилась баллонная ангиопластика, 59,7 (54,5-86,9) и 50,8 (41,1-85,7),

соответственно ( $p=0,034$ ). Изучение уровня sEPCR у пациентов группы эндоваскулярного лечения соответствовало полученным данным в отношении повышения уровня PAI-1 в постинтервенционном периоде. Выявленные тенденции свидетельствуют о том, что несмотря на проведение технически успешной артериальной реконструкции, у пациентов сохраняются явления дисфункции эндотелия, характеризующие состояние гиперкоагуляции и сосудистого воспаления.

*Сравнение показателей среди пациентов группы эндоваскулярного лечения в зависимости от уровня поражения*

Уровень sEPCR в срок 3 месяца был статистически значимо ниже при бедренно-подколенной окклюзии по сравнению с подвздошно-бедренной, составив 51,2 нг/мл (41,5-83,8) и 78,8 нг/мл (55,8-101), соответственно ( $p=0,024$ ).

Уровень АГ vWF при включении в исследование статистически значимо различался между пациентами с бедренно-подколенной окклюзией (0,87 мкг/мл (0,2 ДИ95% 0,78-0,95)) и многоуровневым поражением (1,25 мкг/мл (0,2 ДИ95% 0,72-3,21) ( $p=0,019383$ ), а также между больными с подвздошно-бедренной (0,9 (0,15 ДИ95% 0,79-1,01)) и многоуровневым поражением ( $p=0,021251$ ). В срок 3 месяца после вмешательств АГ vWF при многоуровневом поражении был выше, чем при изолированной подвздошно-бедренной окклюзии, составив 1,18 мкг/мл (1,15-1,21) и 0,87 мкг/мл (0,79-1,08), соответственно ( $p=0,04$ ), что свидетельствует о более тяжелой степени выраженности дисфункции эндотелия гемостатического профиля, характерной для распространенного атеросклеротического поражения артерий нижних конечностей.

*Сравнение показателей среди пациентов группы эндоваскулярного лечения в зависимости от стадии заболевания*

У пациентов отмечены статистически значимые различия уровня sEPCR в срок 3 месяца после эндоваскулярной реконструкции в зависимости от стадии заболевания: показатель составил 42,4 (37,8-51,8) при Пб стадии заболевания, 56

(50-86,9) при III стадии заболевания и 65,9 (47,8-100,9) при IV стадии заболевания ( $p < 0,05$ ). Аналогично результатам, полученным при оценке показателей у всех пациентов в исследовании, у больных группы эндоваскулярного лечения уровень sEPCR был выше у пациентов с распространенным проксимальным поражением артерий нижних конечностей с максимальным уровнем показателя при подвздошно-бедренной окклюзии ( $p = 0,024$ ) и тяжелой ишемией; так, уровень sEPCR при IV стадии заболевания на 35,6% превышал показатель при IIб стадии заболевания ( $p < 0,05$ ).

*Сравнение показателей среди пациентов группы эндоваскулярного лечения в зависимости от сопутствующих заболеваний*

Активность фактора FVIII среди пациентов группы эндоваскулярного лечения у лиц с гипертонической болезнью была статистически значимо ниже по сравнению с лицами без артериальной гипертензии при включении в исследование и составила 131,5% (98,85-188,5) и 165,5% (147-240), соответственно ( $p = 0,021$ ). Активность vWF при включении в исследование у лиц с артериальной гипертензией была ниже по сравнению с лицами без гипертонической болезни и составила 300 % (160-720) и 600 % (300-1200), соответственно ( $p = 0,044$ ).

Таким образом, аналогично более низкой активности FVIII при наличии артериальной гипертензии, активность vWF у лиц без гипертонической болезни в целом была примерно в 2 раза ниже, чем при ее наличии ( $p = 0,044$ ).

*Сравнение показателей среди пациентов группы эндоваскулярного лечения в зависимости от исходов заболевания*

У пациентов, у которых в течение года после вмешательств развился рестеноз, уровень sEPCR составил 41,3 нг/мл (36,6-52,9) и по сравнению с 60,35 нг/мл (48,6-87,8) у больных без рестеноза ( $p = 0,002$ ); схожая тенденция прослеживалась в отношении уровня sEPCR в сроки 3 месяца после вмешательства – у пациентов с развившимся в течение года рестенозом

показатель составил 46,8 нг/мл (39,85-55,55) по сравнению с 57,9 нг/мл (47,85-99,95) у лиц без рестеноза ( $p=0,035$ ).

Активность FVIII у пациентов, у которых в течение года наблюдения развился инфаркт миокарда, была повышена как при включении в исследование, так и через 3 месяца после выполнения вмешательств, составив 241 % (177-286,5) по сравнению с лицами без инфаркта 142,3 % (102-190) вначале, 284,5 % (194-457) и 151,5 % (110,5-216,4) через 3 месяца, соответственно ( $p<0,05$ ). Ранее имелись данные о повышенной активности факторов коагуляции у пациентов с острыми состояниями: так, Costa С.Е. et al. в своем исследовании показали повышение фактора свертываемости VIII (FVIII) у пациентов с острым коронарным синдромом [84]. Нами было продемонстрировано, что повышенная активность FVIII характерна и для развития тяжелой коронарной патологии в виде инфаркта миокарда в течение года с момента выявления гиперкоагуляции по указанному показателю.

Активность vWF у пациентов, у которых в течение года развился инфаркт миокарда, при включении в исследование существенно превышала активность vWF среди больных, у которых не развилось инфаркта, составив 1200 % (900-1200) и 300 % (160-800), соответственно ( $p=0,022$ ). Уровень антигена к фактору vWF (уровень vWF) в срок 3 месяца после эндоваскулярных вмешательств был статистически значимо выше у пациентов, у которых в течение года развился инфаркт миокарда 1,15мкг/мл (1,05-1,175) и по сравнению с лицами без инфаркта 0,9мкг/мл (0,78-1,01) ( $p=0,015088$ ).

Повышенные уровень и активность vWF отмечались среди лиц, у которых в течение года наблюдения развился летальный исход. Активность vWF при включении в исследование в случае развития летального исхода составила 1200 % (640-1200) по сравнению с пациентами, доступными к контакту к окончанию года наблюдения - 300 % (160-600) ( $p=0,009$ ). Уровень АГ vWF в сроки 3 месяца после эндоваскулярного лечения у пациентов, доступных к контакту через 1 год, был статистически значимо ниже по сравнению с пациентами, у которых развился

летальный исход, и составил 0,9 (0,78-1,08) и 1,06 (0,96-1,18), соответственно ( $p=0,031$ ).

Роль vWF как предиктора развития ИМ может быть объяснена его биологическими свойствами и эффектами: vWF способствует адгезии тромбоцитов к эндотелию и упомянутой ранее защите FVIII от протеолиза протеином С, тем самым определяя тромбоцитарный и фибриновый компоненты тромбоза. Таким образом, фактор фон Виллебранда играет важную роль в патогенезе ИБС и инфаркта миокарда, что может играть существенную роль в выборе тактике ведения пациентов с мультифокальным атеросклерозом [35].

#### *Оценка корреляционных связей среди пациентов группы эндоваскулярного лечения*

Наиболее значимые корреляционные связи были выявлены между активностью и уровнями следующих параметров гемостатического звена дисфункции эндотелия при включении в исследование и через 3 месяца после проведения эндоваскулярного лечения:

1. FVIII 0 мес. и vWF 0 мес. ( $r=+0,494$ ) (рисунок 36);

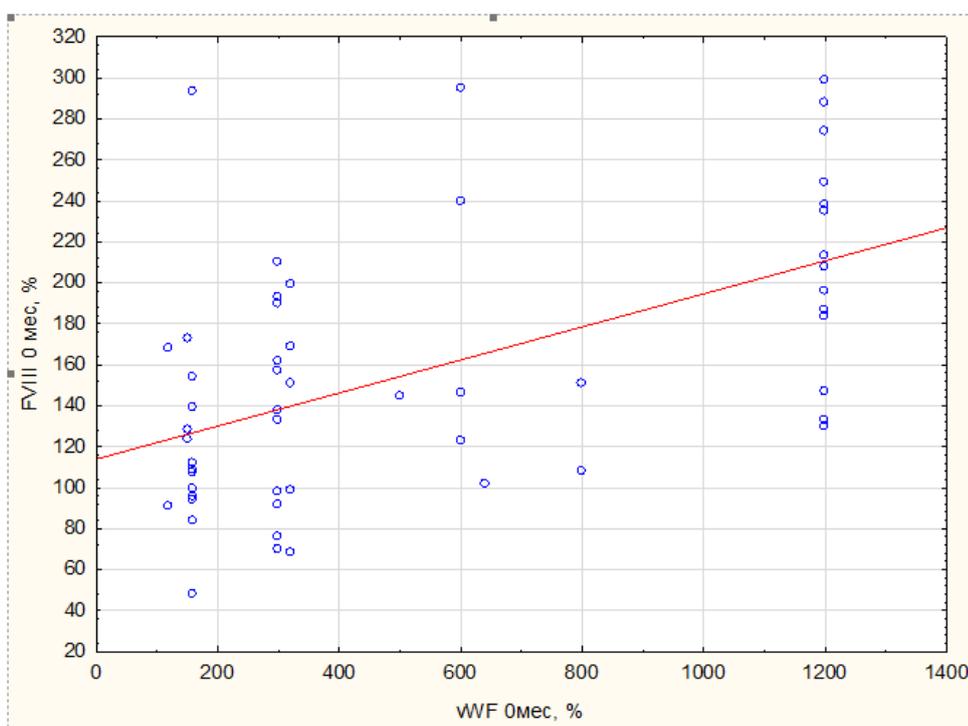


Рисунок 36 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности FVIII 0 мес и vWF 0 мес у пациентов группы эндоваскулярного лечения

2. vWF 3 мес. и метаболиты NO 3 мес. ( $r=-0,572$ ) (рисунок 37);

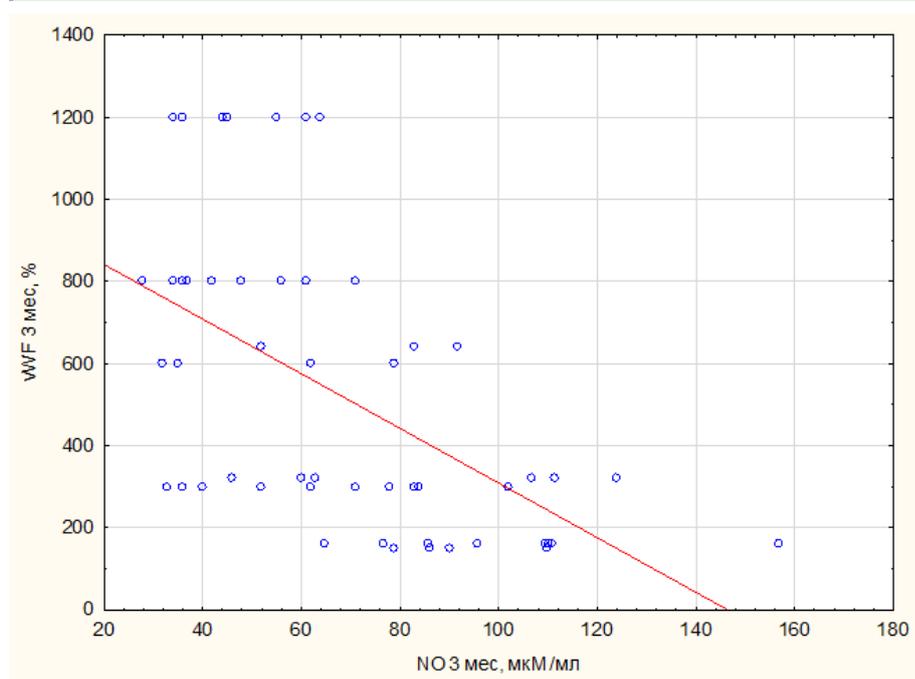


Рисунок 37 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности vWF 3 мес и метаболитов NO 3 мес у пациентов группы эндоваскулярного лечения

3. PAI-1 0 мес. и метаболиты NO 3 мес. ( $r=+0,43$ ) (рисунок 38);

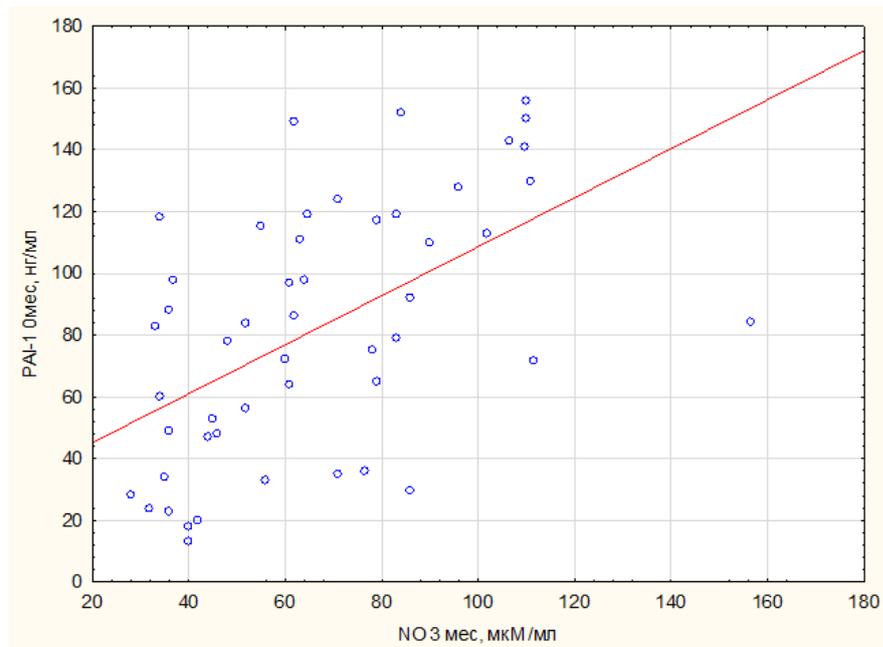


Рисунок 38 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров уровня PAI-1 0 мес и метаболитов NO 3 мес у пациентов группы эндоваскулярного лечения

4. sEPCR 0 мес. и ЛПИ 0 мес. ( $r=-0,567$ ) (рисунок 39);

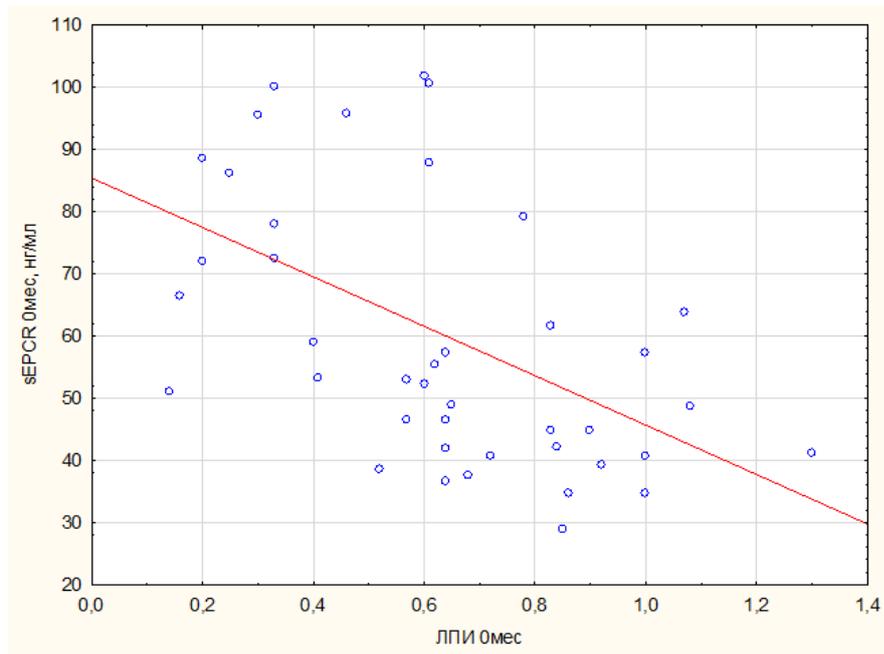


Рисунок 39 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров уровня sEPCR и ЛПИ у пациентов группы эндоваскулярного лечения

Другие корреляции:

5. FVIII 0 мес. и FVIII 3 мес. ( $r=+0,624$ ) (рисунок 40);

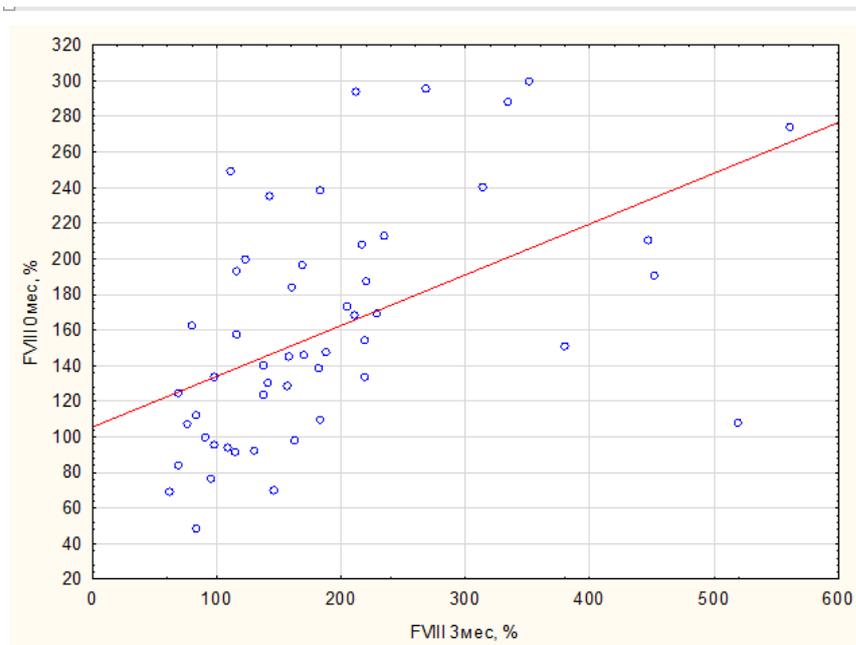


Рисунок 40 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности FVIII 0 мес и vWF 0 мес у пациентов группы эндоваскулярного лечения

6. PAI-1 0 мес. и PAI-1 3 мес. ( $r=+0,608$ ) (рисунок 41);

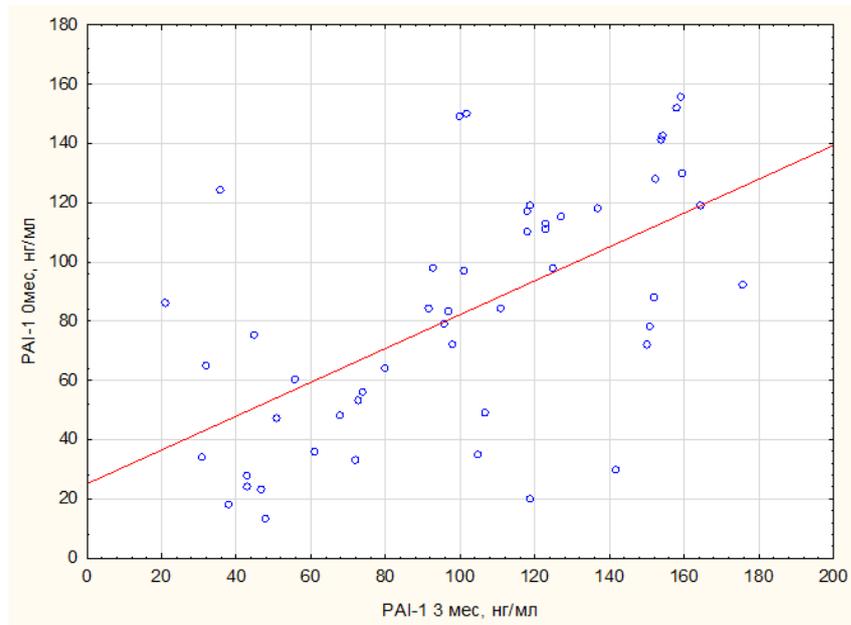


Рисунок 41 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров уровня PAI-1 0 мес и 3 мес у пациентов группы эндоваскулярного лечения

7. sEPCR 0 мес. и sEPCR 3 мес. ( $r=+0,794$ ) (рисунок 42).

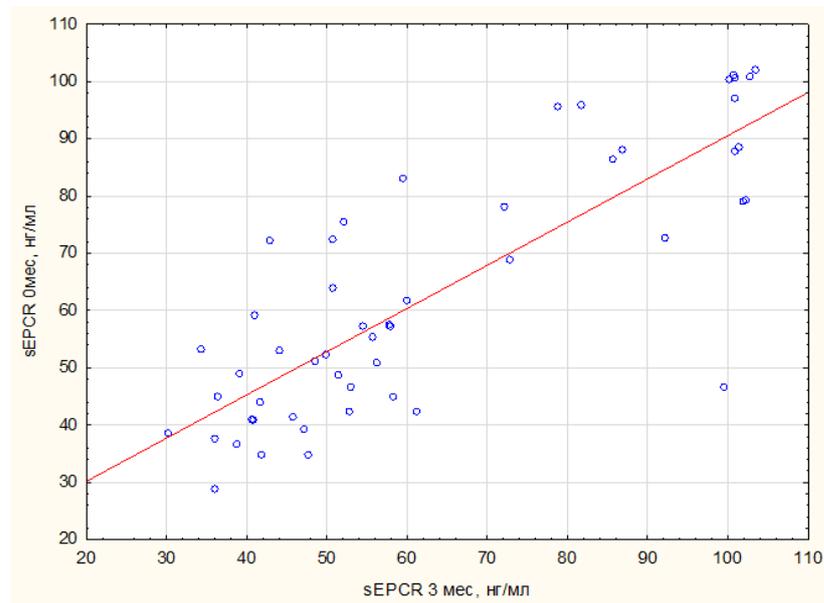


Рисунок 42 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров уровня sEPCR 0 мес и 3 мес у пациентов группы эндоваскулярного лечения

Полученные результаты по оценке корреляционных связей в группе эндоваскулярного лечения соответствуют ранее полученным данным при общей

оценке показателей коагуляционного профиля ЭД. Наличие корреляции между активностью FVIII и vWF соответствует особенностями физиологии последних, циркулирующих в виде комплекса. Корреляции между активностью vWF и уровнем NO, в том числе спустя 3 месяца после инвазивного лечения, отражают степень выраженности гиперкоагуляции и дисфункции эндотелия (более высокая активность vWF коррелировала с более низким уровнем метаболитов NO). Корреляционная связь между уровнем PAI-1 и метаболитов оксида азота II, вероятно, объясняется особенностями влияния NO на выработку PAI-1 эндотелиоцитами [95]. Обратная корреляция между уровнем sEPCR и ЛПИ соответствует полученным ранее данным, отражающим степень тяжести ишемии и поражения артериального русла, соответствующим более высокому показателю sEPCR и более низкому - ЛПИ. Наличие корреляции показателей активности FVIII, уровней PAI-1 и sEPCR до и через 3 месяца после эндоваскулярных вмешательств свидетельствует о динамичности процессов, характеризующих коагуляционное звено дисфункции эндотелии, в частности, на фоне проведения инвазивных вмешательств.

#### *ROC-анализ в группе эндоваскулярного лечения*

При проведении ROC-анализа в группе пациентов эндоваскулярного лечения с целью оценки ассоциации изученных параметров гемостатического звена дисфункции эндотелия и неблагоприятных исходов была выявлена прогностическая роль уровня sEPCR и развития рестеноза, активности vWF и развития летального исхода, а также активности vWF, FVIII и возникновения инфаркта миокарда в течение года наблюдения.

#### *sEPCR и рестеноз*

Прогностическая модель зависимости уровня sEPCR и развития рестеноза в группе эндоваскулярного лечения: площадь под ROC-кривой (рис. 43) составила  $0,788 \pm 0,073$  с 95% ДИ: 0,644-0,931.

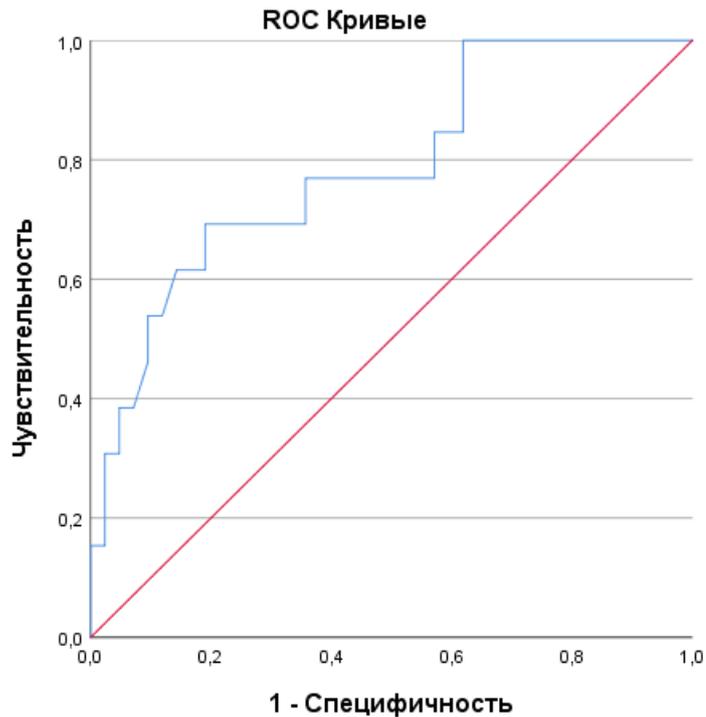


Рисунок 43 – ROC-кривая в прогностической модели зависимости уровня sEPCR и развития рестеноза в группе эндоваскулярного лечения

Значимость модели – 0,002. Пороговое значение sEPCR в точке cut-off, определенное с помощью индекса Юдена, – 45,7нг/мл. Направление проверки по убыванию, при значении sEPCR равном или ниже точки cut-off прогнозируется развитие рестеноза. Чувствительность и специфичность метода – 69,2% и 81%, соответственно.

ROC-анализ подтвердил связь уровня sEPCR и развития рестеноза после чрескожных вмешательств. Объяснить явление того, что с одной стороны для тяжелых форм ишемии и распространенного атеросклеротического поражения артерий конечностей характерно повышение уровня sEPCR, в то время как при рестенозе наблюдалась обратная ситуация, вероятно, можно следующим: для различных видов осложнений характерны различные патогенетические механизмы. При этом у пациентов с рестенозом отмечалась более низкая активность протеина С при включении в исследование - 98% (90,2-115) и через 3 месяца после вмешательства - 101,3% (94,8-104) по сравнению с больными без

рестеноза, у которых активность протеина С составила 104% (90-113%) до интервенции и 103,65% (93-124,5) через 3 месяца после ( $p>0,05$ ). С учетом того, что активность протеина С была в целом в пределах нормальных значений, учетом отсутствия статистически значимых изменений активности протеина С между больными с и без рестеноза, полностью объяснить более низкие уровни sEPCR у лиц с рестенозом вероятным «расходованием» EPCR на связывание протеина С нельзя.

#### *vWF и летальный исход*

Прогностическая модель зависимости активности vWF и развития летального исхода в группе эндоваскулярного лечения: площадь под ROC-кривой (рисунок 44) составила  $0,827 \pm 0,064$  с 95% ДИ: 0,701-0,952.

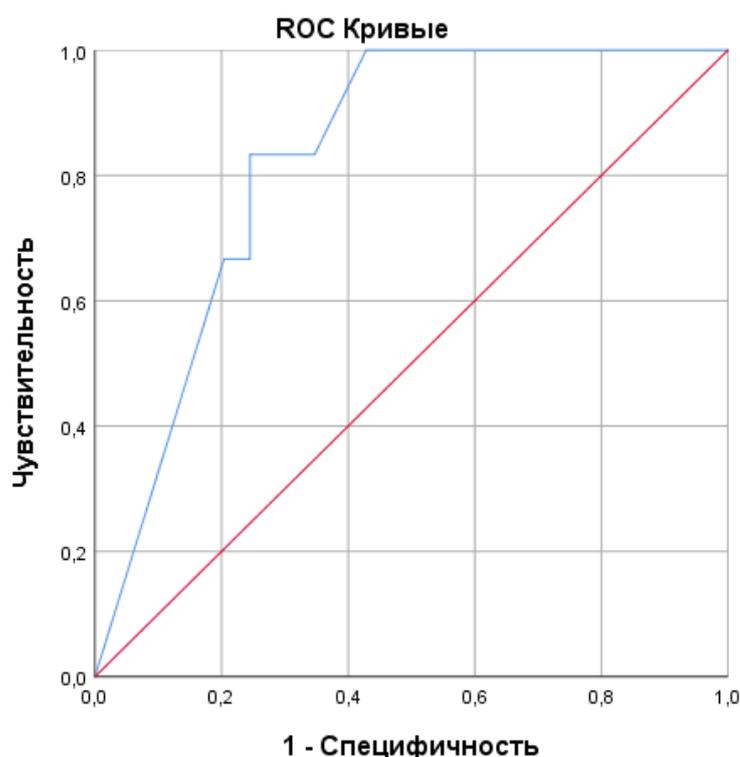


Рисунок 44 – ROC-кривая в прогностической модели зависимости активности vWF и развития летального исхода в группе эндоваскулярного лечения

Значимость модели – 0,01. Пороговое значение vWF в точке cut-off, определенное с помощью индекса Юдена, – 620%. Направление проверки по

возрастанию, при значении  $vWF$  равном или выше точки cut-off прогнозируется летальный исход. Чувствительность и специфичность метода – 83,3% и 75,5%, соответственно.

### *$vWF$ , $FVIII$ и инфаркт миокарда*

Прогностическая модель зависимости активности  $vWF$  и развития инфаркта миокарда в группе эндоваскулярного лечения: площадь под ROC-кривой (рисунок 45) составила  $0,843 \pm 0,065$  с 95% ДИ: 0,715-0,971.

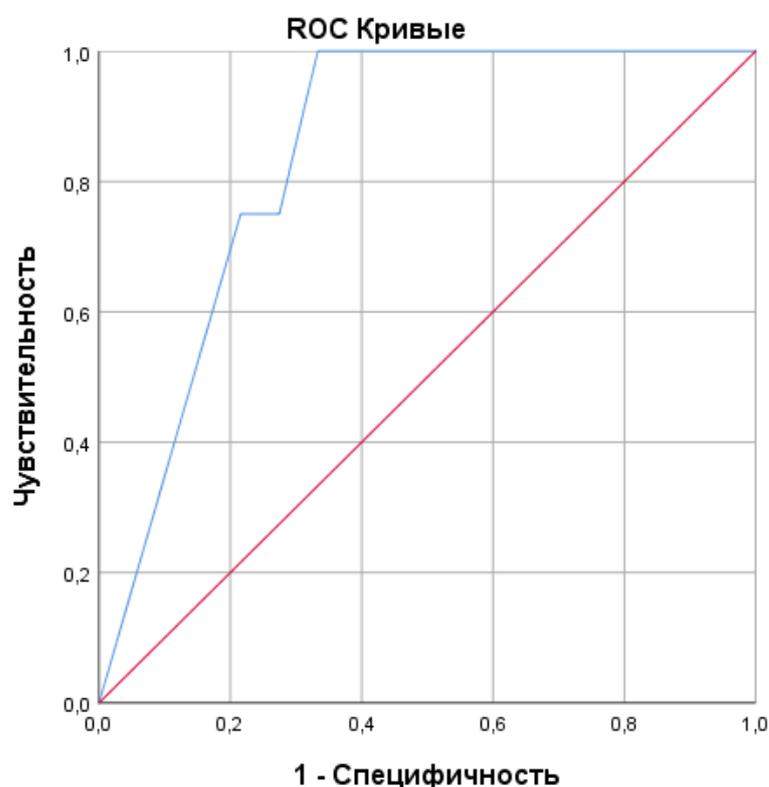


Рисунок 45 – ROC-кривая в прогностической модели зависимости активности  $vWF$  и развития инфаркта миокарда в группе эндоваскулярного лечения

Значимость модели – 0,023. Пороговое значение  $vWF$  в точке cut-off, определенное с помощью индекса Юдена, – 1000%. Направление проверки по возрастанию, при значении  $vWF$  равном или выше точки cut-off прогнозируется инфаркт миокарда. Чувствительность и специфичность метода – 75% и 78,4%, соответственно.

Прогностическая модель зависимости активности FVIII и развития инфаркта миокарда в группе эндоваскулярного лечения: площадь под ROC-кривой (рисунок 46) составила  $0,82 \pm 0,099$  с 95% ДИ: 0,625-1.

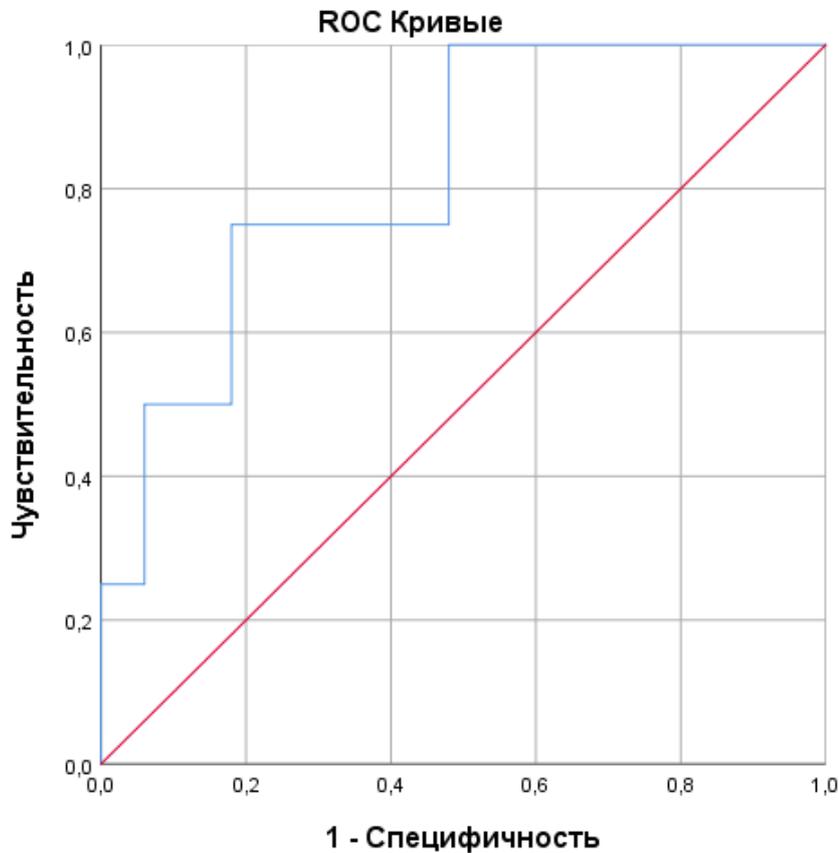


Рисунок 46 – ROC-кривая в прогностической модели зависимости активности FVIII и развития инфаркта миокарда в группе эндоваскулярного лечения

Значимость модели – 0,035. Пороговое значение FVIII в точке cut-off, определенное с помощью индекса Юдена, – 203,75%. Направление проверки по возрастанию, при значении FVIII равном или выше точки cut-off прогнозируется инфаркт миокарда. Чувствительность и специфичность метода – 75% и 82%, соответственно.

Традиционно считалось, что повышенная активность FVIII ассоциирована с венозными тромбозными осложнениями [139]. Однако, в последние годы появляются данные о том, что повышенная активность FVIII выявлялась у пациентов с ишемическим инсультом [61] и острым коронарным синдромом [56].

Наши данные свидетельствуют о следующем: повышенная активность FVIII характерна для развития инфаркта миокарда у больных с ЗПА.

Прогностическая модель зависимости активности vWF и FVIII и развития инфаркта миокарда в группе эндоваскулярного лечения (рисунок 47): выявлена связь их обоюдно повышенной активности и развития ИМ после чрескожных вмешательств.

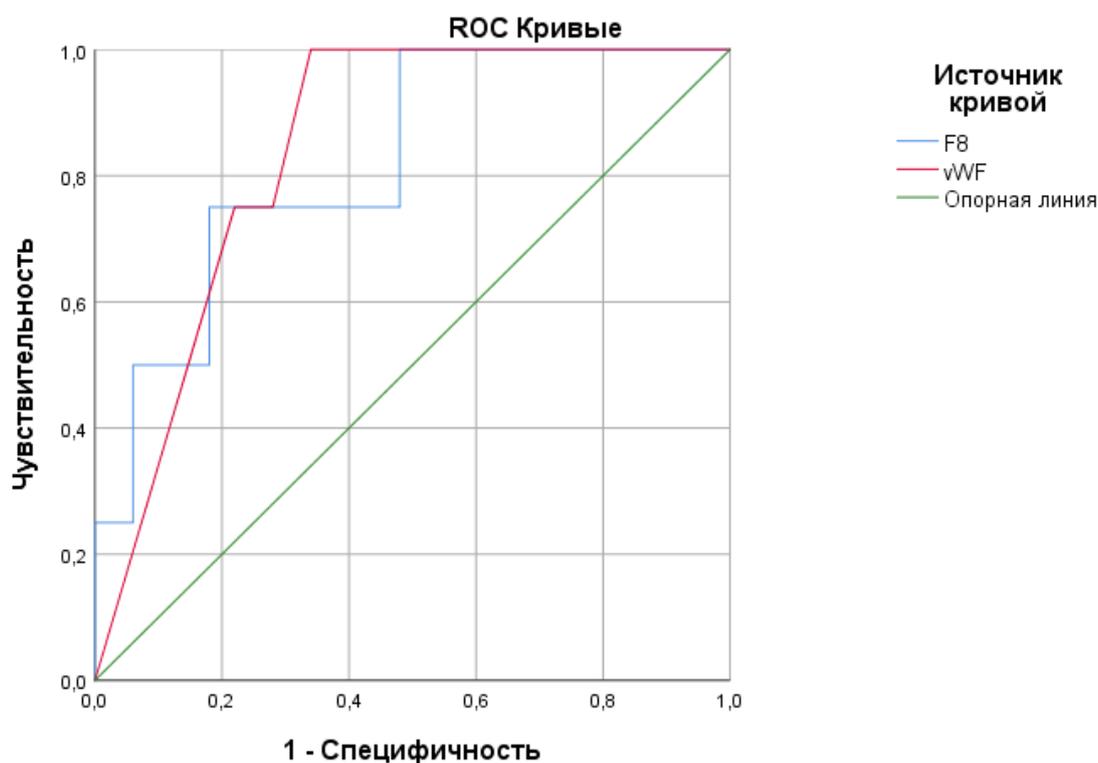


Рисунок 47 – ROC-кривые в прогностической модели зависимости активности vWF и FVIII и развития инфаркта миокарда в группе эндоваскулярного лечения

Так, при значении активности vWF выше 1000% прогнозируется развитие летального исхода в течение года после выполнения эндоваскулярной реконструкции, чувствительность 75%, специфичность 78,4%; при значениях активности FVIII выше 203,75% в течение года также прогнозировался летальный исход, при этом чувствительность и специфичность метода составили 75% и 82% соответственно. Сравнение двух прогностических моделей показало, что модель на основе определения активности vWF имеет большую значимость и площадь под ROC-кривой по сравнению с FVIII.

Полученные данные по связи повышенных уровня и активности vWF у пациентов с ЗПА атеросклеротической этиологии, у которых в течение года развились инфаркт и/или летальный исход, соответствуют мировым литературным данным, согласно которым vWF рассматривается в качестве важного прогностического маркера развития больших сердечно-сосудистых событий, что согласно нашим исследованиям, справедливо и для пациентов с ЗПА [215].

#### **4.3.3. Группа открытых оперативных (шунтирующих) вмешательств**

В группу открытых (шунтирующих) операций включено 60 пациентов, средний возраст которых составил 65 (60 - 67) лет. Больных мужского пола был 51 (85%) человек. Среднее значение ЛПИ на момент включения в исследование составило 0,32 (0,19-0,42). 47 (78,33%) пациентам выполнены вмешательства с использованием сосудистых протезов из ПЭТ (дакрона), остальным – из ПТФЭ. Большинство пациентов получали двойную антитромбоцитарную терапию - ДААТ (ацетилсалициловая кислота и клопидогрел).

Интересным представляется факт, что, несмотря на проведение ДААТ, у пациентов отмечалась повышенная активность FVIII в срок 3 месяца после операции, составив 241,3 % (165,5-294) ( $p=0,026$ ).

Уровень поражения артериального русла, стадия заболевания, сопутствующая патология и исходы в течение года наблюдения среди пациентов группы открытых оперативных (шунтирующих) вмешательств представлены в таблице 18; исходы в течение года среди пациентов группы открытых операций, доступных к анализу через 1 год (51 человек).

Таблица 18 – Характеристики пациентов и исходы в группе открытых оперативных (шунтирующих) вмешательств

Уровень поражения, n=60					
	Бедренно-подколенная окклюзия	Подвздошно-бедренная окклюзия	Подколенно-берцовая окклюзия	Многоуровневое поражение	Синдром Лериша
N	32	9	0	11	8
%	53,33	15	0	18,33	13,34
Стадия заболевания, n=60	II Б	III	IV		
N	6	39	15		
%	10	65	25		
Сопутствующая патология, n=60					
N (% в подгруппе)	Вид патологии				
3 (5%)	Артериальная операция в анамнезе				
10 (16,67%)	ПИКС				
17 (28,33%)	ИБС				
2 (3,33%)	СД 2 типа				
44 (73,33%)	ГБ в анамнезе				
Исходы, n=51					
N (%)	Тип исхода				
3 (5,88%)	Прогрессирование заболевания				
6 (11,76%)	Рестеноз				
10 (19,6%)	Тромбоз				
5 (9,8%)	Онкология				
2 (3,92%)	ОИМ				
5 (9,8%)	Ампутация				
2 (3,92%)	Летальные исходы				
1 (1,96%)	Инсульт				
Вид выполненного хирургического вмешательства, n=60					
N (%)	Вмешательство				
40 (66,67%)	Бедренно-подколенное шунтирование				
13 (21,67%)	Бифуркационное аорто-бедренное шунтирование				
5 (8,33%)	Перекрестное бедренно-бедренное шунтирование				
2 (3,33%)	Аорто-подколенное шунтирование				

У 6 пациентов в раннем послеоперационном периоде (в срок до 1 месяца) имел место тромбоз зоны реконструкции, еще у 4 больных тромбоз зарегистрирован в течение 1 года. Нельзя исключить, что причинами ранних тромбозов явилась несостоятельность (переоценка) путей оттока. Повторные реконструктивные вмешательства у 5 пациентов с ранним тромбозом были неэффективны, что сопровождалось прогрессированием ишемии и необходимостью выполнения ампутации конечности.

Аналогично группе эндоваскулярного вмешательства, выявление рестеноза у 6 пациентов в послеоперационном периоде при помощи тактики проведения ультразвукового исследования артерий нижних конечностей и оценки ЛПИ каждые 3 месяца позволило своевременно выполнить повторные вмешательства, в том числе эндоваскулярные, что позволило сохранить пациентам конечность и улучшить прогноз заболевания и жизни.

Последующий анализ данных позволил выявить гемостатические прогностические маркеры развития рестеноза и тромбоза артерий конечностей, что призвано улучшить результаты лечения пациентов с ЗПА атеросклеротической этиологии, в том числе при необходимости выполнения открытых шунтирующих операций.

Летальные исходы составили 2 (3,92%) случая; причиной одной из смертей стало злокачественное новообразование (точная локализация не установлена), причина второй неизвестна.

Основные исследуемые параметры среди пациентов группы открытых операций представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Основные исследуемые параметры среди пациентов группы открытых оперативных (шунтирующих) вмешательств до и через 3 месяца после вмешательства

	Среднее	ДИ - 95%	ДИ 95%	Медиана	Min	Max	НК	ВК	$\sigma$
Возраст, лет	63,1	61,1	65,2	65,0	39,0	82,0	60,0	67,0	7,8
FVIII, %	151,7	132,6	170,7	141,0	36,6	347,5	97,7	201,5	73,8
FVIII 3мес, %	211,8	184,4	239,2	199,0	50,8	472,0	131,0	285,0	97,5
vWF, %	529,0	424,6	633,4	320,0	120,0	1200,0	160,0	640,0	404,1
vWF 3мес, %	681,2	553,7	808,7	640,0	150,0	1200,0	160,0	1200,0	453,4
РАI-1, нг/мл	88,2	77,6	98,8	79,3	20,7	247,2	65,3	102,3	40,3
РАI-1 3мес, нг/мл	83,6	71,6	95,6	82,6	16,4	239,1	56,5	102,3	42,2
sEPCR, нг/мл	60,2	55,2	65,3	61,3	26,8	101,3	47,7	72,3	19,4
sEPCR 3мес, нг/мл	61,6	57,5	65,8	62,4	30,1	120,0	56,6	67,7	14,5
PrC, %	95,1	90,5	99,6	92,8	49,4	130,0	85,6	103,9	17,7
PrC 3мес, %	90,9	86,1	95,8	90,0	50,0	130,0	80,3	100,0	17,3
NO, мкмоль/мл	77,5	68,3	86,7	76,3	19,0	207,9	48,0	100,7	35,5
NO 3мес, мкмоль/мл	62,5	54,0	71,0	52,4	23,9	132,4	36,1	93,8	30,2
АГ к vWF, мкг/мл	1,1	1,0	1,1	1,1	0,5	1,4	1,0	1,2	0,2
АГ к vWF 3мес, мкг/мл	0,9	0,8	1,0	0,9	0,2	2,0	0,7	1,1	0,3
ЛПИ	0,3	0,2	0,4	0,3	0,0	0,6	0,2	0,4	0,2

*Сравнение показателей среди пациентов группы открытых (шунтирующих) операций до и после вмешательства*

Отмечено повышение активности FVIII через 3 месяца после оперативного лечения с 141 % (97,7-201,5) до 199 % (131-285) ( $p < 0,001$ ). Это свидетельствует о том, что выполнение инвазивных вмешательств способствует дальнейшему

прогрессированию гиперкоагуляции. Полученные результаты соответствуют полученным нами ранее данным по изучению активности факторов внутреннего пути коагуляции у пациентов с ЗПА при оперативном лечении [27].

Проведение оперативного лечения также характеризовалось снижением уровня метаболитов NO с 76,3 мкмоль/мл (48-100,7) до 52,4 мкмоль/мл (36,1-93,8) ( $p=0,015$ ) и АГ vWF с 1,1 мкг/мл (0,96-1,21) до 0,91 мкг/мл (0,71-1,1) ( $p=0,005$ ).

*Сравнение показателей среди пациентов группы открытых  
(шунтирующих) операций по уровню поражения*

Активность vWF в срок 3 месяца была статистически значимо выше при подвздошно-бедренной окклюзии и по сравнению с бедренно-подколенной и составила 1200 % (640-1200) и 600 % (160-1200), соответственно ( $p=0,045$ ). Несмотря на снижение активности vWF в срок 3 месяца, она оставалась существенно выше по сравнению с нормальными показателями (70-150%).

*Сравнение показателей среди пациентов группы открытых  
(шунтирующих) операций по стадии заболевания*

У пациентов, которым проводилось хирургическое лечение, в срок 3 месяца отмечалась более высокая активность FVIII у пациентов с III стадией заболевания по сравнению с IIб стадией, которая составила 203,8 % (165,5-290) и 134 % (59,7-153), соответственно ( $p=0,046$ ).

В срок 3 месяца после оперативного вмешательства активность vWF статистически значимо различалась среди пациентов с разными стадиями заболевания, составив 160 % (150-320) при IIб стадии заболевания, 640 % (300-1200) при III стадии заболевания и 770 % (320-1200) при IV стадии ( $p<0,05$ ).

*Сравнение показателей среди пациентов группы открытых  
(шунтирующих) операций по виду протеза*

У пациентов, у кого использовались синтетические протезы из ПЭТ (дакрона) отмечалась повышенная активность FVIII через 3 месяца после

вмешательства, составив 204,8 % (153-290) по сравнению с ПТФЭ 93,6 % (70-132,1) ( $p=0,015$ ). Ограничением к интерпретации данных результатов является факт того, что у пациентов, которым выполнялись шунтирующие операции с применением синтетических протезов из ПЭТ, изначально до вмешательства отмечалась более высокая активность FVIII, составившая 166,7% (107-215) и 75,5% (68-101,1), соответственно ( $p=0,006$ ). Таким образом, повышенная активность FVIII скорее характеризовала выраженность коагуляционной дисфункции, а не воздействие определенного материала сосудистых протезов.

Неоднородная активность маркеров гемостатического звена дисфункции эндотелия, характерная для использования разных видов материалов для артериальных реконструкций, была доказана нами в рамках экспериментальной части исследования (*in vitro*). *In vivo* имеется большое количество различных факторов, как молекулярных, так и клеточных, которые затрудняют выявление достоверных связей между применением разных видов синтетических протезов, активностью маркеров ЭД и осложнениями периферического атеросклероза. Понимание особенностей реакции элементов сосудистой стенки и в целом организма на разные виды синтетических материалов или металлов и их соединений сможет помочь в выборе индивидуальной тактики ведения пациентов в зависимости от конкретной клинической ситуации.

*Сравнение показателей среди пациентов группы открытых  
(шунтирующих) операций по наличию сопутствующих заболеваний*

У пациентов с сопутствующей ИБС отмечалась более низкая активность FVIII при включении в исследование по сравнению с больными без ИБС, 114 % (83,7-116,7) и 161,8 % (100,3-221), соответственно ( $p=0,049$ ). Схожая картина отмечалась в срок 3 месяца ( $p=0,028$ ). Активность vWF через 3 месяца после шунтирующих операций у пациентов с ИБС была ниже по сравнению с лицами без ИБС, составив 300 % (160-320) и 770 % (320-1200), соответственно ( $p=0,012$ ).

Уровень sEPCR в срок 3 месяца у пациентов с ИБС был ниже, чем у лиц без ИБС, составив 50,8 нг/мл (45,5-62) и 65,3 нг/мл (58,4-67,7), соответственно ( $p=0,023$ ).

Активность vWF через 3 месяца после шунтирующих операций у пациентов с ИБС была ниже по сравнению с лицами без ИБС, составив 300 % (160-320) и 770 % (320-1200), соответственно ( $p=0,012$ ).

Уровень sEPCR в срок 3 месяца у пациентов с ИБС был ниже, чем у лиц без ИБС, составив 50,8 нг/мл (45,5-62) и 65,3 нг/мл (58,4-67,7), соответственно ( $p=0,023$ ).

*Сравнение показателей среди пациентов группы открытых  
(шунтирующих) операций по исходам*

Уровень метаболитов оксида азота NO (суммарная концентрация нитратов и нитритов) при включении в исследование у пациентов, которым выполнена ампутация в течение года, был статистически значимо выше по сравнению с лицами с сохранной конечностью и составил 116,3 мкмоль/мл (90-130,5) и 68,1 мкмоль/мл (48-90,7), соответственно ( $p=0,025$ ).

В противоположность высоким показателям, характерным для лиц, кому была выполнена ампутация в течение года, у пациентов, у которых развился рестеноз в течение года, уровень нитритов был статистически значимо ниже по сравнению с лицами без рестеноза и составил 35,6 мкмоль/мл (32-51,9) и 62,5 мкмоль/мл (38,6-96,5), соответственно ( $p=0,036$ ). У пациентов, у которых в течение года наблюдения был зафиксирован летальный исход, отмечался изначально пониженный уровень метаболитов оксида азота по сравнению с лицами, доступными к контакту через 1 год наблюдения: 33 мкмоль/мл (30-36) и 71,2 мкмоль/мл (48-95,9), соответственно ( $p=0,043$ ).

Полученные данные свидетельствуют о том, насколько существенно различается метаболизм оксида азота у пациентов с различными патологическими состояниями, характерными для атеросклероза, с максимально высокими цифрами метаболитов NO у больных, у которых в итоге развилась декомпенсация

кровообращения, что может свидетельствовать о наличии нитрозативного стресса, до минимальных значений нитритов, характерных для пациентов с рестенозом и в случае развития летального исхода. Как высокие, так и низкие уровни метаболитов оксида азота II характеризуют степень тяжести эндотелиальной дисфункции у пациентов с распространенными формами ЗПА, требующими шунтирующих операций. Избыток NO может оказывать неблагоприятное воздействие: при реакции NO с супероксидом образуется пероксинитрит (ONOO<sup>-</sup>), что инициирует губительный для клеток и тканей процесс нитрозативного стресса [188]. Дефицит NO приводит к усилению процессов адгезии к поверхности эндотелия, диффузии в субэндотелиальное пространство моноцитов, активации тромбоцитов, процессов коагуляции и пролиферации гладкомышечных клеток. Помимо этого, последующие исследования Allagnat F и соавт. (2016) показали в экспериментальных моделях, что дефицит оксида азота является важным аспектом сосудистого воспаления и развития гиперплазии интимы в условиях гипертензии [182]. Наше клиническое исследование подтвердило связь между пониженными уровнями метаболитов NO и развитием рестеноза.

У пациентов, у которых в течение года после оперативного лечения были зарегистрированы прогрессирующие заболевание и тромбоз зоны реконструкции, отмечалось снижение показателей ЛПИ в срок 3 месяца до 0,52 (0,04; 0,42-0,62) и 0,46 (0,29; 0,16-0,76), соответственно ( $p < 0,05$ ), что подтверждает важность оценки ЛПИ в послеоперационном периоде для мониторинга потенциальных осложнений.

*Оценка корреляционных связей среди пациентов группы открытых  
(шунтирующих) операций*

Наиболее значимые корреляционные связи были выявлены между следующими параметрами гемостатического звена дисфункции эндотелия при включении в исследование и через 3 месяца после проведения открытых операций с использованием синтетических протезов:

1. FVIII 0 мес. и vWF 0 мес. ( $r=+0.575$ ) (рисунок 48);

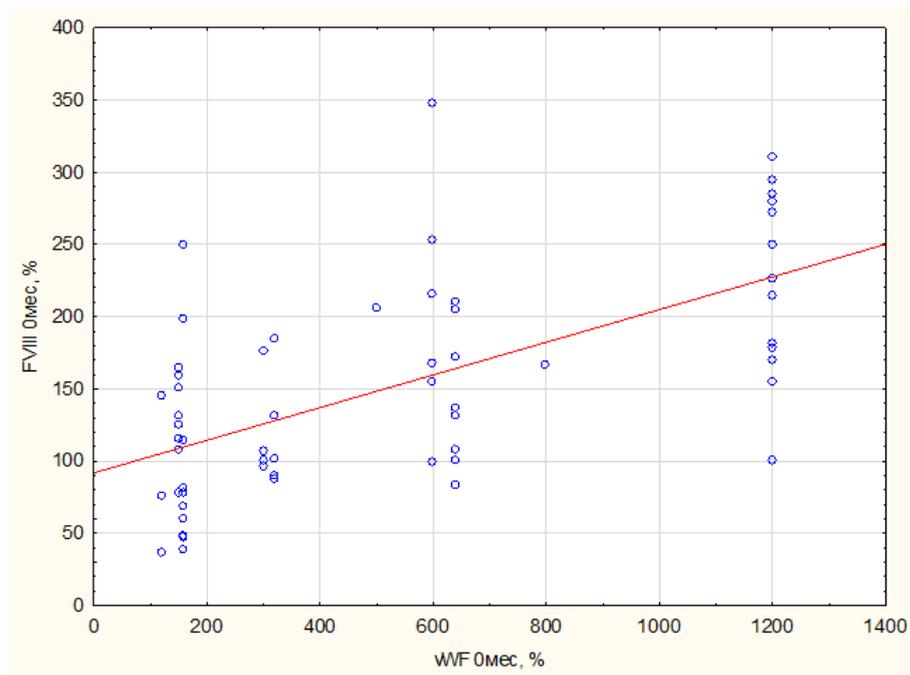


Рисунок 48 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности FVIII 0 мес и vWF 0 мес у пациентов группы открытых (шунтирующих) операций

2. FVIII 0 мес. и sEPCR 0 мес. ( $r=+0,466$ ) (рисунок 49);

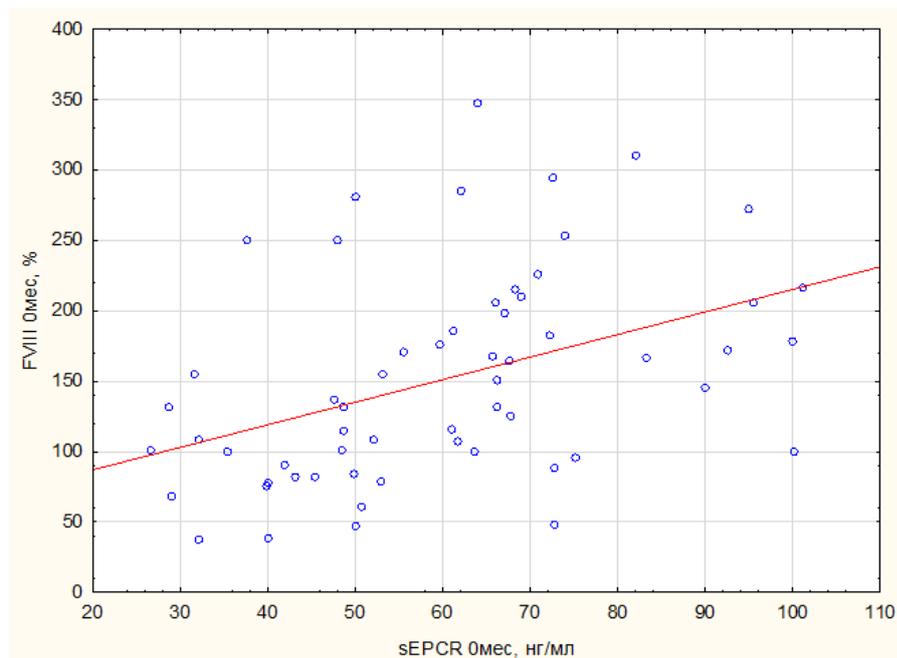


Рисунок 49 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности FVIII 0 мес и уровня sEPCR 0 мес у пациентов группы открытых (шунтирующих) операций

3. FVIII 0 мес. и метаболиты NO 0 мес. ( $r=-0,629$ ) (рисунок 50);

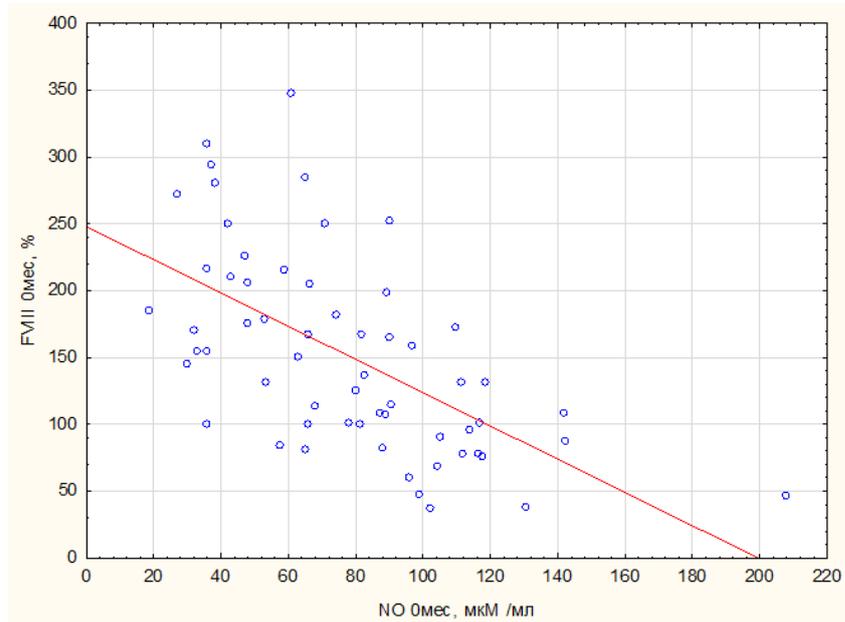


Рисунок 50 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности FVIII 0 мес и уровня метаболитов NO 0 мес у пациентов группы открытых (шунтирующих) операций

4. FVIII 3 мес. и метаболиты NO 3 мес. ( $r=-0,629$ ) (рисунок 51);

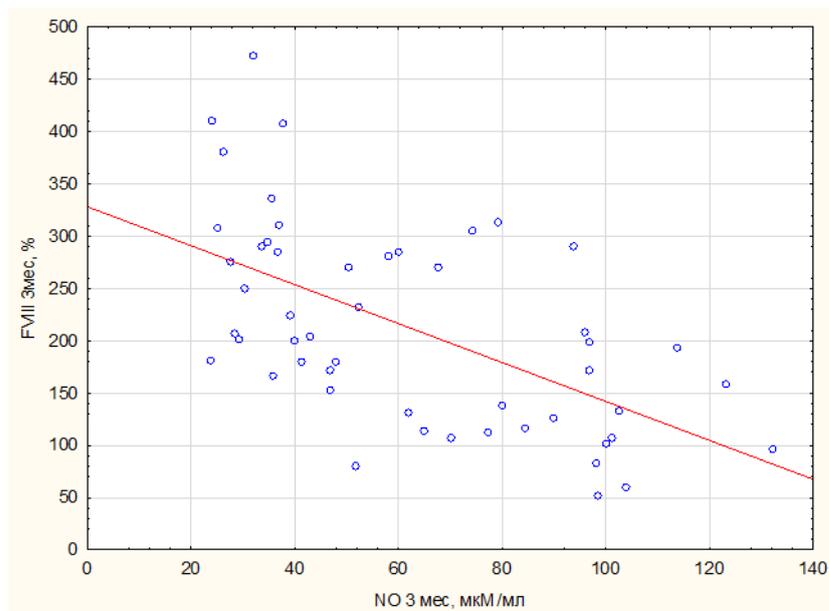


Рисунок 51 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности FVIII 3 мес и уровня метаболитов NO 3 мес у пациентов группы открытых (шунтирующих) операций

5. vWF 0 мес. и метаболиты NO 0 мес. ( $r=-0,401$ ) (рисунок 52);

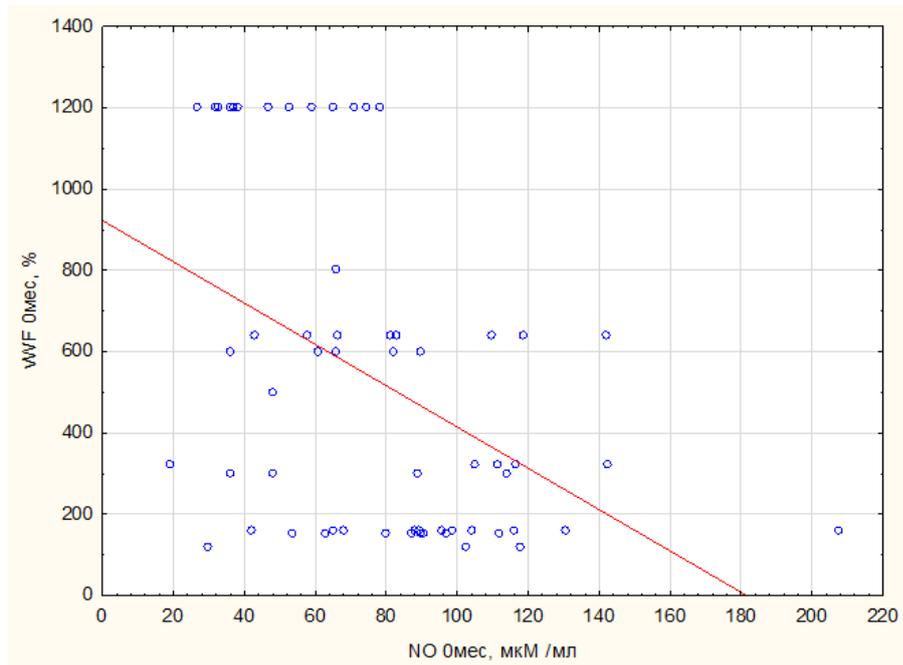


Рисунок 52 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности vWF 0 мес и уровня метаболитов NO 0 мес у пациентов группы открытых (шунтирующих) операций

6. vWF 3 мес. и метаболиты NO 3 мес. ( $r=-0,486$ ) (рисунок 53);

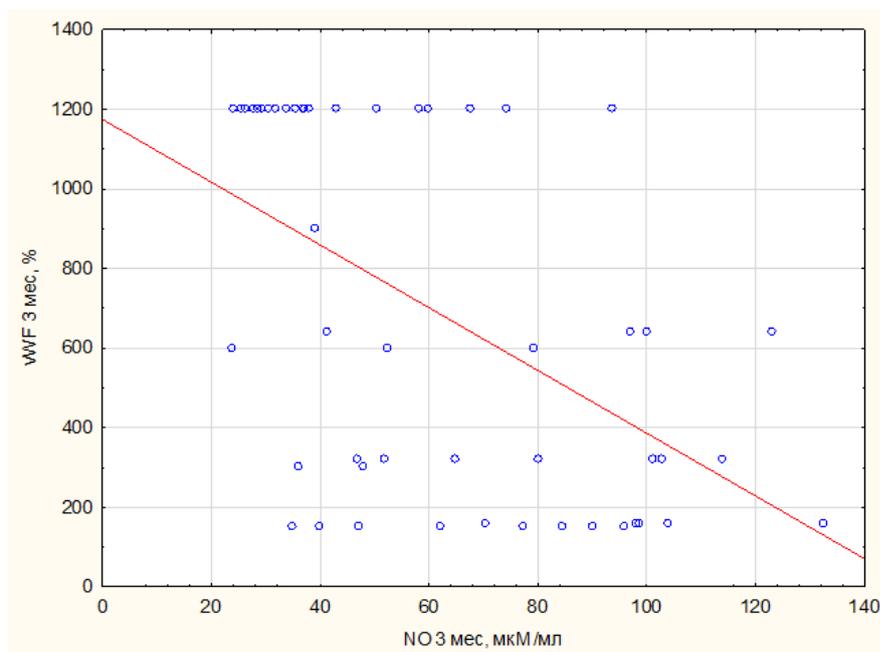


Рисунок 53 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности vWF 3 мес и уровня метаболитов NO 3 мес у пациентов группы открытых (шунтирующих) операций

Прочие корреляции:

7. FVIII 0 мес. и FVIII 3 мес. ( $r=+0,644$ ) (рисунок 54);

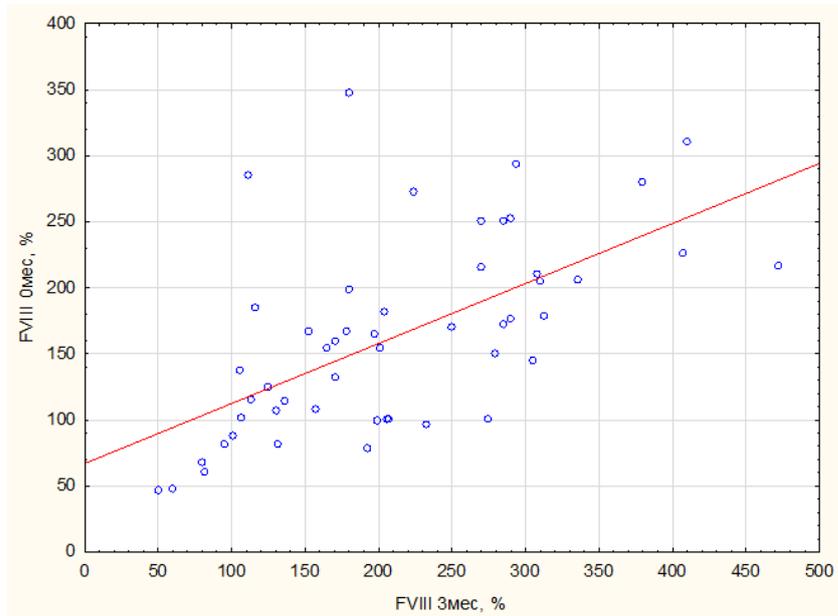


Рисунок 54 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров активности FVIII 0 мес и активности FVIII 3 мес у пациентов группы открытых (шунтирующих) операций

8. sEPCR 0 мес. и sEPCR 3 мес. ( $r=+0,532$ ) (рисунок 55);

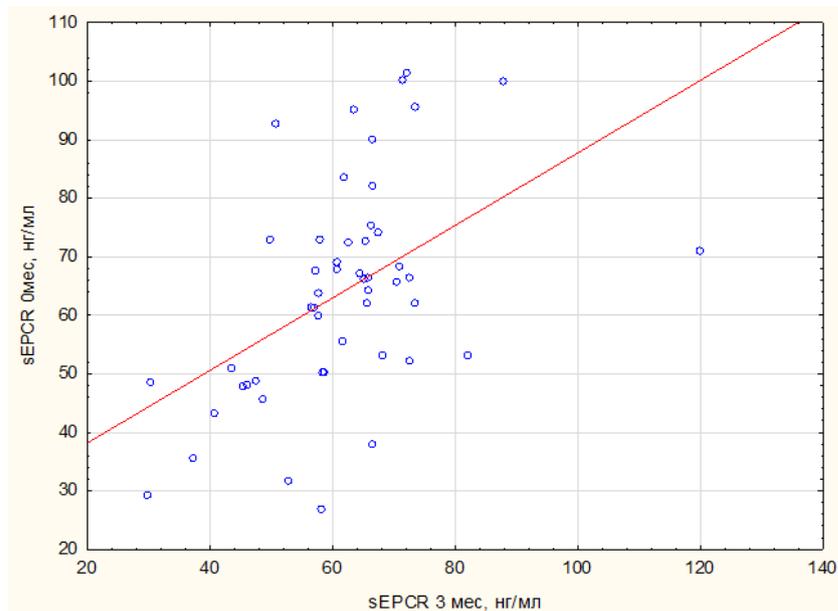


Рисунок 55 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров уровня sEPCR 0 мес и 3 мес у пациентов группы открытых (шунтирующих) операций.

9. метаболиты NO 0 мес. и метаболиты NO 3 мес. ( $r=+0,573$ ) (рисунок 56).

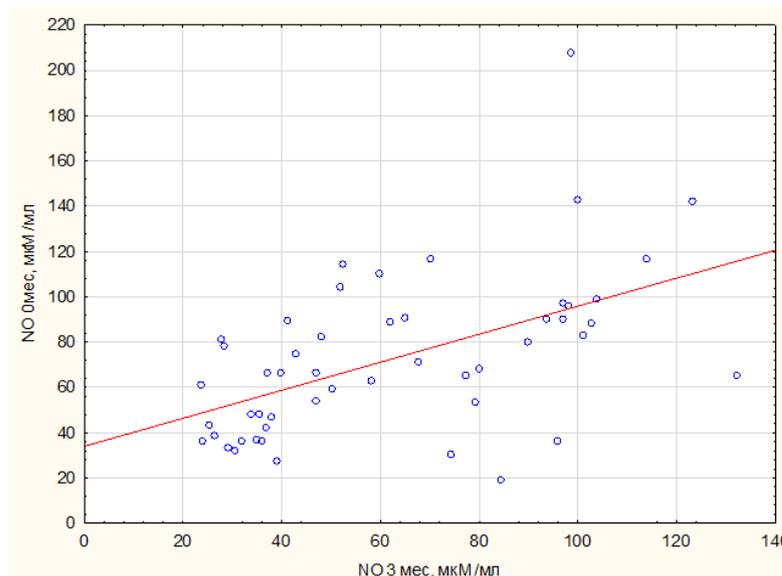


Рисунок 56 – Диаграмма рассеяния, корреляция параметров уровня метаболитов NO 0 мес и 3 мес у пациентов группы открытых (шунтирующих) операций.

Наличие корреляции между активностью FVIII и vWF описано в предыдущих разделах. Положительная корреляционная связь между активностью FVIII и уровнем sEPCR может быть объяснена степенью выраженности ЭД коагуляционного профиля у пациентов с ЗПА вследствие тяжелого атеросклероза, требующего оперативного вмешательства. Корреляции между активностью FVIII и уровнем NO, в том числе спустя 3 месяца после инвазивного лечения, отражают степень выраженности гиперкоагуляции и дисфункции эндотелия.

Аналогичная ситуация наблюдалась при оценке корреляционных связей между активностью vWF и уровнем метаболитов NO как при включении пациентов в исследование (срок 0 мес), так и через 3 месяца после открытых вмешательств. О повышении уровня vWF в плазме крови на фоне снижения продукции NO упоминают иностранные источники литературы. Ряд эффектов NO опосредован активацией растворимой гуанилатциклазы, генерацией циклического

цГМФ, а также цГМФ-зависимой протеинкиназы-1, активация которой приводит к ингибированию агонист-индуцированной мобилизации кальция и, следовательно, повышению секреции vWF [248].

Корреляционная связь активности FVIII, уровней sEPCR и метаболитов NO до и через 3 месяца после открытых операций свидетельствует о динамичности процессов, характеризующих коагуляционное звено дисфункции эндотелия на фоне проведения инвазивных вмешательств. В целом, выявленные корреляционные связи свидетельствуют о степени выраженности дисфункции эндотелия у пациентов с ЗПА и многогранности данного патологического процесса.

#### *ROC-анализ в группе открытых оперативных (шунтирующих) операций*

При проведении ROC-анализа в группе открытых оперативных (шунтирующих) операций с целью оценки ассоциации изученных параметров гемостатического звена дисфункции эндотелия и неблагоприятных исходов была выявлена прогностическая роль активности протеина С и развития рестеноза.

#### *Активность протеина С и рестеноз*

Прогностическая модель зависимости активности протеина С и развития рестеноза в группе открытых (шунтирующих) операций: площадь под ROC-кривой (рисунок 57) составила  $0,766 \pm 0,095$  с 95% ДИ: 0,581-0,952.

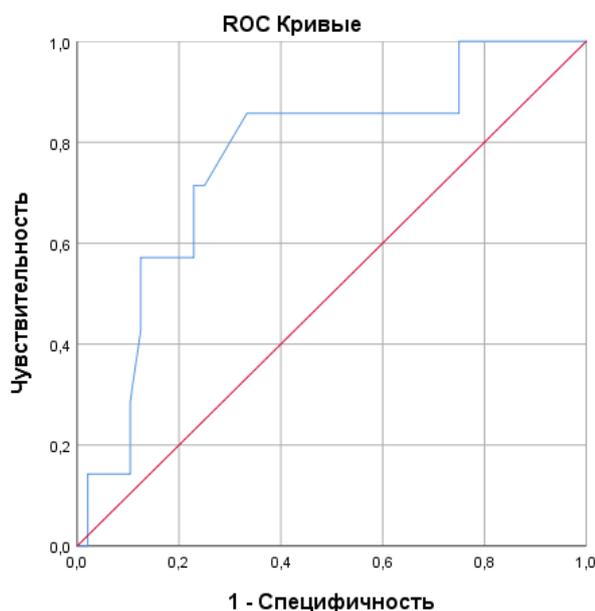


Рисунок 57 – ROC-кривая в прогностической модели зависимости активности протеина С и развития рестеноза в группе открытых (шунтирующих) операций

Значимость модели – 0,024. Пороговое значение PrC в точке cut-off, определенное с помощью индекса Юдена, – 90,1%. Направление проверки по убыванию, при значении PrC равном или ниже точки cut-off прогнозируется развитие рестеноза. Чувствительность и специфичность метода – 85,7% и 66,7%, соответственно. Значение активности PrC до оперативного вмешательства меньше или равное 90,1% повышало риск развития рестеноза в 9 раз (ОР 9, 95% ДИ 1,162 — 69,71).

Полученные данные свидетельствуют о важной роли естественных антикоагулянтов, в частности, протеина С, в развитии осложнений атеросклероза, причем не только тромботических. Эксперименты на животных показали, что кратковременное воздействие протеина С на коронарные артерии приводило к снижению пролиферации неоинтимы и внутривенного рестеноза, однако существующие сложности с созданием покрытий стентов с устойчивым высвобождением протеина С представляет в настоящее время технические сложности [145]. С учетом полученных данных в отношении связи между снижением активности протеина С и развитием рестеноза после открытых реконструктивных вмешательств в периферической сосудистой хирургии может служить основанием к поиску оптимальных способов покрытия синтетических протезов, которые могли бы обеспечивать устойчивое высвобождение активированного протеина С и таким образом препятствовать развитию рестеноза.

#### **4.3.4. Межгрупповые различия в зависимости от вида проведенного лечения**

*Группа консервативного лечения и открытых (шунтирующих) операций*

Активность vWF у пациентов консервативной группы была меньше по сравнению с активностью vWF у больных группы открытых (шунтирующих) вмешательств и составила 300 % (160-300) и 320 % (160-640), соответственно (p=0,012).

Уровень sEPCR у пациентов консервативной группы был меньше по сравнению с больными группы открытых (шунтирующих) вмешательств, составив 48,2 нг/мл (40,6-53,3) и 61,3 нг/мл (47,7-72,3), соответственно ( $p < 0,001$ ). Аналогичная картина отмечалась в отношении уровня (антигена) vWF, значения которого были меньше у пациентов консервативной группы по сравнению с лицами, которым потребовались шунтирующие операции: 0,9 мкг/мл (0,13; ДИ95% 0,85-0,93) и 1,04 мкг/мл (0,22; ДИ95% 0,98-1,12), соответственно ( $p < 0,001$ ).

Уровень ЛПИ был статистически достоверно выше среди пациентов консервативной группы и составил 0,59 (0,2; ДИ95% 0,53-0,65) против 0,29 (0,18; ДИ95% 0,23-0,35) в группе открытых операций ( $p < 0,001$ ).

#### *Группы консервативного лечения и эндоваскулярных операций*

Активность FVIII у пациентов консервативной группы была статистически значимо ниже по сравнению с пациентами эндоваскулярной группы и составила 130,4 % (96,6-154,2) и 146,5 % (107-196), соответственно ( $p = 0,047$ ).

Активность vWF также была ниже среди пациентов, кто получал консервативное лечение и составила 300 % (160-300) и 300 % (160-1200), соответственно ( $p = 0,008$ ).

Уровень sEPCR среди пациентов консервативной группы был статистически значимо ниже по сравнению с пациентами эндоваскулярной группы и составил 48,2 нг/мл (40,6-53,3) и 57,1 нг/мл (42,2-79,2), соответственно ( $p < 0,001$ ).

#### *Группы эндоваскулярного лечения и открытых (шунтирующих) операций*

Уровень ЛПИ в группе эндоваскулярного лечения составил 0,63 (0,28; 0,55-0,72), в группе открытых операций - 0,29 (0,18; 0,23-0,35) ( $p < 0,001$ ).

Уровень (антиген) vWF был ниже у пациентов группы эндоваскулярного лечения по сравнению с лицами, которым потребовались шунтирующие операции

и составил 0,9 мкг/мл (0,2; 0,83-0,97) и 1,04 мкг/мл (0,22; 0,98-1,12), соответственно ( $p < 0,001$ ).

*ROC-анализ в группах эндоваскулярного лечения и открытых (шунтирующих) операций*

При проведении ROC-анализа в группах эндоваскулярного лечения и открытых операций с целью оценки ассоциации изученных параметров гемостатического звена ЭД и неблагоприятных исходов была выявлена прогностическая роль уровня sEPCR и развития рестеноза, а также активности FVIII и развития инфаркта миокарда в течение года после вмешательств.

*sEPCR и рестеноз*

Прогностическая модель зависимости уровня sEPCR и развития рестеноза в группах эндоваскулярного лечения и открытых оперативных (шунтирующих) операций: площадь под ROC-кривой (рисунок 58) составила  $0,711 \pm 0,076$  с 95% ДИ: 0,563-0,86.

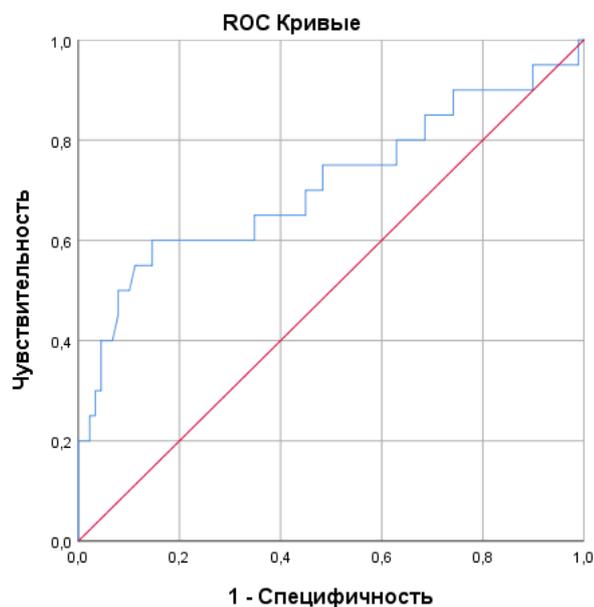


Рисунок 58 – ROC-кривая в прогностической модели зависимости уровня sEPCR и развития рестеноза в группах эндоваскулярного лечения и открытых оперативных (шунтирующих) операций

Значимость модели – 0,003. Пороговое значение sEPCR в точке cut-off, определенное с помощью индекса Юдена, – 45,2. Направление проверки по убыванию, при значении sEPCR равном или ниже точки cut-off прогнозируется развитие рестеноза. Чувствительность и специфичность метода – 60% и 85,4%, соответственно.

### *FVIII и инфаркт миокарда*

Прогностическая модель зависимости активности FVIII и развития инфаркта миокарда в группах эндоваскулярного лечения и открытых оперативных (шунтирующих) операций: площадь под ROC-кривой (рисунок 59) составила  $0,817 \pm 0,077$  с 95% ДИ: 0,666-0,969.

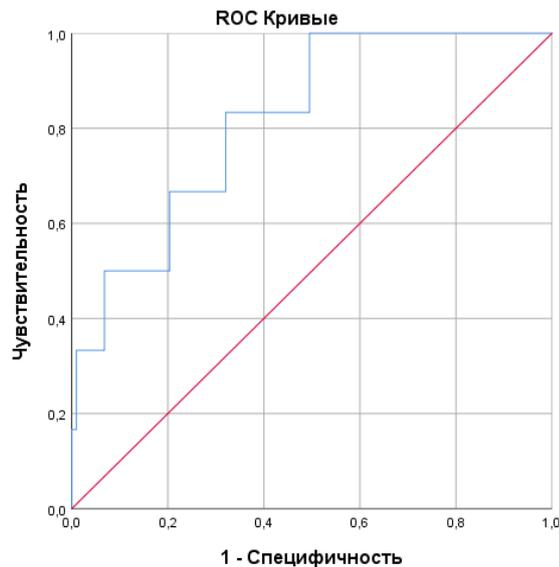


Рисунок 59 – ROC-кривая в прогностической модели зависимости активности FVIII и развития инфаркта миокарда в группах эндоваскулярного лечения и открытых оперативных (шунтирующих) операций

Значимость модели – 0,009. Пороговое значение FVIII в точке cut-off, определенное с помощью индекса Юдена, – 174,4. Направление проверки по возрастанию, при значении FVIII равном или выше точки cut-off прогнозируется развитие ИМ. Чувствительность и специфичность метода – 83,3% и 68%, соответственно.

Суммируя полученные данные, удалось установить, что уровень ЛПИ был статистически значимо ниже среди пациентов групп консервативного и эндоваскулярного лечения по сравнению с группой открытых операций ( $p < 0,001$ ), что соответствует степени поражения артерий конечностей и тяжести ишемии среди больных, кому требовалось хирургическое лечение. Дальнейший статистический анализ показал, что активность vWF у пациентов консервативной группы была ниже по сравнению с активностью vWF у больных групп чрескожных или открытых (шунтирующих) вмешательств ( $p < 0,05$ ).

Аналогичная картина отмечалась в отношении уровня (антигена) vWF, значения которого были в среднем на 13,5% ниже у пациентов консервативной группы по сравнению с лицами, кому потребовалось эндоваскулярное либо открытое хирургическое лечение ( $p < 0,001$ ).

Активность FVIII у пациентов консервативной группы была в среднем на 14,1% ниже по сравнению с пациентами, которым потребовалось проведение эндоваскулярных вмешательств ( $p = 0,047$ ).

Уровень sEPCR у пациентов консервативной группы был в среднем на 27,2% ниже по сравнению с лицами, которым потребовалось оперативное лечение ( $p < 0,001$ ) и 18,5%, чем в группе эндоваскулярного лечения ( $p < 0,001$ ).

ROC-анализ в отношении изучаемых параметров и развития неблагоприятных исходов по обеим группам, где проводилось инвазивное лечение, показал, что уровень sEPCR был связан с развитием рестеноза, активность FVIII - с развитием инфаркта миокарда в течение года после вмешательств. Похожие данные были получены в отношении этих показателей при изучении неблагоприятных исходов среди пациентов группы эндоваскулярного лечения.

Таким образом, для пациентов с ЗПА с продвинутыми стадиями заболевания, кому требовалась артериальная реконструкция в объеме открытой шунтирующей операции, были характерны более высокие активность vWF, а также уровни АГ vWF и sEPCR, что отражает тяжесть ишемии и дисфункции эндотелия в отношении гиперкоагуляции и сосудистого воспаления.

#### **4.4. Разработка прогностических моделей неблагоприятных исходов ЗПА атеросклеротической этиологии**

Проведение бинарной логистической регрессии среди всех трех групп вмешательств, включая субанализ по стадиям заболеваний, в отношении изучаемых показателей гемостатического звена дисфункции эндотелия и основных осложнений, в том числе прогрессирование заболевания, рестеноз, тромбоз, инфаркт миокарда, летальный исход, позволило разработать две прогностические модели:

- 1) развития рестеноза после эндоваскулярных вмешательств;
- 2) летальных исходов после эндоваскулярных вмешательств.

Согласно литературным данным, информация относительно исходов у пациентов с ЗПА атеросклеротической этиологии довольно противоречива. Согласно данным Hess CN и соавт (2017) в течение 3 лет смерть, ИМ или инсульт регистрировались у 11-12% пациентов со стабильным течением атеросклероза, при этом в случае выполнения реваскуляризации - у 14% больных; более того, после открытой реваскуляризации повышены риски ИМ (HR, 1,29; 95% CI, 1,08–1,55) и острой ишемии (HR, 4,23; 95% CI, 2,86–6,25) [49]. Тромбоз (окклюзия) бедренно-подколенных синтетических шунтов отмечается в 12 - 60% случаев в течение года после вмешательства [126].

В случае выполнения эндоваскулярных вмешательств тромбоз стентов в среднем отмечался у 6,1% пациентов в течение года [192]. Летальность после стентирования артерий нижних конечностей согласно данным Katsanos et al. (2018) составила 3,8% в срок 2 года. Согласно международному опыту, рестеноз после эндоваскулярных операций при ЗПА составляет от 15% до 32% в течение года после вмешательств [157].

##### **4.4.1. Модель прогнозирования рестеноза после эндоваскулярных вмешательств. Клинические примеры**

В течение 1 года после эндоваскулярного лечения рестеноз развился у 13 (23,6%) пациентов.

Оценка изучаемых параметров гемостатического звена дисфункции эндотелия в отношении рестеноза после эндоваскулярных вмешательств доказал прогностическую роль уровня sEPCR и активности FVIII в оценке риска рестеноза в течение года после чрескожных периферических интервенций.

В среднем уровень sEPCR до вмешательств составил  $62,1 \pm 22,1$  нг/мл. Активность FVIII до вмешательства составила  $157,7 \pm 64\%$ . У пациентов, среди которых в течение 1 года наблюдения был выявлен рестеноз зоны реконструкции, отмечались следующие статистически значимые различия: изначальный уровень sEPCR у пациентов с рестенозом составил  $46,8 \pm 15,8$  нг/мл по сравнению с пациентами, у которых не было рестеноза  $66,9 \pm 21,7$  нг/мл ( $p=0,002$ ).

Активность FVIII у пациентов с рестенозом до операции составила  $135,6 \pm 60,3\%$ , без рестеноза –  $168,1 \pm 63,6\%$  ( $p=0,05$ ).

R-квадрат Найджелкерка составил 0,524 ( $R^2=0,524$ ).

Значимость модели составила 0,000062 ( $p=0,000062$ ).

Уравнение регрессии:

$$Z = 4,956 - 0,014 * X_1 - 0,089 * X_2 + 2,115 * X_3, \text{ где}$$

$X_1$  – значение активности FVIII до вмешательства;

$X_2$  – значение sEPCR до вмешательства;

$X_3$  – значение, отражающее наличие или отсутствие сахарного диабета 2 типа у пациента – бинарная переменная 0 (нет сахарного диабета) или 1 (есть сахарный диабет).

Расчёт вероятности рестеноза:

$P = 1 / (1 + e^{-Z})$ , где  $P$  – вероятность развития рестеноза,  $e$  – основание натурального логарифма (число Эйлера).

У пациентов с сахарным диабетом 2 типа риск развития рестеноза в 2,6 раз выше, чем у пациентов без сахарного диабета (Отношение рисков 2,6, ДИ 95% 1,031-6,599). Абсолютный риск –  $41,18 \pm 12\%$  (ДИ 95% 17,78-64,58%). Индекс потенциального вреда сахарного диабета 2 типа – 3,94.

Вероятность развития рестеноза находится в обратной зависимости от исходных показателей активности FVIII и уровня sEPCR. Чем ниже значения

FVIII и sEPCR, тем выше вероятность развития рестеноза в послеоперационном периоде.

Если значение вероятности развития исхода выше 0,5 (50%), считается, что данный исход у пациента из данной группы случится в данный промежуток времени (в данном исследовании - 1 год). Если значение меньше 0,5 (50%), считается, что данного исхода у пациентов данной группы в данный промежуток времени не случится.

В литературе представлено несколько потенциальных способов прогнозирования рестеноза после эндоваскулярных вмешательств на артериях нижних конечностей. Gökğöl С. и соавт. (2019) сделали вывод о том, что перспективным может стать прогнозирование риска рестеноза путем оценки гемодинамических показателей кровотока созданием 3D моделей геометрии артерий в различных положениях конечности; при этом авторы уточняют, что в настоящее время имеются существенные ограничения к использованию данной методики в клинической практике [211]. Vertes M. (2019) сообщают о том, что при стентировании артерий аорто-подздошных сегментов у пациентов с периферическим атеросклерозом имплантация стентов с оставлением длинных сегментов эндопротезов в аорте может рассматриваться в качестве нового предиктора [247]. Chen N. и соавт. (2019) сделали заключение о том, что оценка сывороточного уровня Р-селектина и эндотелина-1 имели важное прогностическое значение в оценке развития рестеноза после эндоваскулярного лечения у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей [212]. Lee S. и соавт. (2020) сообщают о том, что соотношение уровня тромбоцитов к лимфоцитам и нейтрофилов к лимфоцитам имеет прогностическое значение в отношении развития рестеноза [210].

Нами выявлено, что наличие сахарного диабета 2 типа являлось важным маркером развития рестеноза у пациентов после эндоваскулярных вмешательств; это соответствует данным, полученным в ходе оценки развития рестеноза у пациентов при чрескожных коронарных вмешательствах [67].

В рамках текущего исследования выявлены статистически значимые различия в уровне растворимых эндотелиальных рецепторов протеина С у пациентов с или без рестеноза в течение года наблюдения. Bilgic M.A. и соавт. (2014) оценивали взаимосвязь селектинов, уровня sEPCR и развития рестеноза у пациентов на гемодиализе после создания артерио-венозной фистулы (АВФ) и пришли к выводу, что степень стеноза АВФ в послеоперационном периоде коррелировала с сывороточным уровнем Е-селектинов, но не sEPCR [225]. Различия в результатах могут быть объяснимы разницей в дизайне исследования и в целом разной патологией у больных, включенных в исследования.

Традиционно, неблагоприятные сердечно-сосудистые события ассоциировались с повышенной активностью факторов коагуляции внутреннего каскада коагуляции, преимущественно, в отношении венозных тромбозомболических осложнений [137]. Выявленное нами снижение активности фактора свертываемости FVIII, характерное для развития рестеноза после эндоваскулярных вмешательств, соотносится с данными, полученными коллективом авторов во главе с Zamzam A. (2020), которые установили, что у больных с хронической ишемией, угрожающей потерей конечности, активность естественных антикоагулянтов протеина С и протеина S, а также факторов коагуляции FIX, FXI и FXII снижена по сравнению с пациентами, не имеющими заболевания периферических артерий [258].

Таким образом, знание предоперационного уровня растворимых эндотелиальных рецепторов к протеину с (soluble endothelial protein C receptors, sEPCR), активности фактора свертываемости VIII (FVIII) и наличия сахарного диабета 2 типа у пациентов с ЗПА атеросклеротической этиологии, которым выполняются эндоваскулярные вмешательства на магистральных артериях нижних конечностей в виде баллонной ангиопластики и/или стентирования с использованием нитиноловых стентов, позволяет выполнить прогнозирование развития рестеноза зоны артериальной реконструкции в течение года после вмешательства.

### Клинический пример № 1

Пациент X, 61 года, с хронической ишемией нижних конечностей вследствие атеросклероза, уровень поражения – бедренно-подколенная окклюзия справа, IV стадия заболевания, страдает сахарным диабетом 2 типа; значения активности FVIII до операции – 48,5%, уровень sEPCR – 40,8 нг/мл.

Подставляем значения в уравнение регрессии:

$$Z = 4,956 - 0,014 * 48,5 - 0,089 * 40,8 + 2,115 * 1 = 2,76$$

Вероятность развития рестеноза в послеоперационном периоде:

$$P = 1 / (1 + e^{-2,76}) = 0,94 \text{ или } 94\%.$$

Прогноз: рестеноз будет.

В послеоперационном периоде после ЧТБА бедренной артерии у пациента X развился рестеноз (рисунок 60).



Рисунок 60 – Ультразвуковое исследование артерий нижних конечностей, сочетание В- и С-режимов. Зона рестеноза бедренной артерии в нижней трети бедра через 3 месяца после ЧТБА бедренной артерии справа

Пациенту выполнено повторное эндоваскулярное вмешательство (ЧТБА) с восстановлением магистрального кровотока (рисунок 61).



Рисунок 61 – Ангиографическое исследование артерий нижних конечностей. Бедренная артерия в нижней трети непосредственно после ЧТБА

### Клинический пример № 2

Пациент Y, 59 лет, с хронической ишемией нижних конечностей вследствие атеросклероза, уровень поражения – бедренно-подколенная окклюзия слева, III стадия заболевания, не страдает сахарным диабетом 2 типа; значения активности FVIII до операции – 83,7%, уровень sEPCR – 42,27 нг/мл.

Подставляем значения в уравнение регрессии:

$$Z = 4,956 - 0,014 * 83,7 - 0,089 * 42,2 + 2,115 * 0 = 0,0284$$

Вероятность развития рестеноза в послеоперационном периоде:

$$P = 1 / (1 + e^{-0.0284}) = 0,507 (50,7\%)$$

Прогноз: рестеноз будет.

В послеоперационном периоде после стентирования бедренной артерии с использованием непокрытого нитинолового стента у пациента Y развился рестеноз (рисунок 62); пациенту выполнено повторное эндоваскулярное вмешательство (ЧТБА стента) с восстановлением магистрального кровотока.

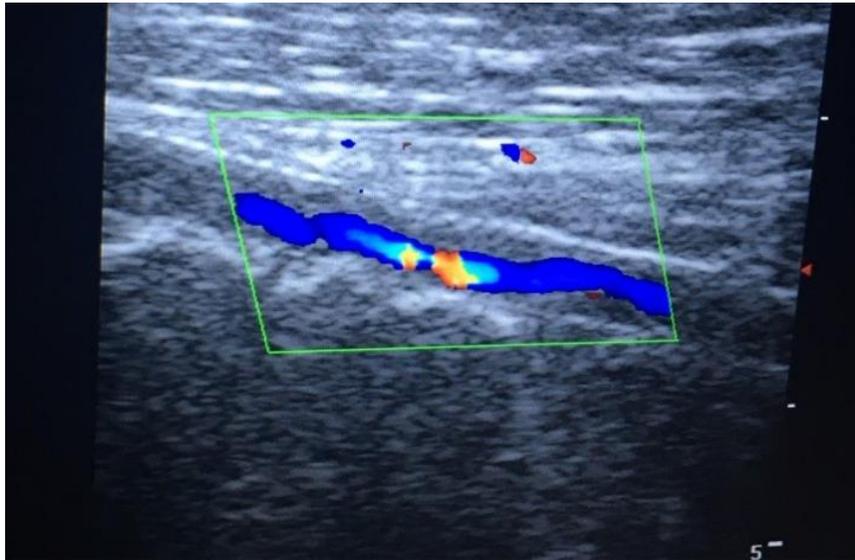


Рисунок 62 – Ультразвуковое исследование артерий нижних конечностей, сочетание В- и С-режимов. Зона рестеноза стента бедренной артерии через 9 месяцев после вмешательства

### Клинический пример № 3

Пациент Z, 78 лет, с хронической ишемией нижних конечностей вследствие атеросклероза, уровень поражения – бедренно-подколенная окклюзия, III стадия заболевания, не страдает сахарным диабетом 2 типа; значения активности FVIII до операции – 139,6%, уровень sEPCR – 78 нг/мл.

Подставляем значения в уравнение регрессии:

$$Z = 4,956 - 0,014 * 139,6 - 0,089 * 78 + 2,115 * 0 = -3,9404$$

Вероятность развития рестеноза в послеоперационном периоде:

$$P = 1 / (1 + e^{-(-3,9404)}) = 0,019 (1,9\%)$$

Прогноз: рестеноза не будет.

В послеоперационном периоде после ЧТБА бедренной и подколенной артерий у пациента Z не развился рестеноз (рисунок 63).

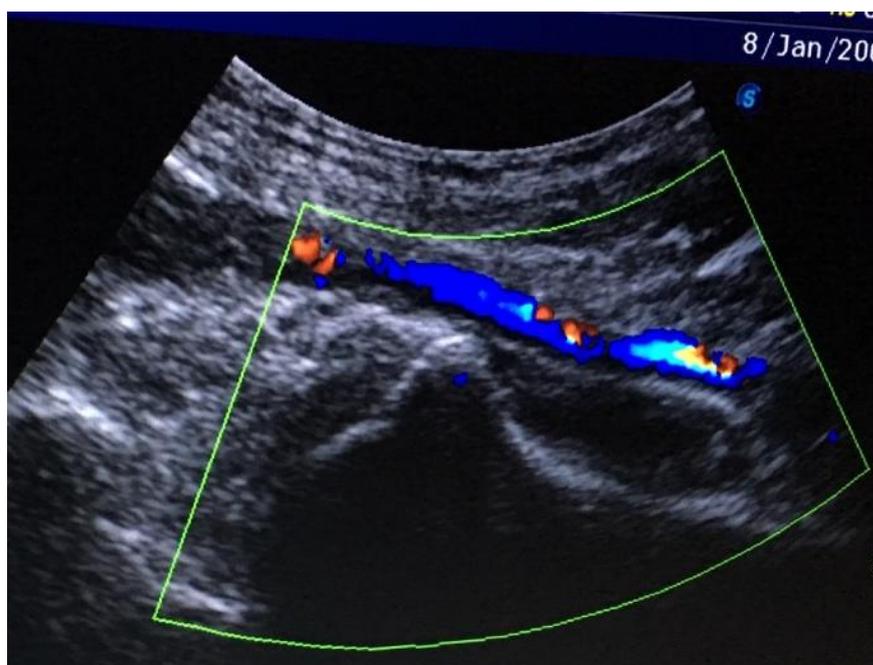


Рисунок 63 – Ультразвуковое исследование артерий нижних конечностей, сочетание В- и С-режимов. Подколенная артерия через 3 месяца после ЧТБА; остаточный стеноз менее 30%

#### **4.4.2. Модель прогнозирования летальных исходов в группе эндоваскулярного лечения. Клинические примеры**

В течение 1 года после эндоваскулярного лечения летальные исходы отмечены у 6 (10,9%) пациентов; в 2 случаях причиной смерти стал острый инфаркт миокарда; причину остальных летальных исходов достоверно установить не удалось, однако, в 2 случаях среди пациентов, у которых развился летальный исход, в течение года было зафиксировано вновь выявленное онкологическое заболевание.

Оценка изучаемых параметров гемостатического звена дисфункции эндотелия в отношении летальных исходов после эндоваскулярных вмешательств доказала прогностическую роль активности vWF и уровня метаболитов NO (суммарной концентрации нитратов и нитритов) в оценке риска смерти в течение года после чрескожных периферических интервенций.

В среднем активность vWF до вмешательства составила  $535,5 \pm 423,3\%$ . Уровень метаболитов NO до вмешательства в среднем составил  $82,6 \pm 28,8$

мкмоль/мл. Активность vWF у пациентов, у кого развился летальный исход в течение 1 года наблюдения, составила  $960 \pm 385,4\%$ ; у пациентов, у кого не развился летальный исход –  $483,5 \pm 401\%$ . При этом повышенная активность vWF при включении в исследование отмечалась и среди больных, у которых в течение года наблюдения развился инфаркт миокарда:  $1050 \pm 300\%$  против  $495,1 \pm 406,5\%$  среди тех, у кого не регистрировался инфаркт миокарда ( $p=0,022$ ).

Уровень метаболитов NO, у кого развился летальный исход в течение 1 года наблюдения, составил в среднем  $95,5 \pm 22,1$  мкмоль/мл, у пациентов, у кого не развился летальный исход –  $81,1 \pm 29,3$  мкмоль/мл.

R-квадрат Найджелкерка – 0,812 ( $R^2=0,812$ )

Значимость модели – 0,000016 ( $p=0,000016$ )

Уравнение регрессии:

**$Z = -46,16 + 0,021 * X_1 + 0,209 * X_2 + 8,471 * X_3$** , где

$X_1$  – значение активности vWF, %

$X_2$  – значение метаболитов NO, мкм\мл

$X_3$  – значение, отражающее наличие или отсутствие гипертонической болезни у пациента – бинарная переменная 0 (нет гипертонической болезни) или 1 (есть гипертоническая болезнь).

Расчёт вероятности исхода:

**$P = 1 / (1 + e^{-Z})$** , где P – вероятность развития летального исхода, e – основание натурального логарифма (число Эйлера).

Вероятность развития летального исхода находится в прямой зависимости от исходных показателей активности vWF и уровня метаболитов NO. Чем выше значения активности vWF и уровня метаболитов NO, тем выше вероятность развития летального исхода в послеоперационном периоде. Наличие гипертонической болезни повышает вероятность летального исхода.

В научной литературе представлено несколько потенциальных способов прогнозирования летальных исходов у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей, в том числе после эндоваскулярных вмешательств на артериях нижних конечностей.

Mueller T и соавт. (2014) выявили, что независимыми предикторами летальных исходов у пациентов с ЗПА были: у больных без сахарного диабета 2 типа в возрасте до 75 лет – высокочувствительный С-реактивный белок (отношение рисков, 3,04; 95% ДИ, 1,48-6,26); у больных с сахарным диабетом в возрасте до 75 лет – натрий-уретический пептид NT-proBNP (отношение рисков, 2,63; 95% ДИ, 1,65-4,19); у пациентов с ЗПА без сахарного диабета в возрасте старше 75 лет – наличие критической ишемии (отношение рисков, 3,70; 95% ДИ, 1,82-7,52) и натрий-уретический пептид NT-proBNP (отношение рисков, 1,93; 95% ДИ, 1,32-2,82); у пациентов с ЗПА и с сахарным диабетом 2 типа в возрасте старше 75 лет – высокочувствительный С-реактивный белок (отношение рисков, 2,61; 95% ДИ, 1,45-4,67) и натрий-уретический пептид NT-proBNP (отношение рисков, 3,31; 95% ДИ, 1,96-5,60) [178].

Kleczyński P и соавт. (2019) изучали различные предикторы летальности после эндоваскулярных вмешательств у пациентов с заболеваниями периферически артерий и пришли к выводу, что наличие инсульта в анамнезе, тяжесть ишемии по классификации Рутерфорда, наличие хронической болезни почек или хронической обструктивной болезни легких, а также эндоваскулярные операции на магистральных артериях конечностей в анамнезе явились независимыми факторами, ассоциированными с летальностью [214].

Таким образом, знание у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей активности фактора фон Виллебранда vWF, уровня метаболитов оксида азота NO и наличия гипертонической болезни перед выполнением эндоваскулярных вмешательств на магистральных артериях нижних конечностей в виде баллонной ангиопластики и/или стентирования, позволяет выполнить прогнозирование развития летального исхода в течение года после вмешательства.

#### **Клинический пример №4**

Пациент N, 71 года, с хронической ишемией нижних конечностей вследствие атеросклероза, уровень поражения – бедренно-подколенная окклюзия

слева, IV стадия заболевания, не страдает гипертонической болезнью; значения активности vWF до операции – 1200%, уровень метаболитов NO – 106 нг/мл.

Подставляем значения в уравнение регрессии:

$$Z = -46,16 + 0,021 * 1200 + 0,209 * 106 + 8,471 * 0 = 1,19$$

Вероятность летального исхода в послеоперационном периоде:

$$P = 1 / (1 + e^{-1,19}) = 0,77 \text{ или } 77\%.$$

В послеоперационном периоде у пациента N отмечен летальный исход.

### **Клинический пример №5**

Пациент М, 61 года, с хронической ишемией нижних конечностей вследствие атеросклероза, уровень поражения – бедренно-подколенная окклюзия справа, III стадия заболевания, страдает гипертонической болезнью; значения активности vWF до операции – 1200%, уровень метаболитов NO – 45 нг/мл.

Подставляем значения в уравнение регрессии:

$$Z = -46,16 + 0,021 * 1200 + 0,209 * 45 + 8,471 * 1 = -3,08$$

Вероятность летального исхода в послеоперационном периоде:

$$P = 1 / (1 + e^{-(-3,08)}) = 0,04 \text{ или } 4\%.$$

В послеоперационном периоде у пациента М не отмечен летальный исход.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема поиска достоверных прогностических маркеров развития осложнений и неблагоприятных исходов заболеваний периферических артерий атеросклеротической этиологии, таких как тромбоз, рестеноз, потеря конечности, инфаркт миокарда и развитие летальных осложнений, а также оптимизации результатов лечения, в настоящее время остается нерешенной. Неблагоприятное течение периферического атеросклероза характеризуется прогрессированием заболевания с развитием критической ишемии, развитием рестеноза и тромбоза зоны реконструкции после перенесенных эндоваскулярных и открытых реконструктивных вмешательств, в патогенезе которых задействован широкий спектр клеточных и молекулярных механизмов. На сегодняшний день влияние дисфункции эндотелия, в особенности, её гемостатического звена, на развитие данных осложнений до конца не изучено. Поэтому исследование показателей функционального состояния эндотелия по параметрам, ответственным за гемостаз и сосудистое воспаление, а также их динамики до и после инвазивного лечения, остаётся актуальным. Повсеместная распространенность периферического атеросклероза, отсутствие четких алгоритмов прогнозирования осложнений, расширение возможностей и доступности как инвазивных, так и терапевтических методов лечения в виде разработки и внедрения в клиническую практику новых стентов, антикоагулянтов и антитромбоцитарных препаратов, диктуют необходимость изучения особенностей патогенеза ЗПА, роли в нём гемостатического звена дисфункции эндотелия с целью оптимизации диагностики и лечения, что призвано улучшить прогноз заболевания и жизни пациентов.

Диссертационное исследование включило в себя экспериментальную и клиническую части. Пристальное внимание в рамках первой было уделено *in vitro* изучению гемостатических маркеров дисфункции эндотелия в первичной культуре эндотелиоцитов HUVEC при воздействии основных материалов, применяемых в реконструктивной артериальной хирургии, а именно, ПТФЭ, ПЭТ (дакрон) и нитинол. 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 (митохондриальная) активность культур эндотелиальных клеток при помощи MTS-теста, миграционная активность первичной культуры HUVEC при помощи скарификационного теста с последующей фотодокументацией полученных результатов и обработкой изображений в программе ImageJ, а также активность фактора фон Виллебранда (VWF), фактора свертывания 8 (FVIII), уровень ингибитора активатора плазминогена 1 (PAI-1), растворимых рецепторов к протеину С (sEPCR), а также уровень метаболитов оксида азота II (NO) (суммарная концентрация нитратов и нитритов) как ключевых гемостатических маркеров дисфункции эндотелия в кондиционной среде; непосредственно в культуре клеток при помощи метода вестерн-блот изучалась экспрессия белков vWF и PAI-1.

В ходе эксперимента было показано, что наибольшее снижение митохондриальной активности в отношении культуры HUVEC показал ПЭТ (дакрон): исследование оптической плотности для данного материала продемонстрировало минимальные показатели метаболической активности культуры клеток, что соответствует её угнетению на 41.7% по сравнению с группой контроля ( $p < 0,001$ ). По данным MTS-теста, через 24 ч после инкубации первичной культуры HUVEC с нитиномом общая метаболическая активность клеток составила 0,32 (0,30-0,34) ед. опт. пл. по сравнению с 0,36 (0,35-0,38) ед. опт. пл. в контроле ( $p < 0.001$ ), т.е. воздействие нитинола характеризовалась умеренным снижением метаболической активности культуры клеток (на 11.1% по сравнению с группой контроля). Метаболическая активность клеток, подверженных воздействию ПТФЭ, была близкой к группе контроля, то есть соответствовала оптимальным условиям функционирования клеток *in vitro* ( $p < 0,001$ ). Изучение миграционной активности культуры клеток, которое оценивалась с помощью теста «заживления повреждения» (англ. «scratch-test») в сроки 12 и 24 часа после инкубации с ПТФЭ, ПЭТ и нитиномом показало, что

воздействие полиэтилентерефталата (ПЭТ) на первичную культуру эндотелиоцитов *in vitro* характеризовалось большим угнетением миграционной активности культуры клеток по сравнению с политетрафторэтиленом (ПТФЭ), группой контроля и нитинола ( $p < 0,001$ ).

Изучение параметров гемостатического звена дисфункции эндотелия показало, что статистически значимые различия были выявлены для уровня ингибитора активации плазминогена-1 (РАI-1) в кондиционной среде между группами контроля и дакрона, составив 165,21 нг/мл (1,88, ДИ 95% 164,17 – 166,25) и 159,83 нг/мл (3,25, ДИ 95% 157,77 – 161,0), соответственно ( $p < 0,001$ ), дакрона и ПТФЭ, составив 159,83 нг/мл (3,25, ДИ 95% 157,77 – 161,90) и 166,33 нг/мл (2,39, ДИ 95% 165,00 – 167,65), соответственно ( $p < 0,001$ ), дакрона и нитинола, составив 159,83 нг/мл (3,25, ДИ 95% 157,77 – 161,90) и 165,06 нг/мл (2,23, ДИ 95% 163,82 – 166,30), соответственно ( $p < 0,001$ ). Статистически значимые изменения получены в отношении активности vWF в кондиционной среде между группами контроля и дакрона, составив 1,0% (1,0-1,35) и 0,5% (0,5-0,5), соответственно ( $p < 0,001$ ), дакроном и ПТФЭ, составив 0,5% (0,5-0,5) и 1,0 % (1,0-1,0), соответственно ( $p = 0,002$ ), дакроном и нитинолом, составив 0,5% (0,5-0,5) и 1,5% (1,0-1,5), соответственно ( $p < 0,001$ ), ПТФЭ и нитинолом, составив 1,0% (1,0-1,0) и 1,5% (1,0-1,5), соответственно ( $p < 0,001$ ). Изучение экспрессии РАI-1 в первичной культуре HUVEC методом Вестерн-блота показало пониженную экспрессию РАI-1 в первичной культуре HUVEC, инкубированной с нитинолом, по сравнению с контролем ( $p = 0,04$ ). Отмечалась повышенная экспрессия РАI-1 при инкубации культуры эндотелиоцитов с ПЭТ (дакроном), однако различия не были статистически значимыми ( $p > 0,05$ ); статистически значимых различий в экспрессии РАI-1 при инкубации культуры HUVEC с ПТФЭ выявлено не было ( $p > 0,05$ ). Изучение экспрессии vWF в первичной культуре HUVEC под воздействием исследуемых материалов показало пониженную экспрессию vWF при инкубации с ПТФЭ, однако различия не были статистически значимыми ( $p > 0,05$ ).

Большое количество *in vitro* исследований посвящено изучению молекулярных и клеточных аспектов развития тромбозов, реакции отдельных клеточных элементов сосудистой стенки на повреждение, включая имплантацию внутрисосудистых стентов [64]. Несмотря на широкий спектр *in vitro* исследований роли различных гемостатических маркеров дисфункции, включая изучение роли PAI-1 в поддержании целостности эндотелиального монослоя, в процессах тромбоза, атеросклероза, фиброза, клеточного старения, влияния vWF и его ингибиторов, sEPCR на процессы воспаления и тромбоза, количество сведений о влиянии синтетических протезов и внутрисосудистых стентов на активность и уровни vWF, FVIII, PAI-1 и sEPCR на элементы клеточной стенки, а также непосредственно культуру эндотелиоцитов, ограничено [19, 140, 243].

Выявленное в рамках *in vitro* исследования снижение миграционной активности первичной культуры эндотелиоцитов при инкубации первичной культуры HUVEC с ПЭТ (дакроном) можно рассматривать как возможный неблагоприятный фактор в отношении потенциальной эндотелизации сосудистых протезов из ПЭТ *in vivo*, одновременно, предполагая вероятный благоприятный эффект в отношении развития рестеноза, что требует дальнейших исследований. Отсутствие значимого влияния на миграционную активность культуры эндотелиоцитов при воздействии ПТФЭ и нитинола позволяет предполагать отсутствие у данных материалов возможного неблагоприятного влияния на процессы эндотелизации протезов. Потенциальное отсутствие выраженных цитотоксических и гиперкоагуляционных свойств у нитинола может играть важную роль в выборе оптимального способа реваскуляризации у пациентов с различной степенью выраженности эндотелиальной дисфункции и тяжести поражения сосудов. Понимание особенностей влияния материала синтетических протезов и стентов на функцию клеток сосудистой стенки может послужить стимулом для поиска оптимальных материалов, а также способов покрытия и тактики послеоперационного лечения, что позволит снизить количество осложнений, включая тромботических.

Клиническая часть диссертационного исследования включила 167 больных с хронической ишемией нижних конечностей вследствие заболевания периферических артерий атеросклеротической этиологии, IIb-IV стадии заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна. Средний возраст больных составил 63 (57;67) года. Подавляющее большинство пациентов (85%) было мужского пола, при этом возраст пациентов мужского пола был статистически значимо ниже, чем возраст больных женского пола, 61,34 (7,97 ДИ95% 60,01-62,68) и 68,84 (6,33 ДИ95% 66,23-71,45) лет, соответственно ( $p < 0,001$ ). Все пациенты в исследовании были распределены в 3 группы в зависимости от проведенного вида лечения: консервативное лечение, эндоваскулярное лечение (ЧТБА и/или стентирование артерий с использованием непокрытых металлических стентов), открытое оперативное (шунтирующее) вмешательство с использованием синтетических сосудистых протезов из ПЭТ (дакрона) или ПТФЭ. Выбор лечения был сделан после тщательного изучения клиники и анамнеза заболевания, данных общелабораторных, биохимических и инструментальных методов диагностики, с учетом индивидуальных анатомических особенностей пациента, а также с учётом воли самого больного в случае отказа от предложенного рентгенэндоваскулярного или открытого реконструктивного вмешательства на артериях конечностей. Пациентам проводились следующие виды обследований: физикальный осмотр с регистрацией жизненно важных показателей проводился при включении в исследование, через 3, 6 и 12 месяцев в зависимости от выбора метода лечения, инструментальные методы диагностики, такие как ультразвуковая доплерография с измерением лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ), ультразвуковое исследование артерий нижних конечностей с использованием сканеров Sono Scape S20 (Китай) и eSaote Lab Seven (Италия), ангиографическое исследование при наличии показаний на ангиографических комплексах Philips «Integris 5000» (Германия) и Siemens Axiom Artis (Германия), а также электрокардиография при помощи электрокардиографа Kaden ECG-9012 (Китай).

При включении в исследование всем больным выполнялся забор периферической венозной крови для исследования активности и уровня следующих гемостатических маркеров дисфункции эндотелия с использованием: активность и уровень фактора фон Виллебранда, активность фактора свертываемости VIII (FVIII) в плазме крови, уровень ингибитора активатора плазминогена 1 типа (PAI-1) и растворимых эндотелиальных рецепторов к протеину С (sEPCR) в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа, активность протеина С в плазме крови, уровень метаболитов оксида азота II (NO) как интегрального показателя функционального состояния эндотелия определялась в сыворотке крови. Коагуляционные исследования проводились на автоматическом коагулометре SYSMEX CA 660 (Япония), иммуноферментные – на автоматическом иммуноферментном анализаторе Lazurit (Dynex, США), оценка уровня метаболитов оксида азота (II) - на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 3200 («Awareness Techonology, Inc.», США). Контрольные исследования проводились пациентам через 3 месяца после выполнения рентгенэндоваскулярных либо открытых оперативных вмешательств.

К статистическому анализу через 1 год наблюдения были доступны данные 158 пациентов. Статистический анализ полученных данных показал, что для пациентов с ЗПА атеросклеротической этиологии было в целом характерно повышение активности FVIII и vWF, а также повышенный уровень sEPCR, при этом отмечалось нарастание значений вышеуказанных параметров по мере нарастания степени тяжести хронической ишемии от IIб к III стадии заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна ( $p < 0,05$ ). При этом у пациентов с язвенно-некротическими изменениями, свидетельствующими о декомпенсации ишемии (IV стадия заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна), отмечалось снижение активности FVIII, составившей в среднем 130% (81,6-146) по сравнению с III стадией заболевания, где активность FVIII составила 155,8% (107,9-205,6) ( $p < 0,05$ ). Общее количество случаев выявления прогрессирования заболевания в течение года наблюдения составило 21 (13,3%), инфарктов миокарда - 10 (6,3%), летальных исходов – 8 (5%), злокачественных

новообразований – 13 (8,2%), ишемического инсульта – 1 (0,6%). Количество рестенозов зон реконструкции в группе эндоваскулярного лечения составило 13 случаев (23,64% от больных в подгруппе), тромбозов - 1 (1,82%); в группе открытых шунтирующих операций было выявлено 6 случаев рестеноза (11,76% от пациентов в подгруппе) и 10 (19,6%) случаев тромбоза зон реконструкции.

Полученные данные в отношении измененной активности параметров коагуляции в зависимости от степени выраженности ишемии соотносятся с данными, полученными в ходе ранее проведенных исследований. Так, Казанцев А.В. (2011) в своей работе показал, что уровень VWF у пациентов с периферическим атеросклерозом превышает таковой у здоровых добровольцев, причем степень увеличения активности VWF прямо коррелирует с тяжестью атеросклеротического процесса [12]. Однако в ходе диссертационного исследования нами было выявлено, что для лиц с прогрессированием заболевания была характерна более низкая активность vWF по сравнению с пациентами со стабильным течением атеросклероза, составив 160 % (150-300) и 300 % (160-300), соответственно ( $p=0,049$ ) при норме 70-150%. Это, наряду со снижением активности FVIII у пациентов с декомпенсацией хронической ишемии, свидетельствует о том, что у лиц с неблагоприятным течением атеросклероза имеют место глубокие нарушения системы гемостаза, которые проявляются своеобразным «истощением» коагуляционного и провоспалительного потенциала ЭК. Кроме того, о данном явлении свидетельствуют более низкие уровни sEPCR у больных с рестенозом после эндоваскулярных операций по сравнению с лицами без рестеноза, значения показателей составили 41,3 нг/мл (36,6-52,9) и 60,35 нг/мл (48,6-87,8), соответственно ( $p=0,002$ ).

Интерес представляют данные по изучению протеина С и его растворимых эндотелиальных рецепторов (sEPCR). Снижение активности протеина С ниже 90,1% в группе больных, которым выполнялись открытые (шунтирующие) операции с использованием синтетических протезов, ассоциировалось с высокими рисками развития рестеноза в течение года после вмешательства (ОР 9, 95% ДИ 1,162 — 69,71). Поэтому перспективными представляются возможности

разработать лекарственные покрытия для синтетических протезов, которые могли бы обеспечить стабильную продукцию протеина С, аналогично экспериментам, которые проводятся в отношении стентов [145]. Пристальное изучение связи изучаемых параметров с возникшими у пациентов осложнениями ЗПА и неблагоприятными исходами показало, что уровни sEPCR, превышающие 53,75 нг/мл, ассоциировались с выявлением злокачественных новообразований в течение года с момента включения в исследование у больных группы консервативного лечения ( $p=0,017$ ). Полученные данные не противоречат наблюдениям, которые говорили о том, что sEPCR могут быть потенциальными маркерами ассоциированной с новообразованиями гиперкоагуляций у больных с гематологическими опухолями [96]. Роль sEPCR в патогенезе злокачественных новообразований и связанных с ними осложнений остается важной темой, представляющей научный интерес для различных областей медицины.

Оценка активности FVIII и vWF показала, что их высокие уровни, в среднем 241 % (177-286,5) и 1200 % (900-1200), соответственно, ассоциировались с развитием инфаркта миокарда у пациентов с ЗПА ( $p<0,05$ ). Полученные данные в отношении активности FVIII и vWF говорят о том, что среди пациентов с ЗПА, особенно в сочетании с ИБС, требуется оценка активности вышеуказанных показателей для оценки сердечно-сосудистых рисков. Кроме того, возможно предположить, что перспективной может стать терапия, направленная на ингибирование активности vWF и FVIII прямым либо опосредованным способом, с целью снижения рисков ИМ и смертельного исхода. Кроме связи с развитием инфаркта миокарда и летальных исходов у пациентов с ЗПА в течение года наблюдений, повышенная активность FVIII определялась у больных с III стадией заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна при открытых шунтирующих операциях с использованием синтетических протезов из ПЭТ, а также при развитии рестеноза после эндоваскулярных вмешательств. С учётом имеющихся данных об особенностях протекания фазы амплификации в рамках клеточной теории гемостаза, где важную роль играет влияние тромбина на высвобождение FVIII из комплекса с vWF, а также влияния тромбина на

активацию Ф9 с запуском механизмов активации факторов 9 и 10 на поверхности активированных тромбоцитов в фазу пропагации, что в итоге приведет к тромбообразованию, можно предположить потенциальное благоприятное воздействие лекарственных средств, ингибирующих тромбин, у пациентов с ЗПА в отношении вышеуказанных осложнений и неблагоприятных исходов.

Изучение уровня метаболитов оксида азота II (суммарной концентрации нитратов и нитритов) у пациентов в среднем не превышал нормальных значений на момент начала исследования, однако, анализ характера осложнений в группах пациентов, кому выполнялись инвазивные вмешательства, показал, что показатель метаболитов NO был распределен неравномерно между больными: так, высокие значения параметра, в среднем 116,3 мкмоль/мл (90-130,5) ( $p=0,025$ ), ассоциировались с потерей конечности в течение года после выполнения шунтирующих операций; низкие значения метаболитов оксида азота (II) ассоциировались с развитием рестеноза зоны артериальной реконструкции и летальными исходами, составив в среднем 35,6 мкмоль/мл ( $p=0,036$ ) и 33 мкмоль/мл (30-36) ( $p=0,043$ ). Обратная картина в отношении ассоциации уровня метаболитов NO (II) и развития летальных исходов была получена при статистическом анализе данных, полученных в группе эндоваскулярных вмешательств. Бинарная логистическая регрессия показала, что вероятность развития летального исхода после эндоваскулярного лечения находилась в прямой зависимости от исходных показателей активности vWF и уровня метаболитов NO (нитритов): чем выше значения активности vWF и уровня метаболитов NO, тем выше вероятность развития летального исхода в послеоперационном периоде. Таким образом, как избыточно высокие, так и низкие уровни метаболитов оксида азота II (NO) характерны для неблагоприятных исходов ЗПА атеросклеротической этиологии, причем среди пациентов, кому проводится эндоваскулярное лечение либо выполняются открытые шунтирующие операции, отмечаются существенные различия в уровнях метаболитов NO (II).

Дальнейшая статистическая обработка результатов показала, что у больных с периферическим атеросклерозом и сахарным диабетом 2 типа наличие последнего увеличивает риски развития рестеноза после эндоваскулярных вмешательств в 2,6 раз (ОР 2,6, ДИ 95% 1,031-6,599), при этом риск развития рестеноза повышен в 4,263 раза при уровне sEPCR ниже 46,8 нг/мл (ОР 4,263, ДИ 95% 1,509-12,042). Существенную роль в оценке рисков развития рестеноза у данной когорты пациентов играла активность FVIII: чем ниже были значения активности FVIII и уровня sEPCR, тем выше была вероятность развития рестеноза в постинтервенционном периоде, что подтверждает важную роль гемостатических (коагуляционных) продуцентов эндотелия в развитии осложнений периферического атеросклероза.

Таким образом, в настоящее время не вызывает сомнения наличие взаимосвязи между ЗПА атеросклеротической этиологии и дисфункцией эндотелия, в том числе её коагуляционным звеном [18]. Изменения в системе гемостаза и сосудистое воспаление являются активными участниками процессов развития осложнений и неблагоприятных исходов [8].

В диссертационном исследовании представлены и систематизированы современные аспекты проблемы осложнений заболеваний периферических артерий нижних конечностей, включая их распространенность, молекулярные и клеточные патофизиологические механизмы. Представлены данные о роли системы коагуляции и показателей гемостатического звена дисфункции эндотелия в возникновении неблагоприятных исходов. Пристальное внимание уделено *in vitro* изучению дисфункции эндотелия, в частности, гемостатического профиля. В рамках клинической части исследования произведена оценка активности и уровней ключевых маркеров дисфункции эндотелия у пациентов с периферическим атеросклерозом при различных стадиях заболевания, распространенности патологического протеза и основных применяемых видах лечения. Выявлены корреляционные связи между активностью и уровнем гемостатических маркеров дисфункции эндотелия до и после эндоваскулярных и открытых оперативных вмешательств, либо на фоне консервативного лечения.

Применение методов логистической регрессии и ROC-анализа позволило выявить основные тенденции и определить влияние исследуемых показателей на течение атеросклеротического процесса и развитие осложнений и неблагоприятных исходов, таких как прогрессирование заболевания, рестеноз, потеря конечности, инфаркт миокарда, развитие новообразований и летальных исходов, а также предложить алгоритмы их прогнозирования, что призвано улучшить результаты лечения и прогноз у больных с заболеваниями периферических артерий атеросклеротической этиологии.

## ВЫВОДЫ

1. MTS-тест может быть использован для рутинного лабораторного изучения влияния искусственных материалов, используемых при реконструктивных артериальных вмешательствах, на метаболическую (митохондриальную) активность первичной культуры клеток сосудистой стенки *in vitro*. Полиэтилентерефталат (дакрон) угнетает метаболическую активность первичной культуры эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES) на 41,7% по сравнению с группой контроля ( $p < 0,05$ ); политетрафторэтилен (ПТФЭ) и нитинол в меньшей степени ингибируют митохондриальную активность культуры эндотелиоцитов *in vitro* ( $p < 0,05$ ).

2. Существенное снижение миграционной активности первичной культуры эндотелиоцитов HUVES при инкубации с ПЭТ (дакроном) можно рассматривать как возможный неблагоприятный фактор в отношении потенциальной эндотелизации сосудистых протезов из ПЭТ *in vivo* и вероятный благоприятный - в отношении развития рестеноза. Отсутствие значимого влияния на миграционную активность культуры эндотелиоцитов при воздействии ПТФЭ и нитинола позволяет предполагать отсутствие у данных материалов существенного неблагоприятного влияния на процессы эндотелизации.

3. Инкубация первичной культуры HUVES с ПТФЭ, ПЭТ и нитинолом характеризуется неоднородным изменением активности и уровня параметров гемостатического звена дисфункции эндотелия: воздействие ПЭТ характеризовалось пониженными активностью vWF (1,0% (1,0-1,35) в группе контроля и 0,5% (0,5-0,5) в группе ПЭТ), и уровня ингибитора активации плазминогена (PAI-1) в кондиционной среде по сравнению с контролем (165,21 нг/мл (1,88, ДИ 95% 164,17 – 166,25) в группе контроля и 159,83 нг/мл (3,25, ДИ 95% 157,77 – 161,90) в группе ПЭТ) ( $p < 0,001$ ); влияние нитинола на первичную культуру эндотелиоцитов не вызвало статистически значимых изменений активности vWF, уровней PAI-1, sEPCR в кондиционной среде, при этом характеризовалась пониженной экспрессией PAI-1 по сравнению с контролем

( $p=0,04$ ), что свидетельствует об отсутствии у исследуемого материала существенных гиперкоагуляционных эффектов.

4. Для пациентов с заболеваниями периферических артерий атеросклеротической этиологии характерны нарушения гемостатического звена функции эндотелия. С нарастанием степени тяжести хронической ишемии от II к III стадии заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна отмечается повышение активности FVIII, vWF и уровня sEPCR ( $p<0,05$ ).

5. Для пациентов с неблагоприятным течением периферического атеросклероза характерно истощение «гемостатического потенциала» эндотелиального профиля, что проявляется снижением активности FVIII у пациентов при декомпенсации кровообращения в виде развития IV стадии заболевания (130% (81,6-146) при IV стадии заболевания, 155,8% (107,9-205,6) при III стадии заболевания ( $p<0,05$ )), более низкой активностью vWF у пациентов с прогрессированием заболевания по сравнению со стабильным течением (160 % (150-300) и 300 % (160-300), соответственно ( $p=0,049$ )) и более низкими уровнями sEPCR у больных с рестенозом после эндоваскулярных операций по сравнению с лицами без рестеноза (41,3 нг/мл (36,6-52,9) и 60,35 нг/мл (48,6-87,8), соответственно ( $p=0,002$ )).

6. Показатели гемостатического звена ЭД изменяются в зависимости от характера и протяженности поражения артериального русла: у пациентов с окклюзионным поражением артерий подвздошно-бедренного сегмента отмечаются наиболее высокие уровни PAI-1 и sEPCR ( $p<0,05$ ). Уровни PAI-1 и sEPCR изменяются в зависимости от наличия сопутствующей патологии: для сочетания ЗПА и ИБС характерно повышение PAI-1, для сочетания ЗПА и гипертонической болезни – повышение sEPCR ( $p<0,05$ ).

7. Повышение уровня sEPCR более 53,75 нг/мл ассоциируется с выявлением онкологического заболевания в течение года с момента выполнения анализа у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей атеросклеротического генеза, требовавшей консервативного лечения ( $p= 0,017$ ).

8. Высокая активность FVIII и vWF, составившая в среднем 241 % (177-286,5) и 1200 % (900-1200), соответственно, выявлена у пациентов с ЗПА, у которых в течение года наблюдения развился инфаркт миокарда ( $p < 0,05$ ).

9. Снижение активности протеина С ниже 90,1% среди пациентов, которым выполнялись открытые (шунтирующие) операции с использованием синтетических протезов из ПТФЭ и ПЭТ (дакрона), ассоциировалось с повышением риска развития рестеноза в течение года после вмешательства в 9 раз (ОР 9, 95% ДИ 1,162 – 69,71).

10. Уровень метаболитов оксида азота II (суммарная концентрация нитратов и нитритов) у пациентов после шунтирующих операций, ассоциированный с ампутацией конечности, достигал максимальных значений и составил в среднем 116,3 мкмоль/мл (90-130,5) ( $p = 0,025$ ), с развитием рестеноза зоны артериальной реконструкции - 35,6 мкмоль/мл ( $p = 0,036$ ), с летальными исходами - 33 мкмоль/мл (30-36) ( $p = 0,043$ ).

11. Активность vWF у пациентов после эндоваскулярного лечения, у кого развился летальный исход в течение 1 года наблюдения, составила  $960 \pm 385,4\%$ ; у пациентов, у кого не развился летальный исход –  $483,5 \pm 401\%$ ; уровень метаболитов NO среди лиц после чрескожных вмешательств, у кого развился летальный исход в течение 1 года наблюдения, составил в среднем  $95,5 \pm 22,1$  мкмоль/мл, у кого не развился летальный исход –  $81,1 \pm 29,3$  мкмоль/мл ( $p < 0,05$ ). Вероятность развития летального исхода после эндоваскулярного лечения находилась в прямой зависимости от исходных показателей активности vWF и уровня метаболитов NO: чем выше значения активности vWF и уровня метаболитов NO, тем выше вероятность развития летального исхода в послеоперационном периоде; наличие гипертонической болезни повышало вероятность летального исхода.

12. Как избыточно высокие, так и выраженно низкие уровни метаболитов оксида азота II характерны для неблагоприятного течения периферического атеросклероза и свидетельствуют о тяжести эндотелиальной дисфункции у пациентов с распространенными формами ЗПА. Нарушения

синтеза оксида азота (II), ассоциированные с летальными исходами, проявляются по-разному в зависимости от выбранного метода лечения, эндоваскулярного либо открытого хирургического с использованием синтетических протезов.

13. У пациентов с ЗПА и сахарным диабетом 2 типа риск развития рестеноза после эндоваскулярных вмешательств на артериях нижних конечностей в 2,6 раз выше, чем у пациентов без диабета (ОР 2,6, ДИ 95% 1,031-6,599). Риск развития рестеноза повышается в 4,263 раза при уровне sEPCR ниже 46,8 нг/мл (ОР 4,263, ДИ 95% 1,509-12,042). Вероятность развития рестеноза у данной когорты пациентов находится в обратной зависимости от исходных показателей активности FVIII и уровня sEPCR: чем ниже значения FVIII и sEPCR, тем выше вероятность развития рестеноза в послеоперационном периоде.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У пациентов с периферическим атеросклерозом целесообразно оценивать показатели гемостатического звена дисфункции эндотелия с целью уточнения тяжести ишемии, характеризующейся измененными активностью FVIII, vWF и уровнем sEPCR, и объема поражения артериального русла, протяженному характеру которого соответствуют повышенные уровни PAI-1 и sEPCR.

2. При планировании лечения, в том числе назначения антитромботической терапии, у пациентов с периферическим атеросклерозом следует учитывать понижение активности FVIII у больных с IV стадией заболевания, vWF при прогрессировании атеросклероза и уровня sEPCR при развитии рестеноза после эндоваскулярных вмешательств, соответствующими истощению «гемостатического потенциала» эндотелиального профиля.

3. Целесообразно оценивать уровень sEPCR у пациентов с ЗПА с целью оценки рисков выявления новообразований; среди лиц с периферическим атеросклерозом с повышенными уровнями sEPCR более 53,75 нг/мл отмечено выявление онкологического заболевания в течение года наблюдения. Выявление повышенных значений sEPCR может способствовать более раннему поиску и выявлению новообразований и, соответственно, своевременному началу лечения.

4. С целью прогнозирования рестеноза после открытых (шунтирующих) операций с использованием синтетических протезов из ПТФЭ и ПЭТ (дакрона) у пациентов с ЗПА целесообразна оценка активности протеина С ввиду того, что снижение последней менее 90,1% ассоциируется с повышением риска развития рестеноза в течение года после вмешательства в 9 раз (ОР 9, 95% ДИ 1,162-69,71).

5. Пациентам с ЗПА атеросклеротической этиологии рекомендуется выполнение анализа плазмы крови на FVIII и vWF ввиду того, что их высокая активность, в среднем 241 % (177-286,5) и 1200 % (900-1200), соответственно, ассоциируется с развитием инфаркта миокарда в течение года наблюдения ( $p < 0,05$ ).

6. Рекомендуется проводить измерение уровня метаболитов оксида азота II (суммарной концентрации нитратов и нитритов) у пациентов с периферическим

атеросклерозом перед выполнением открытых (шунтирующих) операций с использованием синтетических протезов для изучения степени выраженности дисфункции эндотелия и оценки рисков развития тяжелых осложнений: высокие уровни метаболитов NO, 116,3 мкмоль/мл (90-130,5), ассоциируются с повышенными рисками ампутации ( $p=0,025$ ), низкие - с развитием рестеноза зоны артериальной реконструкции (в среднем, 35,6 мкмоль/мл ( $p=0,036$ )) и летальными исходами (3 мкмоль/мл (30-36) ( $p=0,043$ )).

7. С целью прогнозирования летального исхода после эндоваскулярного лечения пациентов с периферическим атеросклерозом целесообразно выявление наличия у больных гипертонической болезни, оценки активности vWF и уровня метаболитов NO (суммарной концентрации нитратов и нитритов). Рекомендовано использовать предложенную формулу расчета прогнозирования развития летального исхода после чрескожных реконструкций, в которой используются вышеупомянутые показатели (патент РФ на изобретение № 2752823).

8. Следует способствовать активному выявлению сахарного диабета 2 типа, а также изучать активность FVIII и уровень sEPCR у пациентов с ЗПА атеросклеротической этиологии при планировании эндоваскулярного лечения с целью прогнозирования неблагоприятных исходов в виде развития рестеноза. Использование предложенной формулы расчета риска развития рестеноза после чрескожной баллонной ангиопластики и/или эндопротезирования с использованием непокрытых нитиноловых стентов будет способствовать прогнозированию развития вышеуказанного осложнения с высокой точностью (патент РФ на изобретение № 2750129).

9. Выполнение ультразвукового исследования артерий нижних конечностей и оценка ЛПИ каждые 3 месяца в течение первого года после выполнения эндоваскулярных (ЧТБА и/или стентирование) либо открытых шунтирующих операций на артериях нижних конечностей позволяет выявить признаки рестеноза и своевременно выполнить повторные вмешательства во избежание развития тромбоза и потери конечности.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АГ vWF - антиген фактора фон Виллебранда

АДФ - аденозиндифосфат

АПС – активированный протеин С (APC, activated protein C)

АТФ - аденозинтрифосфат

ВК - верхний квартиль

ГБ - гипертоническая болезнь

ГМК - гладкомышечные клетки

ДААТ - двойная антитромбоцитарная терапия

ДИ - доверительный интервал

ЗПА - заболевания периферических артерий

ИБС - ишемическая болезнь сердца

ИМ – инфаркт миокарда

ЛПИ - лодыжечно-плечевой индекс

ЛПОНП – липопротеиды очень низкой плотности

НК - нижний квартиль

ПИКС - постинфарктный кардиосклероз

ПТФЭ - политетрафторэтилен

ПХ - перемежающаяся хромота

ПЭК - прогениторные эндотелиальные клетки (endothelial progenitor cells, EPC)

ПЭТ - полиэтилентерефталат

РКИ - рандомизированные клинические исследования

СД – сахарный диабет

СКО,  $\sigma$  - стандартное квадратичное отклонение

цГМФ - циклический гуанозинмонофосфат

ЧТБА - чрескожная транслюминальная баллонная ангиопластика

ЭД - эндотелиальная дисфункция

ЭК - эндотелиальные клетки

ADAM - дизинтегрин и металлопротеиназа (A Disintegrin And Metalloproteinase)

CRP - С-реактивный белок (c-reactive protein)

EGF - эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor)

ЕРСR - эндотелиальные рецепторы протеина С (endothelial protein C receptors)

FGF - фактор роста фибробластов, основной и кислый (fibroblast growth factor, basic and acidic)

FVIII - фактор коагуляции VIII

GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (colony stimulating factor 2)

GP – гликопротеин (glycoprotein)

HUVEC - эндотелиальные клетки пупочной вены человека (human umbilical

iNOS - индуцибельная NO-синтаза (inducible nitric oxide synthase)

MACE - крупные нежелательные сердечно-сосудистые события (major adverse cardiovascular events)

MCSF - колониестимулирующий фактор макрофагов (macrophage colony-stimulating factor)

MCP-1 - белок хемотаксиса моноцитов (monocyte chemoattractant protein-1)

MMP – матричные металлопротеиназы (matrix metalloproteinase)

NO - оксид азота (II) (nitric oxide)

PAI-1 - ингибитор активации плазминогена 1 типа (plasminogen activator inhibitor-1)

PDGF - тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor)

PrC – протеин C (protein C)

PrS – протеин S (protein S)

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

sEPCR - растворимые эндотелиальные рецепторы протеина C (soluble endothelial protein C receptor)

TF – тканевой фактор (tissue factor)

TGF - трансформирующий фактор роста (transforming growth factor)

TNF - фактор некроза опухоли (tissue necrosis factor)

tPA - активатор плазминогена тканевого типа (tissue plasminogen activator)

uPA – активатор плазминогена урокиназного типа (urokinase-type plasminogen activator)

VEGF - сосудистый эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor)

vein endothelial cells)

vWF - фактор фон Виллебранда (von Willebrand factor)

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Арзамасцев, Д.Д. Воспаление сосудистой стенки и гипергомоцистеинемия у больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей / Д.Д. Арзамасцев, А.А. Карпенко, Г.И. Костюченко. – Текст (визуальный): непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2012. – Т. 18, № 1. – С.27-30.
2. Байдамшина, Д.Р. Оценка генотоксичности и цитотоксичности препаратов иммобилизованного на матрице хитозана трипсина / Д.Р. Байдамшина, Е.Ю. Тризна, М.Г. Холявка. – Текст (визуальный): непосредственный // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2016. – № 3. – С. 53-57.
3. Белов, Ю.В. Повторные реконструктивные оперативные операции на аорте и магистральных артериях / Ю.В. Белов, А.Б. Степанов. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2009. – 176с. – Текст (визуальный): непосредственный.
4. Бокерия, Л.А. Национальные рекомендации по диагностике и лечению заболеваний артерий нижних конечностей / Л.А. Бокерия, А.В. Покровский. – М., 2019. – Текст (визуальный): непосредственный.
5. Буркова, Н.Н. Госпитальные исходы реконструктивных вмешательств на аорто-бедренном сегменте у пациентов с мультифокальным атеросклерозом / Н.Н. Буркова, А.Н. Казанцев, Р.С. Тарасов. – Текст (визуальный): непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2018. – Т. 24, № 2. – С. 139-145.
6. Васильева, М.Ю. Коллаген-связывающая способность фактора виллебранда как качественная характеристика фактора Виллебранда / М.Ю. Васильева, А.В. Колосков, О.И. Филиппова. – Текст (визуальный): непосредственный // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2016. – Т. 67, № 3. –С. 93-96.
7. Горшунова, Н.К. Влияние оксида азота на регуляцию агрегационного процесса у больных гипертонической болезнью при старении / Н.К. Горшенова, Н.И. Соболева. – Текст (визуальный): непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 6. – С. 53-60.

8. Динамика изменений в фибринолитической системе гемостаза у больных с синдромом критической ишемии нижних конечностей / Е.В. Дрожжин, О.Н. Сидоркина, Ю.В. Никитина, Д.А. Федоров. – Текст (визуальный): непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 6. – С.1-10.
9. Иванов, А.Н. Барьерная функция эндотелия, механизмы ее регуляции и нарушения / А.Н. Иванов, Д.М. Пучиньян, И.А. Норкин. – Текст (визуальный): непосредственный // Успехи физиол. наук. – 2015. – Т. 46, № 2. – С. 72-96.
10. Иванов, А.Н. Структурные особенности эндотелиальных клеток млекопитающих и человека / А.Н. Иванов, И.О. Бугаева, М.О. Куртукова. – Текст (визуальный): непосредственный // Цитология. – 2016. – Т. 58, № 9. – С. 657-665.
11. Казаков, Ю.И. Антитромботическая терапия после шунтирования ниже паховой связки / Ю.И. Казаков, И.Б. Лукин, Н.Ю. Соколова. – Текст (визуальный): непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2017. – Т. 23, № 4. – С. 13-19.
12. Казанцев, А.В. Диагностика прогрессирующего течения облитерирующего атеросклероза бедренно – подколенно - берцовой локализации / А.В. Казанцев, Е.А. Корымасов. – Текст (визуальный): непосредственный // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 1. – С. 62-67.
13. Карпенко, А.А. Результаты вмешательств у больных с окклюзионно-стенотическими поражениями артерий аорто – подвздошного сегмента / А.А. Карпенко, В.Б. Стародубцев, П.В. Игнатенко. – Текст (визуальный): непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2016. – Т. 22, № 2. – С. 77-81.
14. Карпов, Ю.А. Воспаление и атеросклероз: состояние проблемы и нерешенные вопросы / Ю.А. Карпов, Е.В. Сорокин, О.А. Фомичева. – Текст (визуальный): непосредственный // Сердце. – 2003. – Т.2, № 4(10). – С. 190-192.
15. Киричук, В.Ф. Функции эндотелия сосудистой стенки / В.Ф. Киричук, А.П. Ребров, С.П. Россошанская. – Текст (визуальный): непосредственный // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2005. – Т. 226, № 2. –С. 23-29.

16. Клинические и лабораторные предикторы неблагоприятных кардиальных событий у больных ишемической болезнью сердца после планового чрескожного коронарного вмешательства / Е.З. Голухова, М.В. Григорян, М.Н. Рябина [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2016. – Т. 12, №. 5. – С. 528-535.
17. Макацария, А.Д. Система протеина С и патологические состояния организма, в частности в акушерской практике / А.Д. Макацария, Р.А. Абрамян, Д.Х. Хизроева. – Текст (визуальный): непосредственный // Медицинская наука Армении НАН РА. – 2013. – Т. 3, № 4. –С. 8-20.
18. Мелкумян, А.Л. Факторы риска системы гемостаза при заболеваниях аорты, магистральных и периферических сосудов / А.Л. Мелкумян; НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. – М., 2001. – 36 с. – Текст (визуальный): непосредственный.
19. Момот, А.П. Перспективные направления в диагностике и лечении критических нарушений гемостаза / А.П. Момот. – Текст (визуальный): непосредственный // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2010. – №1. – С. 11-16.
20. Национальные рекомендации по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей / А.В. Троицкий, А.В. Чупин, А.В. Покровский [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2013.– Т. 19, № 2. – С. 1- 75.
21. Оценка фибринолитической активности у больных облитерирующим атеросклерозом нижних конечностей до и после реконструктивных вмешательств / В.А. Лазаренко, Е.А. Бобровская М.В. Хруслов [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2017. – Т. 69, № 1.– С. 55-59.
22. Оценка эндотелиальной дисфункции в профилактике осложнений у больных с поражением периферических артерий / А.В. Покровский, В.А. Кульбак, Т.А. Кременчугская [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2017. –Т. 23, № 4. –С. 29-33.
23. Пальцев, М.А. Межклеточные взаимодействия / М.А. Пальцев, А.А. Иванов, С.Е. Северин. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2003. – 288 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

24. Папоян, С.А. Отдаленные результаты эндоваскулярного лечения поражений поверхностной бедренной артерий типов С и D по классификации TASC II / С.А. Папоян, А.А. Щеголев, А.Н. Радченко. – Текст (визуальный): непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2018. – Т. 24, № 1. – С. 73-77.
25. Перспективные методы исследования перфузии у пациентов с атеросклерозом периферических артерий / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2018. – Т. 24, №3. – С. 32-38.
26. Петрищев, Н.Н. Дисфункция эндотелия: причины, механизм, фармакологическая коррекция / Н.Н. Петрищев. – СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2003. – 184 с. – Текст (визуальный): непосредственный.
27. Показатели системы гемостаза у пациентов с атеросклерозом периферических артерий / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н. И. Пирогова. – 2018. – Т. 13, № 3. – С. 29-33.
28. Покровский, В.И. Оксид азота, его физиологические и патофизиологические свойства / В.И. Покровский, Н.А. Виноградов. – Текст (визуальный): непосредственный // Терапевтический архив. – 2005. – №1. – С. 82-87.
29. Полонецкий, О.Л. Дисфункция эндотелия и атеросклероз / О.Л. Полонецкий, Л.З. Полонецкий. – Текст (визуальный): непосредственный // Медицинский новости. – 2012. – № 6. – С. 6- 11.
30. Попова, А.А. Эндотелиальная дисфункция и механизмы ее формирования / А.А. Попова, Е.Н. Березикова, С.Д. Маянская. – Текст (визуальный): непосредственный // Сибирское медицинское обозрение. – 2010. – № 4. – С. 7-11.
31. Романов, Ю.А. Совместное культивирование эндотелиальных и гладкомышечных клеток аорты человека: функциональная гетерогенность эндотелия в зонах с различной предрасположенностью к атеросклерозу / Ю.А.

Романов, Н.В. Кабаева. – Текст (визуальный): непосредственный // Цитология. – 1999. – № 8. – С. 716- 720.

32. Синьков, С.В. Диагностика и коррекция расстройств системы гемостаза / С.В. Синьков, И.Б. Заболотских. – М.: Практическая медицина, 2017. – 336 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

33. Современные аспекты проведения тредмил теста у пациентов с заболеваниями периферических артерий / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2019. – Т. 25, №2. – С. 25-30.

34. Современные представления о системе фибринолиза и методах диагностики ее нарушений / А.С. Жалылов, А.Н. Баландина, А.Д. Купраш [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2017. – Т. 16, № 1. – С. 69-82.

35. Соколов, Е.И. Взаимосвязь эндотелина-1, фактора Виллебранда и показателей тромботического статуса при ишемической болезни сердца / Е.И. Соколов, С.Р. Штин, Н.В. Баюрова. – Текст (визуальный): непосредственный // Технологии живых систем. – 2013. – Т. 10, № 6. –С. 57-64.

36. Стенты сосудов: подходы, используемые для повышения их клинической эффективности / К.А. Кузнецов, М.В. Харьков, А.А. Карпенко [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2018. – Т. 24, № 2. – С. 69-79.

37. Тактические ошибки в хирургическом лечении больных с критической ишемией нижних конечностей при поражении артерий бедра и голени / А.В. Гавриленко, А.Э. Котов, Я.Ю. Муравьева [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2011. – № 5. –С. 10-14.

38. Черешнев В.А Клиническая патофизиология: курс лекций / под ред. В. А. Черешнева, П. Ф. Литвицкого, В. Н. Цыгана. – 2-е изд., испр. и доп. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2015. – 472 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

39. Швальб, П.Г. Возможные пути стимуляции выработки оксида азота, как основного индуктора эндотелиальной дисфункции, кардиотропными лекарственными средствами у больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей / П.Г. Швальб, Р.Е. Калинин, А.С. Пшенников. – Текст (визуальный): непосредственный // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2011. – № 2. – С. 52-58.
40. Шишонок, А.И. Современные аспекты гемостаза / А.И. Шишонок, И.Г. Щербакова. – Текст (визуальный): непосредственный // Международный студенческий научный вестник. – 2015. – № 2. – С. 1-4.
41. Эндотелий *in vivo* и *in vitro*. Часть 1: гистогенез, структура, цитофизиология и ключевые маркеры / Е.А. Стрельникова, П.Ю. Трушкина, И.Ю. Суров [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2019. – Т.7, №3. – С. 450- 465.
42. 2016 scientific sessions Sol Sherry distinguished lecturer in thrombosis: thrombotic stroke: neuroprotective therapy by recombinant-activated protein C / J.H. Griffin, L.O. Mosnier, J.A. Fernández [et al.]. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2016. – Vol. 36, N 11. – P.2143–2151.
43. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of peripheral arterial diseases, in collaboration with the European Society for vascular surgery / V. Aboyans, J.B. Ricco, E.L. M.L. Bartelink [et al.]. – Text: visual // *European Heart Journal.* – 2018. – Vol. 55, N 3. – P.763-816.
44. A cell-based model of coagulation and its implications / C.N. Ferreira, M.O. Sousa, L.M.S. Dusse [et al.]. – Text: visual // *Rev Bras Hematol Hemoter.* – 2010. – N. 5. – P.416-421.
45. A genome-wide association study identifies a region at chromosome 12 as a potential susceptibility locus for restenosis after percutaneous coronary intervention / M.L. Sampietro, S. Trompet, J.J. Verschuren [et al.]. – Text: visual // *Hum Mol Genet.* – 2011. – Vol. 20, N 23. – P. 4748–4757.

46. A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis / B. Saposnik, J.L. Reny, P. Gaussem [et al.]. – Text: visual // *Blood*. – 2004. – Vol. 103, N 4. – P. 1311-8.
47. A new venous prosthesis / T. Soyer, M. Lempinen, P. Cooper [et al.]. – Text: visual // *Surgery*. – 1972. – Vol. 72, N 6. – P. 864.
48. A novel drug-eluting stent coated with an integrinbinding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells / R. Blindt, F. Vogt, I. Astafieva [et al.]. – Text: visual // *J Am Coll Cardiol*. – 2006. – Vol. 47, N 9. – P.1786– 1795.
49. A Structured Review of Antithrombotic Therapy in Peripheral Artery Disease With a Focus on Revascularization: A TASC (InterSociety Consensus for the Management of Peripheral Artery Disease) Initiative / C.N. Hess, L. Norgren, G.M. Ansel [et al.]. – Text: visual // *Circulation*. – 2017. – Vol. 135, N 25. – P.2534-2555. Erratum in: *Circulation*. – 2017. – Vol. 136, N 19. – P.e347.
50. Abouhamda, A. Lower sensitivity of ankle-brachial index measurements among people suffering with diabetes-associated vascular disorders: A systematic review / A. Abouhamda, M. Alturkstani, Y. Jan. – Text: visual // *SAGE Open Med*. – 2019. – N 7. – P.2050312119835038.
51. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective / T. Cheng, D. Liu, J.H. Griffin [et al.]. – Text: visual // *Nat Med*. – 2003. – Vol. 9, N 3. – P.338–342.
52. Activated protein C signals through the thrombin receptor PAR1 in endothelial cells / M. Riewald, R.J. Petrovan, A. Donner [et al.]. – Text: visual // *J Endotoxin Res*. – 2003. – Vol. 9, N 5. – P. 317–321.
53. Activated protein C–protein C inhibitor complex in patients with abdominal aortic aneurysms: is it associated with diameter and growth rate? / T. Kölbel, K. Strandberg, T. Donath [et al.]. – Text: visual // *Vasc Endovasc Surg*. – 2008. – Vol. 42, N 2. – P.135.

54. Activation mechanism of anticoagulant protein C in large blood vessels involving the endothelial cell protein C receptor / K. Fukudome, X. Ye, N. Tsuneyoshi [et al.]. – Text: visual // *J Exp Med.* – 1998. – Vol. 187, N 7. – P.1029–1035.
55. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\delta$  as novel therapeutic strategy to prevent in-stent restenosis and stent thrombosis / J. Hytönen, O. Leppänen, J.H. Braesen [et al.]. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2016. – Vol. 36, N 8. – P.1534–1548.
56. Acute myocardial infarction for thrombotic occlusion in patient with elevated coagulation factor VIII / V. Hernández, N. Muñoz, M.A. Montero [et al.]. – Text: visual // *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* – 2012. – Vol. 65, N 7. – P.673-4.
57. Aggressive venous neointimal hyperplasia in a pig model of arteriovenous graft stenosis / B.S. Kelly, S.C. Heffelfinger, J.F. Whiting [et al.]. – Text: visual // *Kidney Int.* – 2002. – Vol. 62, N 6. – P.2272.
58. Aird, W.C. Vascular bed-specific hemostasis: role of endothelium in sepsis pathogenesis / W.C. Aird. – Text: visual // *Crit Care Med.* – 2001. – Vol. 29, N 7. – S28-34.
59. Albulescu, R. Comprehensive In Vitro Testing of Calcium Phosphate Based Bioceramics with Orthopedic and Dentistry Applications / R. Albulescu, A.-C. Popa, A.-M. Enciu. – Text: visual // *Materials.* – 2019. – Vol. 22, N 12. – P. 3704.
60. Aldrich, J.L. In situ fixation and subsequent collection of cultured endothelial cells in a shear flow / J.L. Aldrich, D.S. Long. – Text: visual // *Methods X.* – 2019. – N 6. – P.1164–1173.
61. Algahtani, F.H. High factor VIII levels and arterial thrombosis: illustrative case and literature review / F.H. Algahtani, R. Stuckey. – Text: visual // *Ther Adv Hematol.* – 2019. – N 10. – P.2040620719886685.
62. Ankle-brachial index is lower in hypertensive than in normotensive individuals in a cardiovascular risk population / P.E. Korhonen, K.T. Syvänen, R.K. Vesalainen [et al.]. – Text: visual // *J Hypertens.* – 2009. – Vol. 27, N 10. – P. 2036-43.
63. Anti-MCP-1 gene therapy inhibits vascular smooth muscle cells proliferation and attenuates vein graft thickening both in vitro and in vivo / A. Schepers, D. Eefting,

- P.I. Bonta [et al.]. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2006. – Vol. 26, N 9. – P. 2063.
64. Antithrombin nanoparticles inhibit stent thrombosis in ex vivo static and flow models / R.U. Palekar, C. Vemuri, J.N. Marsh [et al.]. – Text: visual // *J. Vasc. Surg.* – 2016. – Vol. 64, N 5. – P. 1459-1467.
65. Anti-thrombotic and pro-fibrinolytic effects of levosimendan in human endothelial cells in vitro / K.A. Krychtiuk, C. Kaun, P.J. Hohensinner [et al.]. – Text: visual // *Vascul Pharmacol.* – 2017. – N 90. – P.44-50.
66. Apolipoprotein E receptor 2 mediates activated protein C-induced endothelial Akt activation and endothelial barrier stabilization / R.K. Sinha, X.V. Yang, J.A. Fernández [et al.]. – Text: visual // *JA Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2016. – Vol. 36, N 3. – P. 518–524.
67. Armstrong, E.J. Percutaneous coronary intervention in patients with diabetes: current concepts and future directions / E.J. Armstrong, J. Waltenberger, J.H. Rogers. – Text: visual // *J Diabetes Sci Technol.* – 2014. – Vol. 8, N 3. – P.581–589.
68. Aslantürk, Ö.S. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. Genotoxicity – A Predictable Risk to Our Actual World / Ö.S. Aslantürk. – Text : electronic // Intechopen. Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World. – 2018. – URL: <https://cdn.intechopen.com/pdfs/57717.pdf>
69. Association between plasminogen activator inhibitor-1 and cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis / R.G. Jung, P. Motazedian, F.D. Ramirez [et al.]. – Text: visual // *Thromb J.* – 2018. – N 16. – P.12.
70. Association of soluble endothelial protein C receptor plasma levels and PROCRA rs867186 with cardiovascular risk factors and cardiovascular events in coronary artery disease patients: the Athero Gene study / C. Kallel, W. Cohen, N. Saut [et al.]. – Text: visual // *BMC Med Genet.* – 2012. – N 13. – P. 103.
71. Ataya, B. Nitrite-generated nitric oxide to protect against intimal hyperplasia formation / B. Ataya, E. Tzeng, B.S. Zuckerbraun. – Text: visual // Trends Cardiovasc Med. – 2011. – Vol. 21, N 6. – P. 157-62.

72. Barmore, W. Biochemistry, Clotting Factors / W. Barmore, B. Burns. – StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2019. – Text : electronic. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507850/>
73. Berk, B.C. Atheroprotective signaling mechanisms activated by steady laminar flow in endothelial cells / B.C. Berk. – Text: visual // *Circulation*. – 2008. – Vol. 117, N 8. – P.1082–1089.
74. Burden of Coronary Artery Disease and Peripheral Artery Disease: A Literature Review / R. Bauersachs, U. Zeymer, J.B. Brière [et al.]. – Text: visual // *Cardiovasc Ther*. – 2019. – Vol. 2019. – P.8295054.
75. Characterization of protein C receptor expression in monocytes / L. Galligan, W. Livingstone, Y. Volkov [et al.]. – Text: visual // *Br J Haematol*. – 2001. – Vol. 115, N 2. – P.408–414.
76. Chiu, J.J. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives / J.J. Chiu, S. Chien. – Text: visual // *Physiol Rev*. – 2011. – Vol. 91, N 1. – P.327– 387.
77. Circulating endothelial cell protein C receptor: endothelial regulation and cumulative impact of gender and a3 haplotype / C. Guitton, N. Gerard, T. Quillard [et al.]. – Text: visual // *J Vasc Res*. – 2011. – Vol. 48, N 4. – P. 336–346.
78. Coenen, D.M. Platelet interaction with activated endothelium: mechanistic insights from microfluidics / D.M. Coenen, T.G. Mastenbroek, J.M.E.M. Cosemans. – Text: visual // *Blood*. – 2017. – Vol. 130, N 26. – P.2819–2828.
79. Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Hemostasis Working Group and the VA Million Veteran Program. Mendelian Randomization Analysis of Hemostatic Factors and Their Contribution to Peripheral Artery Disease-Brief Report / A.M. Small, J.E. Huffman, D. Klarin [et al.]. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2021. – Vol. 41, N 1. – P.380-386.
80. Comparison of endothelial cell- and endothelial progenitor cell-derived exosomes in promoting vascular endothelial cell repair / H. Hui, J. Chunyu, L. Ruiting [et al.]. – Text: visual // *Int J Clin Exp Pathol*. – 2019. – Vol. 12, N 7. – P.2793-2800.

81. Complement activation by synthetic vascular prostheses / A.D. Shepard, J.A. Gelfand, A.D. Callow [et al.]. – Text: visual // *J Vasc Surg.* – 1984. – Vol. 6, N 1. – P. 829.
82. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant / S. Sartore, A. Chiavegato, E. Faggin [et al.]. – Text: visual // *Circ Res.* – 2001. – Vol. 89, N 12. – P. 1111–1121.
83. Cornelissen, J. Mechanical stretch induces phosphorylation of p38-MAPK and apoptosis in human saphenous vein / J. Cornelissen, J. Armstrong, C.M. Holt. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2004. – Vol. 24, N 3. – P.451–456.
84. Costa, C. Elevated factor VIII in a patient with acute coronary syndrome / C. Costa, M. Alves, D. Durao. – Text: visual // *RevPortCardiol.* – 2014. – Vol. 33, N 3. – P.181-84.
85. Coughlin, S.R. Thrombin signalling and protease-activated receptors / S.R. Coughlin. – Text: visual // *Nature.* – 2000. – Vol. 34, N 12. – P.258-64.
86. Crea, F. Acute coronary syndromes: the way forward from mechanisms to precision treatment / F. Crea, P. Libby. – Text: visual // *Circulation.* – 2017. – Vol. 136, N 12. – P. 1155–1166.
87. Criqui, M.H. Epidemiology of peripheral artery disease / M.H. Criqui, V. Aboyans. – Text: visual // *Circ Res.* – 2015. – Vol. 116, N 9. – P.1509–1526.
88. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins, identification by morphologic and immunologic criteria / E.A. Jaffe, R.L. Nachman, C.G. Becker [et al.]. – Text: visual // *J. Clin. Invest.* – 1973. – Vol. 52, N 11. – P. 2745-56.
89. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries / D. Kong, L.G. Melo, M. Gnecci [et al.]. – Text: visual // *Circulation.* – 2004. – Vol. 110, N 14. – P.2039–2046.
90. Dayal, S. Deficiency of superoxide dismutase impairs protein C activation and enhances susceptibility to experimental thrombosis / S. Dayal, S.X. Gu, R.D. Hutchins. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2015. – Vol. 35, N 8. – P.1798–1804.
91. Development of immortalized human cerebromicrovascular endothelial cell line as an in vitro model of the human blood-brain barrier / A. Muruganandam, L.M.

- Herx, R. Monette [et al.]. – Text: visual // FASEB J. – 1997. – Vol. 11, N 13. – P. 1187-97.
92. DeYoung, M.B. Plasminogen activator inhibitor type 1 increases neointima formation in balloon-injured rat carotid arteries / M.B. DeYoung, C. Tom, D.A. Dichek. – Text: visual // Circulation. – 2001. – Vol. 104, N 16. – P.1972–1981.
93. Discovery of a Parenteral Small Molecule Coagulation Factor XIa Inhibitor Clinical Candidate (BMS-962212) / D.J.P. Pinto, M.J. Orwat, L.M. Smith 2<sup>nd</sup> [et al.]. – Text: visual // J Med Chem. – 2017. – Vol. 60, N 23. – P.9703-9723.
94. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries / K. Tanaka, M. Sata, Y. Hirata [et al.]. – Text: visual // Circ Res. – 2003. – Vol. 93, N 8. – P. 783– 790.
95. Dual regulatory effects of nitric oxide on plasminogen activator inhibitor type 1 expression in endothelial cells / M. Swiatkowska, A. Cierniewska-Cieslak, Z. Pawlowska [et al.]. – Text: visual // Eur J Biochem. – 2000. – Vol. 267, N 4. – P.1001-7.
96. Ducros, E. Soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) is likely a biomarker of cancer-associated hypercoagulability in human hematologic malignancies / E. Ducros, S.S. Mirshahi, A.M. Faussat. – Text: visual // Cancer Med. – 2012. – Vol. 1, N 2. – P.261-7.
97. Effect of nitric oxide reduction on arterial thrombosis / D. Costa, G. Benincasa, R. Lucchese [et al.]. – Text: visual // R Scand Cardiovasc J. – 2019. – Vol. 53, N 1. – P.1-8.
98. Effects of endothelium, stent design and deployment on the nitric oxide transport in stented artery: a potential role in stent restenosis and thrombosis / X. Liu, M. Wang, N. Zhang [et al.]. – Text: visual // Med. Biol. Eng. Comput. – 2015. – Vol. 53, N 5. – P.427–439.
99. Endothelial cell-derived von Willebrand Factor is the major determinant that mediates von Willebrand factor-dependent acute ischemic stroke by promoting postischemic thrombo-inflammation / N. Dhanesha, P. Prakash, P. Doddapattar [et al.]. – Text: visual // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2016. – Vol. 36, N 9. – P.1829–1837.

100. Endothelial cell-derived von Willebrand factor, but not platelet-derived, promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice / P. Doddapattar, N. Dhanesha, M.R. Chorawala [et al.]. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2018. – Vol. 38, N 3. – P.520–528.
101. Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel / S.C. Tai, G.B. Robb, P.A. Marsden [et al.]. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2004. – Vol. 24, N 3. – P. 405–412.
102. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry / J. Aoki, P.W. Serruys, H. van Beusekom [et al.]. – Text: visual // *J Am Coll Cardiol.* – 2005. – Vol. 45, N 10. – P.1574–1579.
103. Endothelial progenitor cells and their potential clinical applications in peripheral arterial disease / N. Alobaid, M.E. Alnaeb, K.M. Sales [et al.]. – Text: visual // *Endothelium.* – 2005. – Vol. 12, N 5– 6. – P.243–250.
104. Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research / D. Bouïs, G.A. Hospers, C. Meijer [et al.]. – Text: visual // *Angiogenesis.* – 2001. – Vol. 4, N 2. – P.91-102.
105. Enhancement of Nitric Oxide Production Is Responsible for Minimal Intimal Hyperplasia of Autogenous Rabbit Arterial Grafts / K. Tabata, K. Komori, R. Otsuka [et al.]. – Text: visual // *Biology and Vascular Medicine.* – 2017. – Vol. 81, N 8. – P. 1222-1230.
106. Enhancement of proinflammatory and procoagulant responses to silica particles by monocyte-endothelial cell interactions / X. Liu, Y. Xue, T. Ding [et al.]. – Text: visual // *Part Fibre Toxicol.* – 2012. – N 9. – P.36.
107. Esmon, C.T. Coagulation and inflammation / C.T. Esmon. – Text: visual // *J Endotoxin Res.* – 2003. – Vol. 9, N 3. – P.192–198.
108. Esmon, CT. Structure and functions of the endothelial cell protein C receptor / C.T. Esmon. – Text: visual // *Crit Care Med.* – 2004. – Vol. 32, N 5. – P.S298-301.

109. Established neointimal hyperplasia in vein grafts expands via TGF- $\beta$  mediated progressive fibrosis / Z. Jiang, M. Tao, K.A. Omalley [et al.]. – Text: visual // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2009. – Vol. 297, N 4. – P.200–207.
110. Evaluation of promoting effect of a novel Cu-bearing metal stent on endothelialization process from in vitro and in vivo studies / S. Jin, X. Qi, B. Zhang [et al.]. – Text: visual // *Sci Rep*. – 2017. – Vol. 7, N 1. – P. 17394.
111. Everett, L.A. Murine coagulation factor VIII is synthesized in endothelial cells / L.A. Everett, A.C. Cleuren, R.N. Khoriaty. – Text: visual // *Blood*. – 2014. – Vol. 123, N 24. – P. 3697-705.
112. Extrahepatic sources of factor VIII potentially contribute to the coagulation cascade correcting the bleeding phenotype of mice with hemophilia A / D.Zanolini, S.Merlin, M.Feola [et al.]. – Text: visual // *Haematologica*. – 2015. – Vol. 100, N 7. – P. 881-892.
113. Ezetimibe inhibits platelet activation and uPAR expression on endothelial cells / T. Becher, T.J. Schulze, M. Schmitt [et al.]. – Text: visual // *Int J Cardiol*. – 2017. – Vol. 227. – P.858-862.
114. Factor XI antisense oligonucleotide for prevention of venous thrombosis / H.R. Büller, C. Bethune, S. Bhanot [et al.]. – Text: visual // *N Engl J Med*. – 2015. – Vol. 372, N 3. – P.232-40.
115. Fay, W.P. No sweetie pie: newly uncovered role for PAI (plasminogen activator inhibitor)-1 in inflammatory responses to ischemia/reperfusion / W.P. Fay, R.J. Korthuis. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2018. – Vol 38, N 4. – P.695–697.
116. Fay, W.P. Plasminogen activator inhibitor 1, fibrin, and the vascular response to injury / W.P. Fay. – Text: visual // *Trends Cardiovasc Med*. – 2004. – Vol. 14, N 5. – P. 196–202.
117. Federici, A.B. The factor VIII/von Willebrand factor complex: basic and clinical issues / A.B. Federici. – Text: visual // *Haematologica*. – 2003. – Vol. 88, N 6. – P.EREP02.

118. Flevaris, P. The Role of Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 in Fibrosis / P. Flevaris, D. Vaughan. – Text: visual // *Semin Thromb Hemost.* – 2017. – Vol. 43, N 2. – P.169-177.
119. Fluoropolymer-coated Dacron versus PTFE grafts for femorofemoral crossover bypass: randomised trial / J.P. Eiberg, O. Røder, M. Stahl-Madsen [et al.]. – Text: visual // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* – 2006. – Vol. 32, N 4. – P.431.
120. Freedman, J.E. Nitric oxide and its relationship to thrombotic disorders / J.E. Freedman, J. Loscalzo. – Text: visual // *J Thromb Haemost.* – 2003. – Vol. 1, N 6. – P. 1183–8.
121. Fukudome, K. Molecular cloning and expression of murine and bovine endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR) / K. Fukudome, C. Esmon. – Text: visual // *J Biol Chem.* – 1995. – Vol. 270, N 10. – P.5571–5577.
122. Functional stability of plasminogen activator inhibitor-1 / S.Y. Yildiz, P. Kuru, E.T. Oner [et al.]. – Text: visual // *The Scientific World Journal.* – 2014. – P. 858293.
123. Functionally active protein C inhibitor/plasminogen activator inhibitor-3 (PCI/PAI-3) is secreted in seminal vesicles, occurs at high concentrations in human seminal plasma and complexes with prostate-specific antigen / F. Espana, J. Gilabert, A. Estelles [et al.]. – Text: visual // *A Thromb Res.* – 1991. – Vol. 64, N 3. – P. 309–320.
124. Gao, Y. Endothelium-Derived Factors. *Biology of Vascular Smooth Muscle: Vasoconstriction and Dilatation* / Y. Gao. – Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2017. – 286p. – Text: visual.
125. Genomic approach to identify factors that drive the formation of three-dimensional structures by EA.hy926e endothelial cells / X. Ma, M. Wehland, H. Schulz [et al.]. – Text: visual // *PLOS One.* – 2013. – Vol. 8, N 5. – P.e64402.
126. Geraghty, A.J. Antithrombotic agents for preventing thrombosis after infrainguinal arterial bypass surgery / A.J. Geraghty, K. Welch. – Text: visual // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2011. – N 6. – P. CD000536.
127. Gerthoffer, W.T. Secretory functions of smooth muscle: cytokines and growth factors / W.T. Gerthoffer, C.A. Singer. – Text: visual // *Mol Interv.* – 2002. – Vol. 2, N 7. – P. 447–456.

128. Godo, S. Endothelial functions / S. Godo, H. Shimokawa. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2017. – Vol. 37, N 9. – P.e108–e114.
129. Gorbet, M.B. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes / M.B. Gorbet, M.V. Sefton. – Text: visual // *Biomaterials.* – 2004. – Vol. 25, N 26. – P.5681.
130. Greisler, H.P. New biologic and synthetic vascular prostheses / H.P. Greisler. – Austin, Tex, RG Landes, 1991. – 86p. – Text: visual.
131. Gross, P.L. The endothelium and thrombosis / P.L. Gross, W.C. Aird. – Text: visual // *Semin Thromb Hemost.* – 2000. – Vol. 26, N 5. – P.463–478.
132. Hansen, J.K. Interaction of blood cells with the vessel wall in thrombosis / J. K. Hansen. – Text: visual // MS (Master of Science) thesis / University of Iowa. – Iowa, 2014. – 61p.
133. Havelka, G.E. The vascular adventitia: its role in the arterial injury response / G.E. Havelka, M.R. Kibbe. – Text: visual // *Vasc Endovascular Surg.* – 2011. – Vol. 45, N 5. – P. 381–390.
134. Hazama, K. Relationship between fibril length and tissue ingrowth in the healing of expanded polytetrafluoroethylene grafts / K. Hazama, H. Miura, T. Shimada. – Text: visual // *Surg Today.* – 2004. – Vol. 34, N 8. – P. 685.
135. Hemocompatibility of Various Heart Valve Materials. In: Society for Biomaterials. Annual Meeting and Exposition. Pioneering the Future of Biomaterials / O. Emch, J. Cavicchia, P. Dasi [et al.]. – Text : electronic // *Transactions of the 38th Annual Meeting.* – 2014. – Vol. XXXVI. – Art. 28. – URL: <http://abstracts.biomaterials.org/data/papers/2014/0332-000967.pdf>.
136. Hemodynamically driven vein graft remodeling: a systems biology approach / S.A. Berceci, R. Tran-Son-Tay, M.V. Garbey [et al.]. – Text: visual // *Vascular.* – 2009. – Vol. 17 (Suppl. 1). – P.S2–S9.
137. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis / J.C. Meijers, W.L. Tekelenburg, B.N. Bouma [et al.]. – Text: visual // *N Engl J Med.* – 2000. – Vol. 342, N 10. – P.696-701.

138. High plasma heparin cofactor II activity protects from restenosis after femoropopliteal stenting / M. Schillinger, M. Exner, S. Sabeti [et al.]. – Text: visual // *Thromb Haemost.* – 2004. – Vol. 92, N 5. – P.1108-13.
139. High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism / P.A. Kyrle, E. Minar, M. Hirschl [et al.]. – Text: visual // *N Engl J Med.* – 2000. – Vol. 343. – P. 457–462.
140. Histones stimulate von Willebrand factor release in vitro and in vivo / F.W. Lam, M.A. Cruz, K. Parikh [et al.]. – Text: visual // *Haematologica.* – 2016. – Vol. 101, N 7. – P.e277-9.
141. Hoffman, M. A cell-based model of hemostasis / M. Hoffman, D.M. Monroe – Text: visual // *Thromb Haemost.* – 2001. – Vol. 85, N 6. – P. 958-965.
142. Holland, I. Towards non-invasive characterisation of coronary stent re-endothelialisation – An in-vitro, electrical impedance study / I. Holland, C. McCormick, P. Connolly. – Text: visual // *PLoS ONE.* – 2018. – Vol. 13, N 11. – P.e0206758.
143. Homozygous deficiency of heparin cofactor II: relevance of p17 glutamate residue in serpins, relationship with conformational diseases, and role in thrombosis / J. Corral, J. Aznar, R. Gonzalez-Conejero [et al.]. – Text: visual // *Circulation.* – 2004. – Vol. 110, N 10. – P.1303–1307.
144. Huber, K. Plasminogen activator inhibitor type-1 (part two): role for failure of thrombolytic therapy. PAI-1 resistance as a potential benefit for new fibrinolytic agents / K. Huber. – Text: visual // *J Thromb Thrombolysis.* – 2001. – Vol. 11, N 3. – P.195–202.
145. Human recombinant activated protein C-coated stent for the prevention of restenosis in porcine coronary arteries / D. Lukovic, N. Nyolczas, R. Hemetsberger [et al.]. – Text: visual // *J Mater Sci Mater Med.* – 2015. – Vol. 26, N 10. – P.241.
146. Human vascular smooth muscle cells express functionally active endothelial cell protein C receptor / E. Bretschneider, B. Uzonyi, A.A. Weber [et al.]. – Text: visual // *AA Circ Res.* – 2007. – Vol. 100, N 2. –P.255–262.
147. Identification of the protein C/activated protein C binding sites on the endothelial cell protein C receptor. Implications for a novel mode of ligand recognition

- by a major histocompatibility complex class 1-type receptor / P.C. Liaw, T. Mather, N. Oganesyanyan [et al.]. – Text: visual // *J Biol Chem.* – 2001. – Vol. 276, N 11. – P. 8364-70.
148. Impact of capacity-limited binding on recombinant factor VIII and von Willebrand factor pharmacokinetics in hemophilia A rats / I. Vargas Christensen, M. Loftager, F. Rode [et al.]. – Text: visual // *J Thromb Haemost.* – 2019. – Vol. 17, N 6. – P. 964-974.
149. In vitro study of thrombin on tubule formation and regulators of angiogenesis / B. Wang, T. Pearson, G. Manning [et al.]. – Text: visual // *Clin Appl Thromb Hemost.* – 2010. – Vol. 16, N 6. – P. 674-8.
150. In vivo and in vitro analyses of the effects of a novel high-nitrogen low-nickel coronary stent on reducing in-stent restenosis / J. Wang, C. Song, Y. Xiao [et al.]. – Text: visual // *J Biomater Appl.* – 2018. – Vol. 33, N 1. – P. 64-71.
151. In vivo cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts / J.I. Rotmans, J.M. Heyligers, H.J. Verhagen [et al.]. – Text: visual // *Circulation.* – 2005. – Vol. 112, N 1. – P. 12.
152. Inducible nitric oxide synthase provides protection against injury-induced thrombosis in female mice / R.K. Upmacis, H. Shen, L.E. Benguigui [et al.]. – Text: visual // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2011. – Vol. 301, N 2. – P. H617–H624.
153. Inhibition of thrombin with PPACK-nanoparticles restores disrupted endothelial barriers and attenuates thrombotic risk in experimental atherosclerosis / R.U. Palekar, A.P. Jallouk, J.W. Myerson [et al.]. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2016. – Vol. 36, N 3. – P. 446–455.
154. Intrinsic structural failure of polyester (Dacron) vascular grafts: a general review / H. Van Damme, M. Deprez, E. Creemers [et al.]. – Text: visual // *Acta Chir Belg.* – 2005. – Vol. 105, N 3. – P. 2005.
155. Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? / G. Deng, S.A. Curriden, S.J. Wang [et al.]. – Text: visual // *J Cell Biol.* – 1996. – Vol. 134, N 6. – P.1563–1571.

156. Ivetic, A. L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling / A. Ivetic, H.L. Hoskins Green, S.J. Hart. – Text: visual // *Front Immunol.* – 2019. – N 10. – P.1068.
157. Kim, W. Treatment of Femoropopliteal Artery In-stent Restenosis / W. Kim W, D. Choi // *Korean Circ J.* – 2018. – Vol. 48, N 3. – P.191-197.
158. Kohler, H.P. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease / H.P. Kohler, P.J.N. Grant. – Text: visual // *N Engl J Med.* – 2000. – Vol. 342, N 24. – P. 1792–1801.
159. Ku, S.K. Concentration dependent anti-inflammatory effects thrombin on polyphosphate-mediated inflammatory responses in vitro and in vivo / S.K. Ku, J.S. Bae. – Text: visual // *Inflamm Res.* – 2013. – Vol. 62, N 6. - P. 609-16.
160. Lemson, M.S. Intimal hyperplasia in vascular grafts / M.S. Lemson, J.H. Tordoir, M.J. Daemen. – Text: visual // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* – 2000. – Vol. 19, N 4. – P.336–350.
161. Löf, A. A biophysical view on von Willebrand factor activation / A. Löf, J.P. Müller, M.A. Brehm. – Text: visual // *J Cell Physiol.* – 2018. – Vol. 233, N 2. – P.799–810.
162. Lopes da Silva, M. von Willebrand factor multimerization and the polarity of secretory pathways in endothelial cells / M. Lopes da Silva, D.F. Cutler. – Text: visual // *Blood.* – 2016. – Vol. 128, N 2. – P.277–285.
163. Loss of endothelial CXCR7 impairs vascular homeostasis and cardiac remodeling after myocardial infarction: implications for cardiovascular drug discovery / H. Hao, S. Hu, H. Chen [et al.]. – Text: visual // *Circulation.* – 2017. – Vol. 135, N 13. – P.1253–1264.
164. Macfarlane, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier / R.G. Macfarlane. – Text: visual // *Nature.* – 1964. – Vol. 202. – P.498-9.
165. Mackman, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis / N. Mackman // *Nature.* – 2008. – Vol. 451, N 7181. – P. 914–918.

166. Manganese-based Nanozymes: Multienzyme Redox Activity and Effect on the Nitric Oxide Produced by Endothelial Nitric Oxide Synthase / N. Singh, G. Motika, S.M. Eswarappa [et al.]. – Text: visual // Chemistry. – 2018. – Vol. 24, N 33. – P. 8393-8403.
167. Manufacturing and processing of NiTi implants: a review / M.H. Elahinia, M. Hashemi, M. Tabesh [et al.]. – Text: visual / Prog. Mater. Sci. – 2012. – Vol. 57, N 5. – P. 911-946.
168. Marlies, V.D.W. Thrombomodulin-Protein C-EPCR System. Integrated to Regulate Coagulation and Inflammation / V.D.W. Marlies, D. Collen, E.M. Conway. – Text: visual // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2004. – Vol. 24, N 8. – P.1374–1383.
169. Mattsson, E.J. Increased blood flow induces regression of intimal hyperplasia / E.J. Mattsson, T.R. Kohler, S.M. Vergel. – Text: visual // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 1997. – Vol. 17, N 10. – P.2245–2249.
170. McFadyen, J.D. Current and future antiplatelet therapies: emphasis on preserving haemostasis / J.D. McFadyen, M. Schaff, K. Peter. – Text: visual // Nat Rev Cardiol. – 2018. – Vol. 15, N 3. – P. 181–191.
171. Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function / P.C. Liaw, P.F. Neuenschwander, M.D. Smirnov [et al.]. – Text: visual // J Biol Chem. – 2000. – Vol. 275, N 8. – P. 5447–5452.
172. Michiels, C. Endothelial cell functions / C. Michiels. – Text: visual // J Cell Physiol. – 2003. – Vol. 196, N 3. – P. 430–443.
173. Microarray analysis of primary endothelial cells challenged with different inflammatory and immune cytokines / T.R. Sana, M.J. Janatpour, M. Sathe [et al.]. – Text: visual // Cytokine. – 2005. – Vol. 29, N 6. – P. 256–269.
174. Modifiable patient factors are associated with reverse vein graft occlusion in the era of duplex scan surveillance / M.E. Giswold, G.J. Landry, G.J. Sexton [et al.]. – Text: visual // J Vasc Surg. – 2003. – Vol. 37, N 1. – P.47–53.

175. Modulators of the coagulation cascade: focus and recent advances in inhibitors of tissue factor, factor VIIa and their complex / R. Frédérick, L. Pochet, C. Charlier [et al.]. – Text: visual // *Curr Med Chem.* – 2005. – Vol. 12, N 4. – P.397-417.
176. Moriguchi, T. PECAM-1 phosphorylation and tissue factor expression in HUVECs exposed to uniform and disturbed pulsatile flow and chemical stimuli / T. Moriguchi, B.E. Sumpio. – Text: visual // *J Vasc Surg.* – 2015. – Vol. 61, N 2. – P.481-8.
177. Morrell, C.N. Platelets an inflammatory force in transplantation / C.N. Morrell, H. Sun, A.M. Swaim. – Text: visual // *Am J Transplant.* – 2007. – Vol. 7, N 11. – P. 2447.
178. Mortality rates and mortality predictors in patients with symptomatic peripheral artery disease stratified according to age and diabetes / T. Mueller, F. Hinterreiter, C. Luft [et al.]. – Text: visual // *J Vasc Surg.* – 2014. – Vol. 59, N 5. – P. 1291-9.
179. Mosnier, L.O. The cytoprotective protein C pathway / L.O. Mosnier, B.V. Zlokovic, J.H. Griffin. – Text: visual // *Blood.* – 2007. – Vol. 109, N 8. – P. 3161–3172.
180. Neutrophil and platelet activation at ballooninjured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty / F.J. Neumann, I. Ott, M. Gawaz [et al.]. – Text: visual // *J Am Coll Cardiol.* – 1996. – Vol. 27, N 4. – P.819–824.
181. New predictors of in-stent restenosis in patients with diabetes mellitus undergoing percutaneous coronary intervention with drug-eluting stent / J.L. Wang, Z. Qin, Z.L. Wang [et al.]. – Text: visual // *J Geriatr Cardiol.* – 2018. – Vol. 15, N 2. – P. 137-145.
182. Nitric Oxide Deficit Drives Intimal Hyperplasia in Mouse Models of Hypertension / F. Allagnat, J.A. Haefliger, M. Lambelet [et al.]. – Text: visual // *Vasc Endovasc Surg.* – 2016. – Vol. 51, N 5. – P. 733-42.
183. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions / J.C. de Graaf, J.D. Banga, S. Moncada [et al.]. – Text: visual // *Circulation.* – 1992. – Vol. 85, N 6. – P.2284–90.

184. Nordling, S. A novel in vitro model for studying the interactions between human whole blood and endothelium / S. Nordling, B. Nilsson, P.U, Magnusson. – Text: visual // *J Vis Exp.* – 2014. – Vol. 93. – P.e52112.
185. Nox4 regulates the eNOS uncoupling process in aging endothelial cells / H.Y. Lee, H.M.A. Zeeshan, H.R. Kim [et al.]. – Text: visual // *Free Radic Biol Med.* – 2017. – Vol. 113. – P. 26-35.
186. Oganessian, V. The crystal structure of the endothelial protein C receptor and a bound phospholipid / V. Oganessian, N. Oganessian, S.J. Terzyan. – Text: visual // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277, N 28. – P. 24851–24854.
187. Ouweneel, A.B. Silencing of anticoagulant protein C evokes low-incident but spontaneous atherothrombosis in apolipoprotein E-deficient mice-brief report / A.B. Ouweneel, M. Heestermans, R.A.F. Verwilligen. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2017. – Vol. 37, N 5. – P. 782–785.
188. Pacher, P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet. – Text: visual // *Physiological Reviews.* – 2007. – Vol. 87, N 1. – P. 315-424.
189. Paszkowiak, J.J. Arterial wall shear stress: observations from the bench to the bedside / J.J. Paszkowiak, A. Dardik. – Text: visual // *Vasc Endovascular Surg.* – 2003. – Vol. 37, N 1. – P.47–57.
190. Performance of plasminogen activator inhibitor-1 as a biomarker in patients undergoing coronary angiography: Analytical and biological considerations / R.G. Jung, T. Simard, P. Di Santo [et al.]. – Text: visual // *Diab Vasc Dis Res.* – 2019. – Vol. 16, N 5. – P.478-482.
191. Peripheral Arterial Disease in Women: an Overview of Risk Factor Profile, Clinical Features, and Outcomes / Q.U. Jelani, M. Petrov, S.C. Martinez [et al.]. – Text: visual // *Curr Atheroscler Rep.* – 2018. – Vol. 20, N 8. – P.40.
192. Peripheral Stent Thrombosis Leading to Acute Limb Ischemia and Major Amputation: Incidence and Risk Factors in the Aortoiliac and Femoropopliteal Arteries / K. Katsanos, S.A. Al-Lamki, A. Parthipun [et al.]. – Text: visual // *Cardiovasc Intervent Radiol.* – 2017. – Vol. 40, N 3. – P.351–359.

193. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension / E. Arciniegas, M.G. Frid, I.S. Douglas [et al.]. – Text: visual // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 2007. – Vol. 293, N 1. – P.L1–L8.
194. Pharmacological Targeting of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Decreases Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Neointima Formation / Y.Ji, Z.Weng, P. Fish [et al.]. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2016. – Vol. 36, N 11. – P. 2167-2175.
195. Phosphatidylinositol-3-kinase-gamma is integral to homing functions of progenitor cells / E. Chavakis, G. Carmona, C. Urbich [et al.]. – Text: visual // *Circ Res*. – 2008. – Vol. 102, N 8. – P.942.
196. Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in plasma and platelets / N.A. Booth, A.J. Simpson, A. Croll [et al.]. – Text: visual // *A Br J Haematol*. – 1988. – Vol. 70, N 3. – P.327–333.
197. Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 as a Regulator of Fibrosis / R. Rabieian, M. Boshtam, M. Zareei [et al.]. – Text: visual // *J Cell Biochem*. – 2018. – Vol. 119, N 1. – P.17-27.
198. Plasminogen activator inhibitor-1 and thrombotic cerebrovascular diseases / A. Tjärnlund-Wolf, H. Brogren, E.H. Lo [et al.]. – Text: visual // *Stroke*. – 2012. – Vol. 43, N 10. – P. 2833-2839.
199. Plasminogen activator inhibitor-1 controls vascular integrity by regulating VE-cadherin trafficking / A.E. Daniel, I. Timmerman, I. Kovacevic [et al.]. – Text: visual // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 12, N 12. – P.e0145684.
200. Plasminogen activator inhibitor-1 is a marker and a mediator of senescence / D.E. Vaughan, R. Rai, S.S. Khan [et al.]. – Text: visual // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. – 2017. – Vol. 37, N 8. – P. 1446-1452.
201. Plasminogen activator inhibitor-1 levels and activity decrease after intervention in patients with critical limb ischaemia / M.Bjorck, M. Lepkowska Erikson, A.Bylock [et al.]. – Text: visual // *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. – 2013. – Vol. 46, N 2. –P. 214-222.

202. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes neutrophil infiltration and tissue injury on ischemia-reperfusion / M. Praetner, G. Zuchtriegel, M. Holzer [et al.]. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2018. – Vol. 38, N 4. – P. 829–842.
203. Plasminogen activator inhibitor-1: a risk factor for deep vein thrombosis after total hip arthroplasty / J. Tang, W. Zhu, X. J. Mei [et al.]. – Text: visual // *Orthop Surg Res.* – 2018. – Vol. 13, N 1. – P. 8.
204. Platelet control of fibrin distribution and microelasticity in thrombus formation under flow / F. Swieringa, C.C. Baaten, R. Verdood [et al.]. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2016. – Vol. 36, N 4. – P. 692–699.
205. Platelet deposition on vascular grafts. The accuracy of in vivo quantitation and the significance of in vivo platelet reactivity / B.T. Allen, C.J. Mathias, G.A. Sicard [et al.]. – Text: visual // *Ann Surg.* – 1986. – Vol. 203, N 3. – P. 318.
206. Platelet functions beyond hemostasis / S.S. Smyth, R.P. McEver, A.S. Weyrich [et al.]. – Text: visual // *J Thromb Haemost.* – 2009. – Vol. 7, N 11. – P. 1759–66.
207. Platelet P2Y(12) receptor influences the vessel wall response to arterial injury and thrombosis / D.J. Evans, L.E. Jackman, J. Chamberlain [et al.]. – Text: visual // *Circulation.* – 2009. – Vol. 119, N 1. – P.116–22.
208. Platelet response to clopidogrel and restenosis in patients treated predominantly with drug-eluting stents / S. Schulz, D. Sibbing, S. Braun [et al.]. – Text: visual // *Am Heart J.* – 2010. – Vol. 160, N 2. – P. 355–61.
209. Platelets drive thrombus propagation in a hematocrit and glycoprotein VI-dependent manner in an in vitro venous thrombosis model / M. Lehmann, R.M. Schoeman, P.J. Krohl [et al.]. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2018. – Vol. 38, N 5. – P.1052–1062.
210. Platelet-to-lymphocyte and Neutrophil-to-lymphocyte Ratios Predict Target Vessel Restenosis after Infrainguinal Angioplasty with Stent Implantation / S. Lee, T. Hoberstorfer, P.P. Wadowski [et al.]. – Text: visual // *J. Clin. Med.* – 2020. – Vol. 9, N 6. – P. 1729.

211. Prediction of restenosis based on hemodynamical markers in revascularized femoro-popliteal arteries during leg flexion / C. Gökgöl, N. Diehm, L. Räber [et al.]. – Text: visual // *Biomech Model Mechanobiol.* – 2019. – Vol. 18, N 6. – P. 1883–1893.
212. Predictive value of P-selectin and endothelin-1 for vascular restenosis after interventional procedures for peripheral artery disease / N. Chen, L. Chen, S. Jiang [et al.]. – Text: visual // *Exp Ther Med.* – 2019. – Vol. 17, N 5. – P.3907-3912.
213. Predictors of early graft failure after infrainguinal bypass surgery: a risk-adjusted analysis from the NSQIP / R.T. Lancaster, M.F. Conrad, V.I. Patel [et al.]. – Text: visual // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* – 2012. – Vol. 43, N 5. – P. 549–555.
214. Predictors of mortality and outcomes after retrograde endovascular angioplasty in patients with peripheral artery disease / P. Kleczynski, Z. Ruzsa, J. Wojtasik-Bakalarz [et al.]. – Text: visual // *Postepy Kardiol Interwencyjnej.* – 2019. – Vol. 15, N 2. –P.234-239.
215. 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 Cardiovasc Disord.* – 2020. – Vol. 20, N 1. – P.72.
216. Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting: results of a multicenter randomized prospective trial. Above-Knee Femoropopliteal Study Group / W.M. Abbott, R.M. Green, T. Matsumoto [et al.]. – Text: visual // *J Vasc Surg.* – 1997. – Vol. 25, N 1. – P. 19-28.
217. Protective cross talk between activated protein C and TNF signaling in vascular endothelial cells: implication of EPCR, noncanonical NF- $\kappa$ B, and ERK1/2 MAP kinases / C. Guillon, A. Cottreau, N. Gérard [et al.]. – Text: visual // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2011. – Vol. 300, N 4. – P. C833–C842.
218. Protective role of mPGES-1 (microsomal prostaglandin E synthase-1)-derived PGE<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>) and the endothelial EP4 (prostaglandin E receptor) in vascular responses to injury / H. Hao, S. Hu, Q. Wan [et al.]. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2018. – Vol. 38, N 5. – P.1115–1124.

219. Protein disulfide isomerase regulation by nitric oxide maintains vascular quiescence and controls thrombus formation / R.H. Bekendam, D. Iyu, F. Passam [et al.]. – Text: visual // J Thromb Haemost. – 2018. – Vol. 16, N 11. – P.2322-2335.
220. Qu, D. Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17 / D. Qu, Y. Wang, N.L. Esmon. – Text: visual // J Thromb Haemost. – 2007. – Vol. 5, N 2. – P.395-402.
221. Randomized comparison of everolimus-eluting versus bare-metal stents in patients with critical limb ischemia and infrapopliteal arterial occlusive disease / M. Bosiers, D. Scheinert, P. Peeters [et al.]. – Text: visual // J Vasc Surg. – 2012. – Vol. 55, N 2. – P.390-8.
222. Reduced prevalence of arterial thrombosis in von Willebrand disease / Y.V. Sander, J. Eikenboom, M.E. De Wee [et al.]. – Text: visual // J ThrombHaem. – 2013. – Vol. 11, N 5. – P. 845-54.
223. Regulation of endothelial migration and proliferation by ephrin-A1 / E. Wiedemanna, S. Jellinghaus, G. Endea [et al.]. – Text: visual // Cellular Signalling. – 2017. – Vol. 29. – P. 84-95.
224. Reinhardt, C. GAS6: pouring GASoline into the inflammatory inferno of venous thrombosis / C. Reinhardt. – Text: visual // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2017. – Vol. 37, N 7. – P. 1263–1265.
225. Relationship of late arteriovenous fistula stenosis with soluble E-selectin and soluble EPCR in chronic hemodialysis patients with arteriovenous fistula / M.A. Bilgic, H. Yilmaz, A. Bozkurt [et al.]. – Text: visual // Clin Exp Nephrol. – 2015. – Vol. 19, N 1. – P.133-9.
226. Renal endothelial protein C receptor expression and shedding during diabetic nephropathy / L. Lattenist, P. Ochodnický, M. Ahdi [et al.]. – Text: visual // Journal of thrombosis and hemostasis. – 2016. – Vol. 14, N 6. – P. 1171-1182.
227. Restenosis is associated with prothrombotic plasma fibrin clot characteristics in endovascularly treated patients with critical limb ischemia / T. Nowakowski, K.P. Malinowski, R. Nizankowski [et al.]. – Text: visual // J Thromb Thrombolysis. – 2019. – Vol. 47, N 4. – P. 540.

228. Results of PREVENT III: a multicenter, randomized trial of edifoligide for the prevention of vein graft failure in lower extremity bypass surgery / M.S. Conte, D.F. Bandyk, A.W. Clowes [et al.]. – Text: visual // *J Vasc Surg.* – 2006. – Vol. 43, N 4. – P.742-751.
229. Risk of Death Following Application of Paclitaxel-Coated Balloons and Stents in the Femoropopliteal Artery of the Leg: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials / K. Katsanos, S. Spiliopoulos, P. Kitrou [et al.]. – Text: visual // *J Am Heart Assoc.* – 2018. – Vol. 24, N 7. – P.e011245.
230. Rodriguez, L.G. Wound-healing assay / L.G. Rodriguez, X. Wu, J.L. Guan. – Text: visual // *Methods Mol Biol.* – 2005. – Vol. 294. – P. 23-9.
231. Sata, M. Origin of neointimal cells in autologous vein graft / M. Sata, R. Nagai. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2004. – Vol. 24, N 7. – P. 1147–1149.
232. Selective deletion of leptin signaling in endothelial cells enhances neointima formation and phenocopies the vascular effects of diet-induced obesity in mice / A. Hubert, M.L. Bochenek, E. Schütz [et al.]. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2017. – Vol. 37, N 9. – P. 1683–1697.
233. Selective factor VIII activation by the tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex / Y. Kamikubo, G.L. Mendolicchio, A. Zampolli [et al.]. – Text: visual // *Blood.* – 2017. – Vol. 130, N 14. – P. 1661-1670.
234. Stasis promotes erythrocyte adhesion to von Willebrand factor / M.W.J. Smeets, M.J. Mourik, H.W.M. Niessen [et al.]. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2017. – Vol. 37, N 9. – P.1618–1627.
235. Stefansson, S. L. The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin  $\alpha V\beta 3$  binding to vitronectin / S.L. Stefansson, D.A. Lawrence. – Text: visual // *Nature.* – 1996. – Vol. 383, N 6599. – P. 441–443.
236. Taubman, M.B. The role of smooth muscle derived tissue factor in mediating thrombosis and arterial injury / M.B. Taubman, L.Wang, C. Miller. – Text: visual // *Thromb Res.* – 2008. – N 1. – P.S78–S81.

237. The Role of von Willebrand Factor in Vascular Inflammation: From Pathogenesis to Targeted Therapy / F. Gragnano, S. Sperlongano, E. Golia [et al.]. – Text: visual // *Mediators Inflamm.* – 2017. – P.5620314.
238. Thrombotic Regulation From the Endothelial Cell Perspectives / W. Miao, H. Huifeng, J.L. Nicholas [et al.]. – Text: visual // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* – 2018. – Vol. 38, N 6. – P. e90–e95.
239. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 release from white blood cells induced by different graft materials in vitro are affected by pentoxifylline and iloprost / P. Swartbol, L. Truedsson, H. Pärsson [et al.]. – Text: visual // *J Biomed Mater Res.* – 1997. – Vol. 36, N 3. – P.400.
240. Tumor necrosis factor-alpha and the early vein graft / Z. Jiang, A. Shukla, B.L. Miller [et al.]. – Text: visual // *J Vasc Surg.* – 2007. – Vol. 45, N 1. – P.169–176.
241. Tunde, M. Effects of Serpinc1, Proc, Pros1 and Epcr Polymorphisms on the Plasma Levels of Natural Anticoagulants in Healthy Individuals and on the Risk of Venous Thromboembolism and Myocardial Infarction / M. Tunde, B. Gábor, B. László. – Text: visual // *Abstracts of the 25th Biennial International Congress on Thrombosis. Proceedings.* – 2018. – N 2. – P. 78.
242. Vallance, P. Vascular endothelium in human physiology and pathophysiology / P. Vallance. – Amsterdam, Netherlands: Harwood Academic Publishers, 2000. – 302p. – Text: visual.
243. Van de Wouwer, M. Thrombomodulin-protein C-EPCR system. Integrated to regulate coagulation and inflammation / M. Van de Wouwer, D. Collen, E.M. Conway. – Text: visual // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – Vol. 24, N 8. – P. 1374-1383.
244. Vaughan, D.E. PAI-1 and atherothrombosis / D.E. Vaughan. – Text: visual // *J Thromb Haemost.* – 2005. – Vol. 8, N 3. – P. 1879–1883.
245. Vein graft failure / C.D. Owens, W.J. Gasper, A.S. Rahman [et al.]. – Text: visual // *J Vasc Surg.* – 2015. – Vol. 61. – P.203e16.

246. Verhenne, S. Platelet-derived VWF is not essential for normal thrombosis and hemostasis but fosters ischemic stroke injury in mice / S. Verhenne, F. Denorme, S. Libbrecht. – Text: visual // *Blood*. – 2015. – Vol. 126, N 14. – P. 1715–1722.
247. Vértes, M. Long Aortic Part of the Stents as a New Predictor for In-stent Restenosis After Kissing Stenting of the Aortoiliac Arteries / M. Vértes, I.Z. Juhász, D.T. Nguyen. – Text: visual // *EJVES Abstract*. – 2019. – N 6. – P.E323-E324.
248. Vischer, U.M. von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease / U.M. Vischer. – Text: visual // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2006. – Vol. 6, N 4. – P. 1186-1193.
249. VLDL Induced Modulation of Nitric Oxide Signalling and Cell Redox Homeostasis in HUVEC / M.C. Magnifico, R.E. Oberkersch, A. Mollo [et al.]. – Text: visual // *Oxid Med Cell Longev*. – 2017. – P.2697364.
250. Von Willebrand factor activity in normal subjects: sex difference and variability / K.E. Sarji, J.M. Graves, J.A. Colwell [et al.]. – Text: visual // *Thromb Res*. – 1975. – Vol. 7, N 6. – P. 885-95.
251. Walsh, D.B. Management of the thrombosed infrainguinal vein graft / D.B. Walsh. – Text: visual // *Advances in Vascular Surgery* / eds.: A.D. Whittemore [et al.]. – Mosby Year Book, 1998. –181p. – Text: visual.
252. Walter, U. cGMP and cGMP-dependent protein kinase in platelets and blood cells / U. Walter, S. Gambaryan. – Text: visual // *Handb Exp Pharmacol*. – 2009. – N 191. – P. 533–48.
253. Waltz, D.A. Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin / D.A. Waltz, L.R. Natkin, R.M. Fujita. – Text: visual // *J Clin Invest*. – 1997. – Vol. 100, N 1. – P. 58–67.
254. Welty, J.R. Fundamentals of momentum, heat, and mass transfer / J.R. Welty. –5<sup>th</sup> ed. – Hoboken, NJ: Wiley, 2008. – 758p. – Text: visual.
255. Wouwer, M.V.d. Thrombomodulin-Protein C-EPCR System. Integrated to Regulate Coagulation and Inflammation / M.V.d. Wouwer, D. Collen, E.M. Conway. –

Text: visual // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2004. – Vol. 24, N 8. – P. 1374–1383.

256. Yamanaka, Y. Platelet-Derived Microparticles are an Important Biomarker in Patients with Cancer-Associated Thrombosis / Y. Yamanaka, Y. Sawai, S. Nomura. – Text: visual // *Int J Gen Med*. – 2019. – N 12. – P. 491-497.

257. Yau, J.W. Endothelial cell control of thrombosis / J.W. Yau, H. Teoh, S. Verma. – Text: visual // *BMC Cardiovasc Disorb*. – 2015. – N 15. – P. 130.

258. Zamzam, A. Altered coagulation profile in peripheral artery disease patients / A. Zamzam, M.H. Syed, M.L. Rand. – Text: visual // *Vascular*. – 2020. – Vol. 28, N 4. – P. 368-377.

259. Zeng, Y. Role of glypican-1 in endothelial NOS activation under various steady shear stress magnitudes / Y. Zeng, J. Liu. – Text: visual // *Experimental Cell Research*. – 2016. – Vol. 348, N 2. – P. 184-189.

260. Zhang, Y.S. Bioengineered in vitro models of thrombosis: methods and techniques / Y.S. Zhang, R. Oklu, H. Albadawi. – Text: visual // *Cardiovasc Diagn Ther*. – 2017. – Vol. 7, N 3. – P. S329-S335.

261. Zoller, B. A common 4g allele in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene as a risk factor for pulmonary embolism and arterial thrombosis in hereditary protein S deficiency / B. Zöller, D.F. García, B. Dahlbäck. – Text: visual // *Thromb Haemost*. – 1998. – Vol. 79, N 4. – P. 802–807.