

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И. П. Павлова»
Министерство здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России)

На правах рукописи

Климентова Эмма Анатольевна

**КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА МАРКЕРОВ АПОПТОЗА,
ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ И
СПОСОБ ИХ КОРРЕКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ
ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ АРТЕРИЙ**

3.1.15. Сердечно-сосудистая хирургия

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук,
профессор
Калинин Роман Евгеньевич

Рязань - 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1. Современные представления о механизмах развития рестеноза зоны реконструкции и прогрессирования атеросклероза в хирургии магистральных артерий нижних конечностей.....	17
1.2. Система апоптоза, пролиферации клеток и эндотелиальной дисфункции при атеросклеротическом поражении сосудистой стенки.....	22
1.3. Изменения в системах апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия после выполнения различных оперативных вмешательств на сосудистой стенке.....	24
1.4. Основные биомаркеры апоптоза, пролиферации клеток, дисфункции эндотелия и их роль в развитии атеросклеротического поражения и рестеноза зоны реконструкции.....	26
1.5. Возможности медикаментозной коррекции маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей.....	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	56
3.1. Показатели апоптоза, пролиферации клеток непосредственно в сосудистой стенке в области атеросклеротического поражения.....	56
3.1.1. Показатели апоптоза, пролиферации клеток непосредственно в сосудистой стенке в области прогрессирования атеросклеротического поражения.....	59
3.1.2. Показатели апоптоза, пролиферации клеток в сосудистой стенке в области рестеноза после проведения артериальных реконструкций.....	63
3.2. Маркеры системы апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы А.....	66
3.3. Исследование динамики маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы В и их роли в развитии	

отдаленных послеоперационных осложнений.....	70
3.4. Исследование динамики маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы С и их роли в развитии отдаленных послеоперационных осложнений.....	91
3.5. Исследование динамики маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы D и их роли в развитии отдаленных послеоперационных осложнений.....	106
3.5.1. Сравнение показателей апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия в послеоперационном периоде у пациентов оперативных групп В-D.....	120
3.6. Динамика изменения маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы E и их влияние на отдаленные результаты оперативного лечения.....	123
3.7. Динамика изменения маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы F и их влияние на отдаленные результаты оперативного лечения.....	142
3.8. Динамика изменения маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы G и их влияние на отдаленные результаты оперативного лечения.	158
3.9. Алгоритм профилактики развития рестеноза зоны реконструкции и прогрессирования атеросклероза после оперативных вмешательств у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей.....	174
3.10. Клинические примеры.....	177
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	198
ВЫВОДЫ.....	209
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	212
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	214
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	216

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Заболееваемость облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (ОААНК) является одной из основных причин инвалидности и смертности населения среди сосудистых заболеваний, принося существенный ущерб финансовому состоянию здравоохранения во всем мире. В странах с развитым социальным сектором, распространенность ОААНК колеблется в интервале от 5% до 13%, с повышенным риском развития сердечно-сосудистых событий и осложнений [15, 221]. В исследовании COMPASS было показано, что у пациентов с ОААНК риск повторной госпитализации в течение 1 года составил 61,5%; ампутации нижних конечностей – 20,5%; летальности – 8,3% [180].

Наиболее эффективным методом лечения пациентов с ОААНК является реконструктивно-восстановительное вмешательство на магистральных артериях нижних конечностей, приводящее к реваскуляризирующему эффекту и возврату большей части пациентов к полноценной жизни [30, 209, 28].

Однако, возникновение послеоперационных осложнений ставит под сомнение успех проведенных оперативных вмешательств и требует выполнения повторных реконструкций, тем самым увеличивая риск потери конечности [147, 234]. Одними из самых распространенных осложнений у пациентов с ОААНК являются развитие рестеноза зоны вмешательства и прогрессирование атеросклеротического поражения в отдаленном послеоперационном периоде [25, 144]. Основной составляющей рестеноза артериальных реконструкций является развитие гиперплазии неоинтимы (НИ), формирующейся вследствие фиброзно-пролиферативного ответа поврежденной стенки сосуда [229]. Для прогрессирования атеросклероза свойственно сохранение тех же дооперационных факторов риска с добавлением рисков, обусловленных влиянием операционной травмы стенки сосуда [17, 32].

К сожалению, современные исследования, направленные на изучение патогенеза НИ в зоне оперативного вмешательства, пока не могут исчерпывающе

и достоверно описать механизмы, лежащие в основе данного процесса. Ответ артериальной стенки на ее травматизацию проявляется в виде воспалительной реакции, клеточной инфильтрации, пролиферации и ремоделирования внеклеточного матрикса. Однако, в силу некоторых факторов, имеются случаи, когда процесс патогенеза становится неконтролируемым. Такое явление имеет место быть, когда избыточная пролиферация и чрезмерный синтез экстрацеллюлярного матрикса приводит к гемодинамически значимому стенозу зоны реконструкции [8].

В настоящее время выделяют 4 последовательных механизма в патогенезе развития НИ: эндотелиальная дисфункция; адгезия и агрегация тромбоцитов к поврежденной сосудистой стенке и выделение ими митогенных факторов; активация медиаторов воспаления; миграция и пролиферация эндотелиальных (ЭК) и гладкомышечных клеток (ГМК) с последующим синтезом внеклеточного матрикса [239].

Клинически, и рестеноз, и прогрессирование атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде проявляются в виде возникновения рецидивирующих проявлений ишемии в конечностях, что часто вынуждает хирургов к проведению повторных процедур реваскуляризации [144].

Согласно последним исследованиям, важную роль в развитии рестеноза и прогрессирования атеросклероза играет система апоптоза [16, 127]. Апоптоз представляет собой клеточную гибель с характерными морфологическими признаками, которая происходит регулярно для обеспечения гомеостаза как в организме в целом, так и в сосудистой стенке в частности [255]. В нормальном состоянии, клетки сосудистой стенки подвергаются запрограммированной гибели с целью обновления своего клеточного состава [40]. Тоже характерно и для ранней стадии развития атеросклеротического поражения. Однако, на более поздних стадиях заболевания отмечается усиление процесса апоптоза, связанное с недостаточным фагоцитозом гибнущих клеток, дополнительным притоком макрофагов к очагу повреждения, обострением воспаления и активации системы коагуляции [67, 71, 288].

Повреждение артериальной стенки во время операции с последующим ее ремоделированием подразумевает параллельную активацию роста, пролиферацию, миграцию и гибель клеток при их воздействии на функциональное состояние эндотелия и ремоделирования внеклеточного матрикса [49].

В экспериментальных исследованиях на животных было показано, что травма сосудистой стенки индуцирует запуск апоптоза клеток поврежденной артериальной стенки, происходящий в течение нескольких часов после операции. Его последствия вызывают увеличение образования НИ в отдаленном послеоперационном периоде, провоцируя ответную миграцию клеток, направленную на преодоление клеточного дефицита [174, 192, 218; 281]. Существует некий баланс между пролиферацией клеток и их апоптозом. Сдвиги в этом соотношении могут лежать как в основе патогенеза самого атеросклероза, так и его осложнений [110].

Одним из главных митогенов и хемоаттрактантов для клеток сосудистой стенки, который секретируется тромбоцитами, эндотелием, ГМК и макрофагами, является тромбоцитарный фактор роста (PDGF) [132, 168, 237]. Другим представителем пролиферации и миграции клеток эндотелия является васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF) [244, 260, 277]. Одна из его функций непосредственно взаимосвязана с системой апоптоза, а именно с защитой ЭК от гибели за счет повышения выработки эндотелием антиапоптотического маркера Bcl-2 и метаболитов оксида азота (NO). В период атерогенеза, VEGF может усиливать патофизиологический механизм образования и дестабилизации бляшек, увеличивая риск их разрыва за счет его участия в ангиогенезе [85, 194]. Роль VEGF в развитии рестеноза зоны реконструкции в литературе оценивается неоднозначно. Считается, что VEGF ускоряет эндотелизацию зоны вмешательства, тем самым ингибируя образование НИ [253, 279]. Однако, другим исследователям не удалось подтвердить полученные результаты. Так, S. Bhardwaj et al. (2005) предполагают, что VEGF увеличивает

образование НИ за счет стимулирования пролиферации и миграции ГМК через увеличенный синтез металлопротеиназ и других факторов роста [282].

В последнее время многие исследователи акцентируют свое внимание на изучение маркеров дисфункции эндотелия, в частности NO при атеросклеротическом поражении и его осложнениях [84]. К сожалению, на сегодняшний день, его влияние на гибель клеток и их пролиферацию остается до конца не изучено у пациентов с ОААНК [206]. Однако, достоверно известно, что NO может оказывать как про-, так и антиапоптотическое действие [289]. Проявление противоречивых эффектов в отношении регуляции апоптоза обусловлено тем, что действие NO опосредуется различными путями с активацией различных его концентраций [77]. При этом отметим, что он способен уменьшать пролиферацию и миграцию ГМК после травмы стенки сосуда, вызванную воздействием факторов роста [170, 257].

Как при атеросклеротическом поражении, так и при выполнении оперативных вмешательств, происходит развитие оксидативного стресса с последующей гибелью клеток, которая выражается в снижении уровня естественных антиоксидантов и повышении синтеза активных форм кислорода (АФК) [171]. Ишемия нижних конечностей угнетает антиоксидантные свойства внутриклеточных систем, а последующее восстановление кровотока с развитием ишемии-реперфузии конечности после операции повышает образование свободных кислородных радикалов до уровня, превышающего нейтрализующую способность митохондриальной супероксиддисмутазы [235]. Еще раз отметим, что оксидативный стресс, возникающий в результате дисбаланса между производством и деградацией АФК ведет к клеточной дисфункции и запуску системы апоптоза [228, 232].

В свою очередь, применение антиоксидантной терапии может минимизировать потерю клеток сосудистой стенки за счет уменьшения оксидативного стресса и связывания свободных радикалов, а, в ряде случаев, и непосредственного воздействия на маркеры апоптоза [61, 162, 256]. Поэтому, в настоящее время, ведётся всеобъемлющий поиск и исследование лекарственных

средств, способных увеличить антиоксидантную способность клеток сосудистой стенки и защитить их от гибели путем апоптоза.

Одним из самых сильных эндогенных антиоксидантов, известных на сегодняшний день, является витамин Е [80]. Механизм действия данного препарата предполагает: нейтрализацию свободных радикалов; стабилизацию клеточных мембран; повышение уровня супероксиддисмутазы; уменьшение пролиферации и миграции клеток; а также косвенное воздействие на маркеры двух путей апоптоза [188]. В ряде экспериментальных работ было показано, что его применение ведет к изменению соотношения белков Bax/Bcl-2, подавлению активности эффекторных каспаз-3 и -8, а также связыванию Fas с Fas ligandom [286].

Другим антиоксидантным препаратом с дополнительным антигипоксантным действием является «Актовегин»® [46, 275]. Его применение приводит к усилению поглощения клетками глюкозы, улучшая тем самым в них энергетический обмен в условиях ишемии на фоне уменьшения оксидативного стресса [107, 227]. В ряде научных исследований была показана его возможность воздействия на соотношение маркеров семейства Bcl-2, но свой основной антиапоптотический эффект он реализует через регулирование экспрессии транскрипционного фактора NF-κB и увеличение окислительной мощности митохондрий [113]. Кроме того, он препятствует развитию апоптоза, индуцированного бета-амилоидом (Aβ₂₅₋₃₅) через активацию каспазы – 3 [42, 48].

Таким образом, изучение динамики маркеров апоптоза и их соотношения с показателями пролиферации клеток и дисфункцией эндотелия у пациентов с ОААНК, а также определение их роли в прогрессировании атеросклероза и его осложнений, является перспективным направлением в сосудистой хирургии и ангиологии. В свою очередь, исследование эффективности применения комбинированной антиоксидантной терапии будет способствовать поиску новых алгоритмов в лечении пациентов с ОААНК.

Цель исследования

Улучшение результатов оперативного лечения пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей путем создания прогностических моделей неблагоприятных исходов, основанных на оценке маркеров апоптоза, пролиферации клеток, эндотелиальной дисфункции и поиска способа их коррекции.

Задачи исследования

1. Комплексная оценка маркеров апоптоза (Bcl-2, Вах, sFas), пролиферации клеток (PDGF BB и VEGF A165), дисфункции эндотелия (NO) у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей.

2. Исследование зависимости значений маркеров апоптоза, пролиферации и дисфункции эндотелия у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей в сосудистой стенке в области атеросклеротического поражения от их значений в сыворотке крови.

3. Изучение динамики изменений маркеров апоптоза, пролиферации и дисфункции эндотелия у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей после проведения различных видов оперативных вмешательств на артериях нижних конечностей.

4. Рассмотрение маркеров апоптоза, пролиферации клеток, дисфункции эндотелия у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей в различные сроки после оперативных вмешательств как возможных предикторов развития рестеноза зоны реконструкции либо прогрессирования атеросклероза.

5. Разработка прогностических моделей развития рестеноза зоны реконструкции и прогрессирования атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей в зависимости от значений маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия в различные временные периоды.

6. Оценка эффективности применения комбинированной

антиоксидантной терапии в снижении риска развития рестеноза зоны реконструкции и прогрессирования атеросклеротического поражения после различных видов оперативных вмешательств на артериях нижних конечностей путем воздействия на изучаемые маркеры апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия.

Научная новизна исследования

1. Впервые у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей после проведения различных видов оперативных вмешательств изучена динамика маркеров апоптоза (Bcl-2, Вах, sFas), пролиферации клеток (PDGF BB, VEGF A165) и дисфункции эндотелия (NO).

2. Произведена оценка и проанализирована взаимосвязь между изучаемыми показателями непосредственно в артериальной стенке в области атеросклеротического поражения, в зоне рестеноза после проведенных артериальных реконструкций, а также в области с прогрессированием атеросклеротического поражения.

3. Показана количественная взаимосвязь и построена модель с помощью, которой, зная значения маркеров апоптоза в сыворотке крови пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей, можно вычислить их количество непосредственно в артериальной стенке в области атеросклеротического поражения.

4. Впервые маркеры апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия рассмотрены в качестве предикторов развития рестеноза зоны реконструкции и прогрессирования атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде, при этом представлены пороговые значения маркеров при которых возникают данные осложнения.

5. Построены прогностическо-математические модели развития неблагоприятных исходов в отдаленном послеоперационном периоде у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей в зависимости от количества маркеров апоптоза клеток сосудистой стенки.

6. Обоснована эффективность применения комбинированной терапии витамина Е в сочетании с препаратом «Актовегин»® как способа снижения риска развития рестеноза зоны реконструкции и прогрессирования атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде. Схема терапии: сочетание витамина Е в дозе 400 МЕ 1 раз в сутки в течение 1 недели до и после операции совместно с интраоперационным введением препарата «Актовегин»® в дозе 1200 мг 1 раз в день внутривенно капельно в течение 7 дней после операции.

Теоретическая значимость работы

Комплексное изучение динамики биомаркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия как в сыворотке крови, так и непосредственно в сосудистой стенке позволило расширить представления о патогенезе развития атеросклеротического поражения и его послеоперационных осложнений.

Результаты работы позволили выявить новые предикторы развития рестеноза зоны реконструкции и прогрессирования атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде после различных видов оперативных вмешательств на артериях нижних конечностей, что явилось основой для поиска новых алгоритмов оптимальной терапии, направленной на профилактику и снижение количества случаев развития данных осложнений.

Практическая значимость работы

Представлена практическая значимость комплексного изучения маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей, которым планируются различные виды оперативных вмешательств.

Показана целесообразность применения комбинированной терапии в виде сочетания витамина Е с препаратом «Актовегин»® у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей с позиции их антиапоптотического влияния на маркеры апоптоза в первые 7 дней послеоперационного периода с учетом индивидуальных значений исследуемых

маркеров. Предложенный вариант комбинированной терапии позволяет уменьшить толщину неоинтимы в зоне оперативных вмешательств, а также долю пациентов с прогрессирующим атеросклерозом и рестенозом зоны реконструкции в отдаленном послеоперационном периоде.

Методология и методы исследования

Изучение систем апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия проводилось у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей со IIБ-III стадии заболевания по классификации А.В. Покровского - Фонтейна.

Показатели апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелии изучались непосредственно в сосудистой стенке в области атеросклеротического поражения, рестеноза зоны реконструкции и прогрессирующего атеросклероза у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей, а также в сыворотке крови после проведения различных видов реконструктивных оперативных вмешательств.

Для исследования вышеуказанных показателей в сосудистой стенке приготавливался ее гомогенат с помощью лизирующего буфера «Thermo Fisher Scientific» (США) и роторного высокоскоростного гомогенизатора DIAX 900 («Heidolph», Германия) с последующим количественным измерением маркеров апоптоза и пролиферации клеток с помощью иммуноферментного анализа коммерческими наборами.

Пациенты с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей подвергались физикальным, лабораторным и инструментальным методам обследования. В качестве инструментальных методов использовались: ультразвуковая доплерография с измерением лодыжечно-плечевого индекса, дуплексное сканирование артерий нижних конечностей, ангиографическое исследование периферического артериального русла, электрокардиография. Определение количества маркеров апоптоза (Bax, Bcl-2, sFas), пролиферации

клеток (PDGF BB, VEGF A165) в сыворотке крови производилось с помощью иммуноферментного анализа коммерческими наборами.

Содержание маркера дисфункции эндотелия NO изучалось с помощью фотоколориметрического метода иммуноферментным анализатором Stat Fax 3200 («Awareness Technology, Inc.»).

Для обработки полученных результатов применялись приемы и методы статистического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Биомаркеры систем апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия играют ключевую роль в патогенезе облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей, а также в развитии его основных послеоперационных осложнений, таких как рестеноз зоны реконструкции и прогрессирование атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде.

2. Проведение различных видов артериальных реконструкций у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей ведет к активации системы апоптоза в виде двух волн, имеющих противоположное функциональное значение в ремоделировании сосудистой стенки.

3. Усиленная активация проапоптотических маркеров в первую волну апоптоза с реципрокным уменьшением количества NO и VEGF A165 с первых часов до конца второй недели и отсутствием активации второй волны апоптоза ассоциируется с развитием рестеноза зоны реконструкции у пациентов после эндоваскулярных и гибридных вмешательств.

4. Предикторами прогрессирования атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде после выполнения открытых и гибридных вмешательств являются: исходно и на первые часы повышенное количество маркера Вах при сниженном значении sFas; через сутки после операции сниженное количество NO с последующим ростом значений маркера PDGF BB на 7 и 14 сутки; к концу первого месяца повышенные значения PDGF BB на фоне сниженного количества NO.

5. Применение сочетания витамина Е и препарата «Актовегин»® приводит в периоперационном периоде к снижению интенсивности первой волны апоптоза, дисфункции эндотелия и ответной пролиферативной реакции. Клиническая эффективность предложенной терапии выразилась в снижении процента пациентов с рестенозом зоны реконструкции после гибридных и эндоваскулярных вмешательств, а также доли пациентов с прогрессированием атеросклероза после выполнения открытых операций при более отдаленном сроке возникновения данных осложнений.

Внедрение результатов исследования

Основные положения диссертации введены в клиническую практику отделением сосудистой хирургии Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областная клиническая больница», Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи», Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областной клинический кардиологический диспансер», а также в образовательный процесс студентов, ординаторов и аспирантов кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Степень достоверности и апробации результатов

Достоверность результатов обеспечена достаточным объемом проведенного исследования с использованием современных лабораторных (иммуноферментный анализ), инструментальных (ультразвуковое дуплексное сканирование, аортоартериография нижних конечностей) методов исследования и современных методов статистической обработки.

Основные результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на VI Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2020); Ежегодной научной конференции

Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, посвященной 70-летию основания вуза на Рязанской земле (Рязань, 2020); III Всероссийской конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием «Естественнонаучные основы медико-биологических знаний» (Рязань, 2021); XXXVI Международной конференции «Горизонты современной ангиологии, сосудистой хирургии и флебологии», Казань, 2021г.; ESVS 35th Hybrid annual meeting (Rotterdam, 2021); VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2021); VII Съезде хирургов Юга России с международным участием (Пятигорск, 2021); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева», (Рязань, 2022); Всероссийской конференции молодых ученых «Современные тренды в хирургии», (Москва, 2022); Российском форуме по тромбозу и гемостазу совместно с 11-ой конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии, (Москва, 2022); XXV Ежегодной сессии НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева с Всероссийской Конференцией молодых ученых (Москва; 2022); XXXVII Международной конференции «Горизонты современной ангиологии, сосудистой хирургии и флебологии» с расширенной секцией «Реабилитация сосудистых больных после хирургических вмешательств» (Кисловодск; 2022), 30th world congress International Union of Angiology (Brazil, 2022).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 40 научных работ, из них 15 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, 13 из которых – в изданиях, входящих в международную цитатно-аналитическую базу данных Scopus, получено 6 патентов РФ на изобретение, внедрено 1 рационализаторское предложение.

Конфликт интересов

Часть работы выполнена при поддержке исследовательского гранта Президента Российской Федерации (№ МК -1214.2022.3.), 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 и диагностического оборудования не было.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 250 страницах печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и практических рекомендаций, списка используемой литературы. Диссертация иллюстрирована 84 рисунками, 40 таблицами, 6 клиническими примерами. Список литературы содержит 38 источников отечественных и 258 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления о механизмах развития рестеноза зоны реконструкции и прогрессирования атеросклероза в хирургии магистральных артерий нижних конечностей

Облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей (ОААНК) является хроническим, прогрессирующим заболеванием с различной топической локализацией поражения [242, 262]. Одним из самых эффективных методов лечения пациентов с ОААНК является хирургическое вмешательство, после которого пациенты могут вернуться к полноценной жизни. В связи с этим, в мировой медицинской практике наблюдается тенденция появления новых видов реконструктивных вмешательств при развитии техники и технологии их выполнения, что, как следствие, приводит к увеличению количества ежегодно выполняемых операций [57].

На сегодняшний день эндоваскулярная и гибридная хирургия рекомендуются в качестве одних из основных стратегий в реваскуляризации конечностей наравне с «открытой хирургией» [5, 93, 268]. Достигнутый уровень выполнения оперативных вмешательств как открытых, так и эндоваскулярных впечатляет. Средняя проходимость в течение пяти лет для аорто-бедренного шунтирования составляет 87% [44]. При наложении анастомоза выше щели коленного сустава, проходимость в течение трех лет для политетрафторэтиленового (PTFE) протеза – 63,7%, при аутовенозном шунтировании – 77,5% [12]. Проходимость после эндоваскулярных вмешательств на поверхностной бедренной артерии (ПБА) в течение трех лет – 52,9% [21, 258].

Несмотря на успехи оперативных вмешательств, проблема послеоперационных осложнений остается весьма актуальной [248]. Одним из самых распространенных послеоперационных осложнений является развитие рестеноза зоны реконструкции, возникающее вследствие НИ. Развитие НИ ограничивает длительное использование кондуитов при реваскуляризации конечности [25]. Проблемы рестеноза приводят к необходимости повторного

вмешательства, и, следовательно, к увеличению материальных затрат на их выполнение [19, 266]. Процент рестеноза через 2 года после выполнения ЧТБА ПБА и подколенной артерий (ПКА) составляет 68% и 65% для бедренно-подколенной и подколенно-берцовой позиции соответственно [143]. После выполнения бедренно-подколенного шунта (БПШ) с использованием синтетического материала 5-летний показатель развития рестеноза составляет 53% [209].

В ответ на травму, вызванную оперативным вмешательством, клетки сосудистой стенки проходят 3 фазы восстановления [11].

1. Ранняя фаза, включает активацию тромбоцитов и ответную воспалительную реакцию. Поврежденный эндотелий начинает выделять множество биологически активных веществ: цитокинов, факторов, усиливающих адгезию и агрегацию тромбоцитов. Маркерами воспаления, влияющими на риск развития рестеноза являются: C5a и C3a компоненты комплемента; фактор некроза опухолей (ФНО- α); интерлейкины - 1, 3, 6; металлопротеиназы - 2, 9; ингибитор активации плазминогена. Нужно отметить, что к первой сосудистой реакции после выполнения ЧТБА относится и эластическая отдача, проявляющаяся в первые минуты и часы после вмешательства [29].

2. Промежуточная фаза включает образование грануляционной ткани вследствие как пролиферации и миграции ГМК из меди и в интиму, так и при изменении их фенотипа с сократительного на пролиферативный. Ключевую роль в регуляции данных процессов отводят PDGF, который является одним из самых главных митогенов для клеток сосудистой стенки [33].

3. Фаза тканевого ремоделирования заключается в синтезе белков внеклеточного матрикса. Большая часть механизмов, участвующих в процессе формирования НИ, является просто физиологическим ответом артериальной стенки на операционную травму. Так, в норме происходит рост грануляционной ткани на фоне организации и лизиса тромботических масс, процесса эндотелизации зоны оперативного вмешательства, что приводит к появлению монослоя неоинтимы. Однако, данный процесс наблюдается далеко не всегда.

Развитие рестеноза является формой гипертрофического ответа в результате взаимодействия моноцитов, макрофагов, Т-клеток. Недостаточная эндотелизация в зоне пластики сосуда приводит к потере способности клеток сосудистой стенки синтезировать молекулы, ингибирующие рост и миграцию ГМК, воспалительные медиаторы, прокоагулянтные вещества [18].

По данным ряда авторов риск рестеноза возрастает до 50-60% при стентировании протяженных, бифуркационных поражений и сосудов малого диаметра [17]. Независимыми предикторами сужения сосуда при проведении многофакторного анализа являются сахарный диабет, протяженность поражения, малый диаметр артерии, кальцинированная атеросклеротическая бляшка, стентирование артериального сегмента несколькими стентами [33]. Однако, вышеперечисленные предикторы не могут объяснить все случаи возникновения и развития рестеноза.

В результате последних исследований была доказана превалирующая роль системы апоптоза в патогенезе атеросклеротического поражения сосудистой стенки [65, 97, 252].

В 1972 году J.F. Kerr и его коллеги описали новую форму гибели клеток отличную от некроза, которую назвали апоптозом (в переводе с древнегреческого слова «опадение» или «листопад»). Апоптоз представляет собой форму клеточной гибели, которая находится под контролем генетических механизмов и необходима для поддержания тканевого гомеостаза [208]. Апоптотическая гибель клеток характеризуется серией морфологических изменений, начиная от усадки клеточной мембраны до конденсации ядерного хроматина, фрагментации клеток и, наконец, поглощением апоптотических телец фагоцитами и соседними клетками. Основная его функция - поддержание постоянства клеточного состава и уничтожение дефектных клеток без развития воспалительной реакции [195].

В запрограммированном каскаде гибели клетки выделяют четыре основные фазы [165].

В первой - фазе инициации или сигнализации, клетки получают индуцирующие сигналы. Это достигается путем присоединения определенных

молекул (таких как ФНО- α , Fas liganda) к трансмембранным рецепторам (Fas и др.) на поверхности клетки с последующим набором белков домена смерти (например, FADD), необходимых для активации каспазы-8 [27].

Во второй - контрольной или эффекторной фазе происходит активация каспаз с потерей митохондриального мембранного потенциала. Каспазы представляют собой семейство цистеиновых протеаз, которые участвуют в трансдукции и выполнении апоптотической программы. Они находятся в виде неактивных проферментов, которые активируются протеолитическим расщеплением. В центральных переходах на пути апоптоза расположены каспазы 3, 8 и 9 [87].

Третья - фаза выполнения, находится под контролем семейства белков Bcl-2, которые ингибируют высвобождение цитохрома C или фактора, индуцирующего апоптоз из митохондрий. Семейство белков Bcl-2 содержит как ингибиторы (Bcl-2, Bcl-xL и др.), так и индукторы (Bcl-xS, Bax, Bid, Bad, Bak и др.) клеточной гибели [190]. Соотношение между антиапоптотическими и проапоптотическими белками определяет дальнейшую судьбу клетки. После получения соответствующего сигнала Bax или Bak подвергаются конформационным изменениям и перемещаются в митохондриальную мембрану, где они вызывают выделение цитохрома C в цитозоль [34].

Четвертая - фаза деградации геномной ДНК приводит к необратимой потере жизнеспособности клетки. Погибшие клетки удаляются из ткани в результате фагоцитоза с помощью различных механизмов (Рисунок 1) [290].

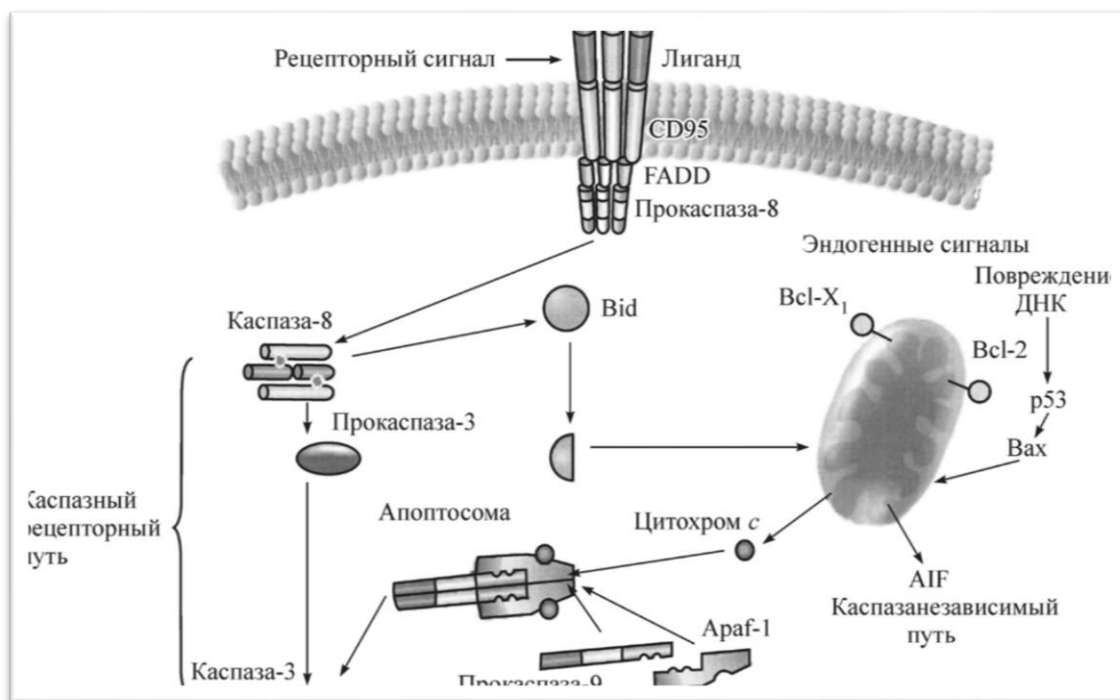


Рисунок 1 - Схема активации системы апоптоза

Нужно отметить, что на активацию маркеров системы апоптоза оказывают влияние гемодинамические характеристики скорости кровотока. Ламинарный кровоток в основном наблюдается на относительно прямолинейных участках сосудов. В зонах извитости или отхождения боковых ветвей профиль кровотока меняется от «притупленного» параболического до асимметричного. При этом зонами повышенного риска являются анастомозы, в которых, как правило, наиболее часто образуются участки НИ. Наиболее значимыми точками формирования турбулентного кровотока являются: участок сосуда напротив анастомоза; участок стенок протеза выше уровня линии анастомоза; участок стенок проксимальнее места соединения, «пятка» анастомоза. Эти зоны наиболее благоприятны для НИ и прогрессирования атеросклероза. Воздействие положительного напряжения сдвига усиливает контакты эндотелиальных клеток друг с другом с последующим стимулированием сигналов их выживания. Например, белок внеклеточного матрикса (фибронектин) активирует адгезионные киназы, фосфорилирование которых инактивирует проапоптотический белок p53, что позволяет клеткам выжить [175]. T.N. Fitzgerald (2008) в своем исследовании

доказал, что воздействие ламинарного кровотока уменьшает пролиферацию и увеличивает апоптоз ГМК путем фосфорилирования отношения Вах/Bcl-2 в 1,8 раза при увеличении активности каспазы 3 в 3 раза [169].

1.2. Система апоптоза, пролиферации клеток и эндотелиальной дисфункции при атеросклеротическом поражении сосудистой стенки

Апоптоз признан одним из основных механизмов, который лежит в основе развития атеросклеротического поражения [88]. В нормальных условиях происходит динамическое равновесие между гибелью и пролиферацией клеток при их совместном воздействии на функционирование клеток эндотелия, однако сдвиги в ту или иную сторону в этом соотношении обуславливают развитие атеросклеротического поражения [208]. Такие атерогенные факторы как ЛПНП, провоспалительные цитокины, гипоксия и др. являются мощными индукторами апоптоза и пролиферации клеток. Активация системы апоптоза происходит путем повышения количества проапоптотических маркеров: p53, Fas/Fas liganda, на фоне снижения количества антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и др. [276, 86, 140].

В настоящее время получены доказательства наличия апоптоза во всех клетках атеросклеротической бляшки: ГМК, макрофагах, лимфоцитах и эндотелиальных клетках [116]. Наиболее часто он протекает в макрофагах, что позволяет предположить участие этих клеток в его индукции, путем выработки провоспалительных медиаторов. Уровень маркеров апоптоза в атеросклеротической бляшке варьирует от 10% в области фиброзных покрышек и до 40% в области богатых макрофагами и Т-лимфоцитами. Апоптотическая гибель связана с появлением фосфатидилсерина (ФС) на поверхности клеток, который обладает сильным сродством для ионов кальция. Возможность того, что кальцификация атеросклеротических бляшек является следствием апоптотической гибели клеток, представляет интерес для фармакологических вмешательств [236].

При проведении многочисленных исследований удалось обнаружить морфологические признаки апоптоза в образцах сосудистой стенки с атеросклеротическим и рестенозическим поражениями [281]. В соответствии с его непосредственным участием в ремоделировании сосудистой стенки, апоптоз наиболее выражен в прогрессирующих атеросклеротических поражениях по сравнению с начальными стадиями атеросклероза. Так, повышенное количество проапоптотического белка Вах было обнаружено на стадии жировых полос и атерокальциноза, но не обнаружено в клетках нормальной артериальной стенки, где преобладала экспрессия антиапоптотического белка Bcl-xl. В атеросклеротических бляшках ГМК пролиферируют значительно медленнее и демонстрируют более высокие показатели апоптоза, чем клетки в нормальной артериальной стенке, несмотря на присутствие факторов роста PDGF и FGF [287, 131]. В своих исследованиях G. Bauriedel et al. (1997) изучали образцы после выполнения эндартерэктомии из коронарных артерий от пациентов с нестабильной стенокардией (группа 1) и образцы от пациентов со стабильной стенокардией (группа 2). В группе 1 наблюдалось значительно большее количество апоптотических ГМК и макрофагов по сравнению с поражениями в группе 2 (28% против 16%) [79].

Анализируя результаты имеющихся исследований можно сказать, что роль апоптоза в развитии атеросклероза неоднозначна [39]. С одной стороны, гибель ГМК может ослабить фиброзную покрывку атеросклеротической бляшки за счет уменьшения синтеза внеклеточного матрикса, что ведет к ее дестабилизации с последующим разрывом и развитием тромбоза. С другой стороны, апоптотическая гибель макрофагов ослабляет воспалительный ответ, уменьшая синтез металлопротеиназ с последующим разрушением внеклеточного матрикса, что способствует стабилизации атеросклеротических бляшек [179; 267].

Еще одна не менее важная функция апоптоза при атеросклерозе связана с его прокоагулянтным потенциалом. Апоптотические клетки увеличивают на своей поверхности экспрессию ФС при потере антикоагулянтных компонентов мембранной клетки. ФС, в свою очередь, усиливает активность тканевого

фактора, который определяет тромбогенность атеросклеротических бляшек и способствует возникновению острых ишемических событий. Сами по себе апоптотические клетки являются основой для генерации и выпуска микрочастиц в кровотоки, действуя в виде мощных прокоагулянтных молекул как локально, так и системно [43].

1.3. Изменения в системах апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия после выполнения различных оперативных вмешательств на сосудистой стенке

Изучение активации маркеров апоптоза в послеоперационном периоде проводилась при моделировании баллонной ангиопластики, либо при выполнении шунтирующих оперативных вмешательств на различных видах животных (крысы, кролики, свиньи и др.) [63, 70, 100, 106, 120]. Повреждение стенки сосуда во время оперативных вмешательств приводит к стрессу, который запускает, как пролиферативный ответ, так и активацию маркеров системы апоптоза [72, 73].

Пролиферация клеток после моделирования ангиопластики сосудистой стенки была хорошо охарактеризована и изучена во многих исследованиях. Пик синтеза ДНК ГМК достигается через 48 часов, тогда как общее накопление ГМК в НИ достигает максимальных значений к концу 2 недели после травмы. Тем не менее, непрерывная клеточная пролиферация продолжается до 12 недель без заметного увеличения общего количества клеток [91]. Авторы данного исследования предположили, что параллельно и во взаимодействии с данным процессом протекает апоптоз, регулирующий клеточный состав сосудистой стенки. В ряде работ было доказано, что апоптоз ГМК происходит в НИ от 7 до 30 дней после травмы стенки сосуда. Использование TUNEL-метода в качестве индикатора апоптоза, показало, что максимальное количество гибнущих клеток (40%) наблюдалось в НИ через 9 дней после травмы. Их количество уменьшалось приблизительно до 20% к 14 суткам и сохранялось выше базального уровня (10%) к 28 дню. С другой стороны, количество клеток, которые подверглись апоптозу в меди, было очень низким, что сказалось на их обнаружении только через 9 дней

после операции совместно с достигнутым пиком значений маркеров, отвечающих за пролиферацию клеток [119].

Апоптоз клеток сосудистой стенки также изучался после моделирования выполнения баллонной ангиопластики коронарных артерий на свиньях. Активация проапоптотических маркеров наблюдалась через 1 час с достижением наибольших значений через 18 часов в клетках меди. Повышенные значения данных показателей сохранялись на этом уровне вплоть до 7 суток с последующим возвратом к исходным на 28 сутки. Пик активности пролиферации клеток пришелся на 3 сутки со снижением значений ниже базального уровня к концу месяца. Разница в динамике маркеров апоптоза и пролиферации может быть обусловлена более длительным периодом полужизни пролиферирующих клеток и разной скоростью элиминации апоптотических клеток. Также важно отметить, что в результате исследования была показана важность апоптоза, как индуктора в запуске миграции и пролиферации клеток артериальной стенки после оперативного вмешательства [64].

Позднее, в моделях на кроликах, также была выявлена динамика изменения маркеров апоптоза и пролиферации клеток в послеоперационном периоде, но уже относительно моделирования шунтирующих оперативных вмешательств на сосудистой стенке. Уровень ядерного антигена пролиферирующих клеток был снижен в первые сутки с последующим повышением к концу первой недели после операции. Показатели апоптоза были наиболее высокими между 1 и 3 сутками после вмешательства при снижении их значений к концу первой недели [73]. Интересен факт того, что применение транс-ретиноевой кислоты снижало индекс пролиферации и увеличивало количество маркеров апоптоза в НИ венозных трансплантатов в течение первой недели после операции, что способствовало в последующем уменьшению развития рестеноза зоны реконструкции [49]. На другой модели, на примере, артериализации яремной вены было показано, что, начиная с 7 суток признаки апоптоза уже не обнаруживаются, а пролиферативный ответ стал преобладающим фактором [72]. Во многих исследованиях было отражено, что апоптотическая гибель клеток после оперативного вмешательства

не отражает пассивный ответ на стимулы, типичные для некроза. Так, повреждению стенки сосуда во время операции при отсутствии кровотока не удалось вызвать значительную гибель клеток в течение 2 часов, что свидетельствует о недостаточности одной механической травмы для запуска апоптоза. Возможно, что поток крови необходим для удовлетворения клеточных энергетических потребностей (выработки АТФ) для запуска энергозависимого процесса апоптоза [41].

1.4. Основные биомаркеры апоптоза, пролиферации клеток, дисфункции эндотелия и их роль в развитии атеросклеротического поражения и рестеноза зоны реконструкции

Семейство Bcl-2 представляет собой группу клеточных белков, которые являются важными регуляторами митохондриального пути апоптоза [182, 185, 233]. Оно насчитывает более 15 членов, и подразделяется на две подгруппы. Первая подгруппа состоит из антиапоптотических белков, таких как Bcl-2, Bcl-x, Mcl-1, Bcl-w, A1 и др.; представителями второй группы являются проапоптотические маркеры: Bax, Bak, Bad, Bik, Hrk, Bid and Bcl-xs, которые регулируют функцию проницаемости мембран митохондрий клеток [165]. Белки первой подгруппы обладают антиоксидантным действием на стрессовые клетки, предотвращая выброс цитохрома C в цитозоль клетки при образовании комплексов с проапоптотическими белками данного семейства [52, 177, 250].

Проведенное иммуногистохимическое исследование выявило наличие белка Bcl-2 в нормальной сосудистой стенке человека (внутренняя грудная артерия и большая подкожная вена). В срезах, полученных, после выполнения эндартерэктомии из коронарных артерий, маркер Bcl-2 был идентифицирован только в меди атеросклеротических бляшек, в независимости от локализации (периферическое или коронарное русло) и характера поражения (рестеноз либо первичное атеросклеротическое поражение) иссеченного образца [68]. Количество белка Bax было повышено в ГМК преимущественно вокруг липидного ядра и фиброзной покрышки атеросклеротических бляшек [66]. Эти

клетки содержали липидные вакуоли и часто трансформировались в пенистые клетки, указывая на возможную взаимосвязь между накоплением липидов в цитоплазме этих клеток и изменением соотношения Bax/Bcl-2. G.D. Norata (2002) в свою очередь, показал в своем эксперименте, что в области атеросклеротического поражения дуги аорты маркеры Fas, Bax и каспазы 3 в основном располагались в эндотелии и ГМК, тогда как Bcl-2 локализовался с макрофагами и ГМК в более глубоких слоях атеросклеротических бляшек [65]. Claus Bartels (2001) и В. Kahle (2016) доказали, что повышенное количество проапоптотических белков Bax и p53 в послеоперационном периоде ведет к посттромботической окклюзии аутовенозного шунта, выполненного на различных видах животных [90, 261].

Другим не менее важным регулятором апоптоза является биомаркер p53, который регулирует фундаментальные клеточные процессы, такие как апоптоз, пролиферацию, остановку клеточного цикла, старение и клеточный метаболизм [98]. Белок p53 обеспечивает остановку клеточного цикла в фазе G1 в ответ на повреждение ДНК, гипоксию, оксидативный стресс, ЛПНП, а также предотвращает размножение поврежденных клеток [92]. Способность p53 осуществлять свои функции в атеросклеротических поражениях зависит от взаимодействия с белком MDM2, который является его физиологическим ингибитором, способствуя деградации белка p53 [196, 273]. Применение ингибитора MDM2 в экспериментальных работах улучшило ремоделирование сосудистой стенки посредством уменьшения размера НИ и модуляции воспалительного процесса в силу того, что p53 ингибирует путь NF-κB, который регулирует течение воспалительных реакций [156].

Белок p53 может осуществлять свои функции посредством регуляции активности белков семейства Bcl-2 [55]. Он действует посредством активации белка Bax, ингибируя действие антиапоптотического белка Bcl-2, что приводит к активации эффекторных каспаз апоптоза. Данный белок регулирует запуск рецепторного пути апоптоза APO-1/Fas, путем увеличения Fas рецептора на клеточной поверхности ГМК сосудистой стенки [54, 139].

Несмотря на то, что существует точка зрения участия белка p53 в патогенезе ряда заболеваний сердечно-сосудистой системы, его роль в прогрессировании атеросклероза и развитии рестеноза зоны реконструкции остается малоизученной [189].

В результате проведенных исследований, ученые обнаружили локализацию белка p53 в областях с признаками хронического воспаления в атеросклеротических бляшках. Воспаление в атеросклеротических поражениях связано с продукцией цитокинов и свободных радикалов, являющихся мощными повреждающими агентами ДНК, которые ведут к накоплению белка p53. Окрашивание белка p53 в образцах неповрежденной артериальной стенки (внутренняя грудная артерия) показало его наличие только в $0,2 \pm 0,29\%$ клеток, при совместной локализации MDM2 и p53 в макрофагах и ГМК атеросклеротических бляшках в $60,53 \pm 8,32\%$ случаев [92, 271].

Отмечено, что экспрессия белка p53 уменьшается в прогрессирующих атеросклеротических поражениях [153]. В нормальной артериальной стенке он может вызывать остановку роста и апоптоз клеток. Животные, имеющие дефицит данного белка, демонстрируют увеличение атеросклеротического поражения аорты за счет усиленной скорости пролиферации клеток [259]. Дополнительная локальная генная доставка данного белка приводит к снижению образования атеросклеротических бляшек путем усиления апоптоза в зоне поражения при снижении пролиферации клеток [152, 163]. Стоит отметить, что при дефиците белка p53 в атеросклеротических бляшках, преобладающим путем гибели клеток является некроз. При этом p53 может защищать геном клеток от окисления реактивными формами кислорода, путем активации антиоксидантных систем организма [114].

К сожалению, в литературе недостаточно исследований, посвященных изучению роли белка p53 в развитии рестеноза зоны артериальных реконструкций после различных оперативных вмешательств [212, 269]. Ряду ученых, удалось выявить наличие белка p53 с пониженной активностью в образцах с зоной рестеноза после проведенных реконструктивных вмешательств [254]. Авторы в

результате своей работы пришли к выводу, что повышенное количество белка p53 может привести к уменьшению толщины НИ до 80% в послеоперационном периоде за счет снижения включения тимидина в пролиферирующие ГМК НИ, стимулированное PDGF BB, который активируется в ответ на операционную травму [270]. В свою очередь М. Aoyagi (1997) показал, что после проведения ЧТБА на сонных артериях крысы, количество p53 достигает своих максимальных значений к концу второй недели. Тогда как к концу первого месяца происходило снижение количества маркера p53, при этом интенсивность пролиферации клеток была снижена только в тех клетках, которые продолжали секретировать повышенное количество p53 [121]. Любопытное для нас исследование провел S. Scott (2002), применив брахиотерапию для лечения рестеноза зоны реконструкции, что в результате привело к активации p53 с последующей индукцией апоптоза в клетках НИ. Данные клетки оказались более чувствительны к апоптозу, вызванному p53, чем неповрежденные клетки сосудистой стенки [149].

Одним из основных участников рецепторного пути апоптоза является Fas рецептор и его лиганд [174]. Fas ligand является мембранным белком, который принадлежит к семейству факторов некроза опухолей и индуцирует апоптоз посредством взаимодействия с трансмембранным рецептором Fas (CD95 / Apo-1) [183]. Затем активированный рецептор взаимодействует с внутриклеточным адаптером - белком FADD (белок, взаимодействующий с доменом смерти Fas-рецептора) с последующей активацией каспазы 8 посредством аутопротеолиза и активацией нижерасположенных каспаз [154, 187, 191]. Растворимая форма Fas рецептора (sFas) не имеет трансмембранного участка и блокирует взаимодействие Fas liganda с Fas, являясь естественным ингибитором данного пути апоптоза [264].

Fas экспрессируется на многих типах клеток сосудистой стенки [198]. Fas ligand обнаруживается преимущественно в активированных Т-лимфоцитах, макрофагах, ЭК и ГМК. В эндотелии сосуда он играет важную роль в контроле экстравазации воспалительных клеток [265]. При эндогенной экспрессии Fas ligand функционирует как репрессор воспалительных реакций, вызывая Fas-

опосредованную гибель иммунных клеток при попытке проникнуть в стенку сосуда. При индуцированной экспрессии он, наоборот, вызывает воспалительную реакцию с инфильтрацией нейтрофилов вследствие высвобождения $IL-1\beta$, нейтрофильного хемоаттрактанта, после включения Fas рецептора [138].

Экспрессия Fas и Fas ligand была обнаружена как в нормальной, так и в пораженной стенке сосуда, вследствие чего можно считать активацию данного пути апоптоза признаком атерогенеза [117, 128, 129]. Поскольку ГМК экспрессируют Fas, а воспалительные клетки экспрессируют Fas ligand, было высказано предположение, что Fas-опосредованный апоптоз может способствовать дестабилизации атеросклеротических бляшек. Так, культивируемые ГМК атеросклеротических бляшек крыс экспрессируют Fas и легко подвергаются апоптозу при взаимодействии с Fas ligandом. Локальная доставка Fas liganda в сонные артерии этих животных после ЧТБА вызывала апоптоз в пролиферирующих ГМК НИ [184]. И напротив, культивируемые ГМК человека не подвергаются Fas-опосредованной гибели при взаимодействии антител с Fas, за исключением случаев, когда эти клетки стимулируются $TNF\alpha$ интерлейкином- 1β [66].

В отличие от ГМК, сосудистые ЭК устойчивы к Fas-опосредованному апоптозу в нормальных условиях. Эндотелий экспрессирует Fas на своей поверхности, не подвергаясь апоптозу при воздействии агонистических Fas-антител или при увеличении Fas ligand путем аденовирусной доставки. Они остаются устойчивыми к Fas-опосредованному апоптозу даже при активации интерферона- γ , который заметно увеличивает экспрессию Fas. Это может быть обусловлено либо низким количеством Fas ligand на поверхности ЭК, либо синтезом эндогенных ингибиторов Fas (FLIPs) эндотелием, что обеспечивает их выживание. Другим защитным механизмом можно рассматривать участие белков семейства Bcl-2 в процессе гибели клеток, которые функционируют как регуляторы Fas-опосредованного апоптоза, но не во всех типах клеток [126]. Интересен факт, что NO, высвобождаемый из ГМК крыс, простимулированных $IL-1$, способствует экспрессии Fas рецептора [136]. Fas ligand защищает от

индуцированного гипоксией гибель эндотелиальных клеток, ослабляя ишемически-реперфузионные повреждения [130]. Таким образом, можно сделать вывод, что Fas ligand ингибирует воспалительные реакции в стенке сосуда, выполняя атеропротективную функцию. С другой стороны, изменения в экспрессии Fas ligand и Fas могут быть признаком дисфункции эндотелия и способствовать тем самым атерогенезу.

Наличие влияния маркеров рецепторного пути апоптоза на развитие НИ было доказано в экспериментальных исследованиях. Т. Imanishi (2000) et al. показали, что через 24 и 48 часов после выполнения ЧТБА происходит уменьшение синтеза белка FLIP в меди с последующим возвращением к исходному уровню на 28 сутки [150]. Аденовирусная доставка Fas ligand приводит к уменьшению образованию НИ после ЧТБА за счет подавления воспалительной реакции в области травмы [241]. В другом исследовании проведен сравнительный анализ эффективности транспортировки генов FasL и p21 по их способности ингибировать образование НИ в зоне оперативного вмешательства. Только одна доставка Fas liganda приводит к уменьшению формирования НИ на 60% путем индукции апоптоза в ГМК при снижении инфильтрации Т-лимфоцитов зоны оперативного вмешательства [178]. Однако, в случае с механическим повреждением бедренной артерии у мышей с дефицитом Fas ligand или Fas, интенсивность образования НИ через 4 недели достоверно значимо не различалась. Данное наблюдение может свидетельствовать о существовании других сигнальных путей апоптоза в случае с механической травмой сосудистой стенки [240].

К.М. Katsaros et al. показали, что у пациентов с исходно сниженным уровнем sFas диагностировался рестеноз зоны вмешательства через 6 месяцев после выполнения ЧТБА коронарных артерий. После проведения ЧТБА коронарных артерий произошло дальнейшее снижение значений sFas на фоне повышения уровня Fas liganda в группе пациентов с рестенозом зоны вмешательства. Авторы считают, что определение Fas и Fas liganda в сыворотке

крови до и после ЧТБА может помочь выявить пациентов с высоким риском развития рестеноза зоны вмешательства [145].

Одной из особенностей механизмов апоптоза и пролиферации клеток является их возможность компенсировать друг друга. Любое нарушение баланса между этими механизмами ведет к развитию дисфункции эндотелия, что является причиной развития атеросклероза и его дальнейших осложнений [217].

Одним из основных маркеров, отвечающих за пролиферацию и миграцию клеток сосудистой стенки является белок PDGF [104, 197]. Он секретируется мегакариоцитами, при этом α -гранулы тромбоцитов являются основным хранилищем для PDGF [213]. Данный белок также синтезируется эндотелием, активированными макрофагами и ГМК после повреждения стенки сосуда. Выработка PDGF происходит под воздействием гипоксии, провоспалительных медиаторов, тромбина и других факторов роста [173; 214].

PDGF является сильным митогеном и хемоаттрактантом для фибробластов, ГМК, ЭК, обладая при этом вазоконстрикторным эффектом [160]. Он облегчает синтез ДНК, способствует пролиферации и миграции клеток, а также отвечает за образование внеклеточного матрикса [223, 224]. Свои основные функции он осуществляет в синергии с другими факторами роста. К примеру, FGF поддерживает пролиферацию клеток, опосредованную PDGF [132]. В ряде работ был доказан более сильный пролиферативный и митогенный эффект PDGF BB в сравнении с другими типами димеров. Данный факт послужил основным поводом к изучению данного подтипа PDGF в нашем исследовании [99]. Одним из активаторов синтеза биомаркера PDGF BB является гипоксия. При этом PDGF BB защищает эндотелий от апоптоза посредством регулирования PI3K/Akt/Stat3 сигнального пути [172].

Увеличенное количество PDGF было обнаружено почти во всех типах клеток атеросклеротической бляшки [122]. PDGF отвечает за ее стабильность во время атерогенеза, увеличивая толщину ее фиброзной покрышки [155]. Достоверно известно, что ЛПНП стимулируют продукцию PDGF ГМК, а ЛПВП, наоборот, значительно уменьшают его выработку [211].

В своей работе Н. Karvinen et al. (2009) показали, что экспрессия PDGF R- α была усилена в клетках эндотелия и макрофагах, в то время как PDGFR- β был в основном сконцентрирован в ГМК [215]. PDGF стимулирует ГМК медики к смене фенотипа с сократительного на синтетический, тем самым способствуя увеличению их пролиферативной способности с усилением синтеза внеклеточного матрикса. R.K. Sihvola et al. (2003) показали, что применение перорального ингибитора, селективного в отношении рецепторов PDGF, приводит к уменьшению образования НИ в трансплантированном кондуите с $72,3 \pm 19,9$ до $12,7 \pm 1,9$ мм [225].

Следует отметить, что белок PDGF является одним из основных факторов, влияющих на образование НИ в послеоперационном периоде. Многочисленные исследования продемонстрировали, что PDGF и PDGF R участвуют в восстановлении артериальной стенки после операционной травмы [123, 151]. Их экспрессия увеличивается приблизительно в 10 – 20 раз через 6 ч после нанесения травмы сосудам [125]. В своей работе К. Uchida et al. (1996), в результате моделирования ангиопластики сосудистой стенки на животных, доказали, что экспрессия мРНК PDGF BB значительно увеличивается и достигает своего пика на 7-й день с сохранением этого уровня вплоть до трех недель. Авторы данной работы еще раз подтвердили, что PDGF BB, стимулируя пролиферацию ГМК и накопление внеклеточного матрикса, способствует формированию НИ после выполнения ангиопластики различных сосудистых бассейнов [124]. Другие ученые провели интересное исследование, посвященное изучению сравнения синтеза факторов роста PDGF и FGF в стенках артериальных и венозных кондуитов. В венозном кондуите продуцировалось большее количество PDGF и FGF, чем в артериальном, тем самым индуцируя более высокую митогенную активность ГМК медики [137]. В дальнейших своих работах, A.V. Sterpetti (2016) et al. показали, что миоинтимальная гиперплазия наблюдалась в венозных и синтетических кондуитах на фоне увеличенного количества факторов роста при ее отсутствии в артериальных кондуитах. Количество маркеров PDGF и FGF было увеличено в образцах клеток НИ именно из синтетических и венозных кондуитов.

Применение антител к PDGF и FGF привело к снижению митогенной активности ГМК и толщины НИ на 66% в случае выполнения шунтирующих операций [251]. С. Rutherford et al. (1997) исследовали влияние применения антител к PDGF BB и FGF на развитие рестеноза после проведения ЧТБА на сонных артериях крыс. Комбинированное применение АТ сразу к двум факторам роста привело к уменьшению толщины НИ на 83,8%. Авторы пришли к выводу, что преобладающую роль в патогенезе формирования НИ в случае использования артериальных аллографтов при реконструктивных вмешательствах на артериях нижних конечностей сыграли ФНО- α и интерлейкин-1 [238]. Однако, следует отметить, что далеко не во всех работах по изучению проходимости стентов с покрытием, в состав которого входил ингибитор PDGF R можно наблюдать удовлетворительную первичную проходимость в отдаленном послеоперационном периоде. Уменьшение синтеза PDGF может привести к ухудшению результатов формирования коллатерального русла, что препятствует компенсации кровообращения [158]. Необходимо проведение дальнейших исследований, направленных на изучение механизмов действия PDGF и его взаимосвязей с другими маркерами системы апоптоза и дисфункции эндотелия, которые позволят выявить конкретные точки приложения для применения различных форм лекарственных препаратов.

Одной из ключевых молекул пролиферации и выживаемости клеток эндотелия является VEGF [166]. В его синтезе принимают участие ЭК, макрофаги, фибробласты, лимфоциты, ГМК, а также активированные тромбоциты в зависимости от pH среды, концентрации кислорода, присутствия других факторов роста [9]. На сегодняшний день известно 6 основных типов VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF [51].

Особенно интересен белок VEGF A165, который является наиболее активной и биологически значимой изоформой VEGF A. Экспрессия VEGF A165 происходит в нормальной артериальной стенке сосуда. Данный белок регулирует многочисленные процессы в эндотелии, включая митогенез, проницаемость и тонус сосудов [37]. Он также способен оказывать воздействие на

антиапоптотический белок Bcl-2, тем самым защищая клетки эндотелия от апоптоза через митохондриальный путь. VEGF может также активировать фибринолитическую систему крови, уменьшать адгезию лейкоцитов, снижать экспрессию молекул адгезии. Его взаимодействие с eNOS способствует продукции NO и простаглицина, которые оказывают репаративное воздействие на целостность стенки сосуда после проведения сосудистых вмешательств [245].

Следует отметить, что при атеросклеротическом поражении существуют два процесса, которые приводят к повышению уровня VEGF A165: гипоксия и воспаление [94; 148; 260]. При развитии и прогрессировании атеросклероза особое значение играет VEGF R1, посредством которого активируются макрофаги, стимулируя тем самым провоспалительные процессы [247]. С другой стороны, VEGF индуцирует секрецию фактора фон Виллебранда и тканевого фактора, участвующих в тромбообразовании [35]. Положительным моментом, с одной стороны, является то, что в условиях ишемии, VEGF способствует развитию коллатеральной сосудистой сети, улучшая кровоснабжение в бассейне стенозированной артерии [24]. Однако, с другой стороны, он сам же стимулирует развитие *vaso vasorum* в самой атеросклеротической бляшке, что сопряжено с риском кровоизлияния, нарушения целостности ее покрышки с последующим тромбозом [278].

Вопрос участия VEGF в развитии рестеноза зоны реконструкции также достаточно спорен. С одной стороны, в ряде исследований VEGF был обнаружен в участках сосудистой стенки с зоной рестеноза после оперативных вмешательств [53]. Данное явление можно объяснить быстрым ростом капилляров в области формирующейся НИ, следовательно, ее обильным кровоснабжением, что приводит к быстрым темпам ее роста. Ввиду небольшого срока формирования, эти капилляры являются морфологически неполноценными, следовательно, повышается риск их разрыва, что усугубляет развитие воспалительной реакции и усиливает митогенную активность ГМК в формирующейся НИ. Другой причиной обнаружения VEGF в зоне рестеноза может быть активация воспалительного ответа на операционную травму совместно с адгезией тромбоцитов и

высвобождением VEGF [26]. VEGF сам по себе индуцирует миграцию ГМК за счёт активации фосфатидилинозитол-3 киназы и киназы 1/2, регулируемой внеклеточными сигналами. За счет увеличения проницаемости сосудистой стенки происходит формирование мест контакта для мигрирующих эндотелиальных, ГМК и воспалительных клеток [31]. В ряде работ была проанализирована динамика уровня VEGF А до и после стентирования коронарных артерий у пациентов с ИБС. Повышение VEGF А в крови через 24 часа и 4 недели после операции было ассоциировано с риском развития рестеноза зоны реконструкции. Авторы предположили, что возрастающие уровни VEGF отражают более высокое базальное содержание VEGF, а его повышение после повреждения артериальной стенки может способствовать воспалению и ангиогенезу, ускоряя образование НИ. Однако продолжительность наблюдения в этих исследованиях была ограничена 6–12 месяцами [102].

С другой стороны, многие исследования на животных показали, что VEGF ускоряет эндотелизацию зоны вмешательства, тем самым ингибируя образование НИ. Применение стентов с покрытием, которые содержат в своей структуре VEGF, способствует ранней эндотелиализации зоны вмешательства, подавляя пролиферацию ГМК, что в последующем ведет к уменьшению формирования НИ [263]. J. Yin (2017) также доказал, что низкий уровень VEGF является независимым предиктором позднего рестеноза, который отражает эндотелиальную дисфункцию [292].

Важным регулятором как системы апоптоза, так и пролиферации клеток является NO, который отражает функциональное состояние эндотелия [291]. NO представляет собой двухатомную молекулу, функционирующую в качестве клеточного мессенджера, синтезированного из L-аргинина посредством следующих NO-синтаз: нейрональной, индуцибельной и эндотелиальной [82, 161]. В сосудистой стенке NO вызывает вазодилатацию, ингибирует агрегацию тромбоцитов, предотвращает адгезию нейтрофилов к эндотелию, ингибирует пролиферацию и миграцию ГМК, регулирует запрограммированную гибель клеток [76, 206, 207].

Отметим, что NO может оказывать как про-, так и антиапоптотическое действие, в зависимости от его концентрации, источника продукции и биологической среды [199, 200]. Индукция апоптоза NO опосредована как рецепторным, так и митохондриальным путями (Рисунок 2).

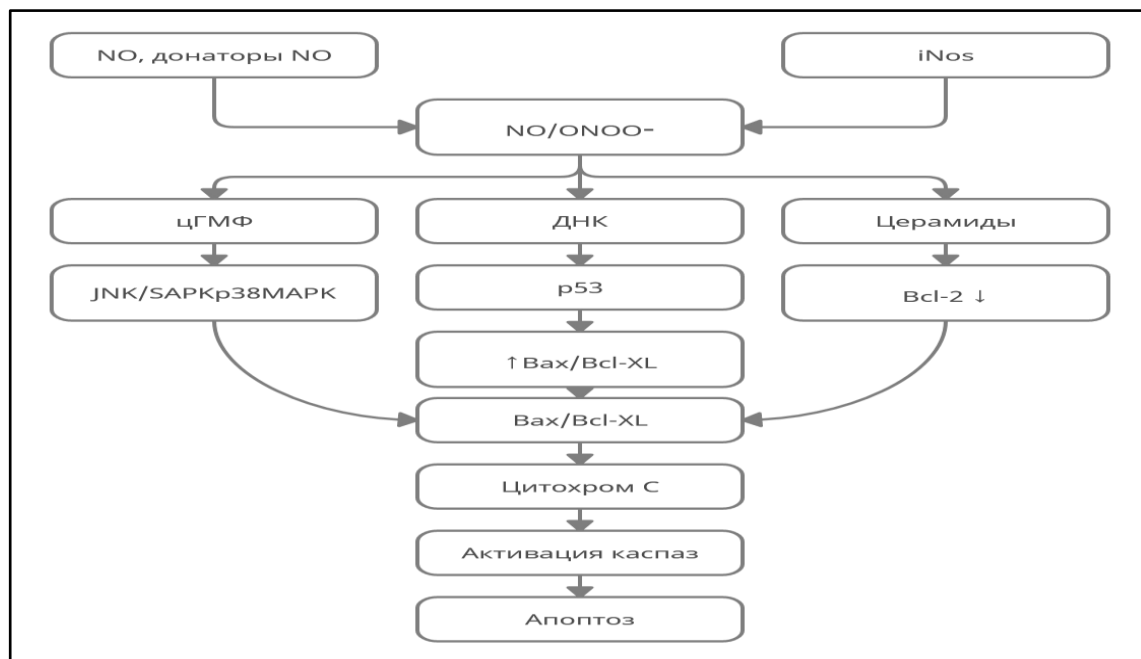


Рисунок 2 - Проапоптотические сигнальные пути метаболитов оксида азота

NO способствует связыванию Fas liganda с Fas рецептором через модификацию его цитоплазматического домена путем S-нитрозилирования [249]. В исследованиях К. Fukuo (1996) можно найти доказательство того, что экспрессия Fas повышается под действием донатора NO – нитропрусида натрия в ГМК сосудистой стенки. При этом высокий уровень NO, высвобождаемый из самих ГМК, приводит к их гибели, что способствует высвобождению FGF, который стимулирует пролиферацию соседних клеток [203].

Важно отметить, что NO оказывает проапоптотическое действие на ГМК сосудистой стенки при этом защищая эндотелий от гибели. Так, применение нитропрусида натрия приводит к увеличению соотношения Вах/Bcl-2 в ГМК с последующей активацией каспаз. Низкий уровень NO обратимо снижает проницаемость митохондрий, в то время как более высокие его концентрации

ускоряют открытие пор митохондрий и высвобождение цитохрома С [201, 202, 204].

Другим механизмом действия NO является инактивация ингибитора апоптоза путем S-нитрозилирования, что ведет к активации каспаз. Так, NO может опосредовать гибель клеток через активацию белка p53, который вызывает остановку клеточного цикла за счет регулирования белка p21 и изменения соотношения семейства белков Bcl-2 (Bax/Bcl-xL) [77].

NO также способен защищать клетки от апоптоза, вызванного различными стимулами, такими как TNF α и оксидативный стресс. Механизм его действия заключается в увеличении уровня экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 и активации сигнального пути Akt / PKB, индуцирующих фосфорилирование белка Bad и прокаспазы-9 [205]. Эндотелий сосудов постоянно подвергается воздействию ряда гемодинамических сил, оказывающих большое влияние на их клеточную структуру и функции. Активация NO в ответ на напряжение сдвига ингибирует активацию каспазы-3, тем самым предотвращая гибель клеток [105]. В ряде исследований, показано, что апоптотические эндотелиальные клетки преимущественно расположены в постстенотической зоне с низким напряжением сдвига. Следовательно, увеличение количества NO путем добавления L-аргинина может ограничить гибель клеток и уменьшить прогрессирование атеросклероза [13].

В силу способности NO подавлять миграцию и пролиферацию ГМК из меди в интиму при стимуляции апоптоза в ГМК формирующейся НИ данный биомаркер может быть предложен в качестве потенциально перспективной молекулы для улучшения проходимости сосудистых реконструкций.

1.5. Возможности медикаментозной коррекции маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей

Процесс гибели клеток как при атеросклеротическом поражении, так и при выполнении оперативных вмешательств после повреждения сосудистой стенки

является высоко регулируемым и связанным с окислительно-восстановительным состоянием клеток [62, 210]. АФК относятся к числу факторов, которые изменяют функциональное состояние клеток и ведут к их гибели через систему апоптоза в результате нарушения баланса между антиоксидантной и прооксидантной системами [141, 228]. Дисбаланс, в свою очередь, ведет к повреждению клеток стенки сосуда за счет образования свободных радикалов [61, 230]. Последние, в свою очередь, образуются в больших количествах при оксидативном стрессе. АФК способен активировать апоптоз в различных типах клеток стенки сосуда. Так, проапоптотическое воздействие АФК в ЭК выражается в нарушении проницаемости митохондриальной мембраны с последующим высвобождением цитохрома С, что в конечном итоге ведет к активации эффекторных каспаз, и, как следствие, к запуску апоптоза [75]. В случае с ГМК сосудов, АФК способствует их пролиферации и гипертрофии [58]. Стоит отметить, что сам токсический эффект АФК проявляется не столько при самой ишемии конечности, сколько при последующей реперфузии ткани после восстановления кровотока [20].

В силу того, что АФК является непосредственным индуктором апоптоза при атеросклеротическом поражении, снижение интенсивности синтеза АФК или полная нейтрализация их продукции представляется наиболее логичным методом восстановления функций клеток после различных видов реконструктивных вмешательств [2; 222]. Так, D.K. Jagadeesha (2009) et al. показали, что после повреждения сосудистой стенки повышается продукция супероксида, приводящая к массивному апоптозу ГМК меди за счет увеличенной экспрессии проапоптотического белка Вах, каспазы 3 и 9. С помощью применения антиоксиданта темполола удалось ингибировать потерю клеток меди за счет уменьшения оксидативного стресса, путем увеличения их плотности в поврежденной артериальной стенке. Эти изменения в клетках меди ведут к образованию НИ за счет того, что апоптотические клетки посылают сигналы здоровым клеткам для их дифференцировки с последующей миграцией и пролиферацией [164].

Витамин Е является жирорастворимым антиоксидантом, который может защищать полиненасыщенные жирные кислоты в мембране клетки от окисления, регулировать выработку активных форм кислорода (АФК) [10; 59]. Он является важным питательным веществом, влияющим на ключевые клеточные и молекулярные механизмы, а также на регуляцию экспрессии генов, играющих ключевую роль в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний. Исследования на культурах клеток и животных были сосредоточены на идентификации сигнальных путей, регулируемых витамином Е, и его участие в воспалении, липидном гомеостазе и стабильности атеросклеротических бляшек [4, 5]. Он состоит из двух родственных групп веществ: токоферолов и токотриенолов, состоящих из нескольких изомерных форм. Являясь донатором водорода, витамин Е окисляется, препятствуя окислению полиненасыщенных жирных кислот в клеточных мембранах и синтезу свободных радикалов [2, 50, 83].

Известно, что активация маркеров системы апоптоза в результате механического повреждения связана с окислительным стрессом, что выражается в снижении уровня глутатиона на 63% в течение 30 минут после травмы и включении редокс-чувствительного пути. Изменение окислительно-восстановительного состояния сосудов путем введения структурно разнородных антиоксидантов, заметно снижает индукцию апоптоза через 30 минут после операции. Используемые антиоксиданты - витамины С и Е, а также пробукол после ЧТБА заметно уменьшает количество гибнущих клеток с $70 \pm 9\%$ до $15 \pm 5\%$ путем снижения уровня супероксидного аниона, образующегося в сосудах после травмы [142, 219]. Однако, и сама операция, ведет к снижению естественных антиоксидантов в послеоперационном периоде. Так, A. Hill et al. (2019) показали, что уровень витамина Е значительно снижается во время операции на сердце и сохраняет свои сниженные значения в течение последующих 2-х дней [220].

В мировой литературе существует ряд исследований, посвященных изучению влияния применения токоферола на систему апоптоза, пролиферацию клеток и дисфункцию эндотелия. Так, M. Uemura (2002) показал, что индукция

апоптоза ЭК, вызванная ЛПНП, была связана с повышенной активностью каспазы-3 и образованием внутриклеточных АФК, эффекты которых были уменьшены применением токоферола. Автор сделал вывод, что токоферол защищает клетки от апоптоза не только за счет поглощения АФК, но и за счет ингибирования активности эффекторных каспаз [274]. F. Nigris (2000) в своей работе, доказал, что применение альфа и гамма токоферола приводит к значительному уменьшению активности каспазы-3 и -8 в ГМК коронарных артерий [193]. Mh. Do (2015) в своем исследовании сравнил влияние альфа и гамма токоферола на апоптоз в эндотелии. Было показано, что гамма токоферол предотвращает индуцированный апоптоз в ЭК путем увеличения экспрессии Bcl-2 на фоне уменьшения синтеза проапоптотического белка Bax [296]. Ю.В. Азизова (2011) доказала, что применение альфа токоферола оказывает на клетки стресс-протекторный эффект за счет увеличения экспрессии белков, обладающих цитопротективным эффектом, таких как Bcl-2, Bcl-Xl [6].

В исследовании M. Li-Weber et al. (2002), было показано, что введение витамина E может оказывать влияние на маркеры рецепторного пути апоптоза, путем подавления экспрессии Fas liganda и, следовательно, обеспечения защиты Т-клетки от гибели [285]. J.A. Aalst (2004) продемонстрировал способность альфа токоферола сохранять миграцию ЭК и ускорять восстановление эндотелиального монослоя после повреждения за счет ингибирования нарушения целостности мембраны, вызванных ЛПНП [50]. Еще одним эффектом от применения альфа токоферола является уменьшение синтеза провоспалительных медиаторов, как в ЭК, так и в ГМК сосудистой стенки с улучшением функции эндотелия у пациентов с атеросклеротическим поражением [109, 111, 231, 284, 294].

K. Malek Mohammad (2019) et al. доказали, что витамин E ингибирует активность протеинкиназы C, уменьшает секрецию цитокинов и снижает пролиферацию и миграцию ГМК сосудистой стенки [181]. Так, пролиферация клеток, вызванная PDGF была полностью подавлена применением витамина E, что может быть обусловлено эффективным снижением адгезии тромбоцитов к месту травмы сосудистой стенки [96].

Помимо вышеперечисленного витамин Е может оказывать регуляторное влияние на ангиогенез и васкулогенез, которые связаны с модуляцией экспрессии VEGF. Так, применение витамина Е стимулирует синтез VEGF и его рецепторов, способствуя предотвращению реперфузионного повреждения в сердечно-сосудистой системе, стимулируя клеточную миграцию, восстановление и регенерацию клеток сосудистой стенки [283].

Все вышеперечисленные эффекты от применения витамина Е послужили основанием выбора данного препарата в нашем исследовании.

Другим препаратом, оказывающим влияние на процесс апоптоза, пролиферацию клеток и дисфункцию эндотелия является «Актовегин»® [3]. Он представляет собой безбелковый гемодиализат, который получают из крови телят с помощью процесса ультрафильтрации. Последние исследования *in vitro* были сосредоточены на выяснение его антиоксидантного, антиапоптотического, противовосполительного действия, а также влияния на факторы роста [23, 47, 133].

Применение «Актовегина»® способствует сдвигу окислительно-восстановительного баланса клетки в сторону окисляемых субстратов, стимулируя абсорбцию и утилизацию кислорода, а также защиту клетки от гипоксического повреждения и ацидоза за счет накопления лактата [275]. Оксидативный стресс снижается под действием «Актовегина»® за счет ингибирования ядерного фермента поли-АДФ-рибозо-полимеразы, который может обнаруживать и восстанавливать повреждения ДНК в нормальных условиях, но может одновременно нарушать гликолиз и дыхание митохондрий, что в конечном итоге приводит к гибели клеток [45]. Эффекты «Актовегина»® наиболее выражены при гипоксическом характере повреждения тканей, так как он увеличивает кислородный энергообмен в клетках всех органов [1]. При моделировании ишемии в эксперименте использование аа способствовало стабилизации рН внутри клетки, а также уменьшению повреждения ее мембраны свободными радикалами [38].

Помимо вышеупомянутых свойств, дополнительно следует выделить противовоспалительный эффект «Актовегина»®, снижающий уровень миграции и

инфильтрации полинуклеарных нейтрофилов в стенке сосуда во время ишемии - реперфузии. Данный эффект достигается за счет снижения уровня высвобождения противовоспалительного цитокина интерлейкина-1beta из моноцитов и лимфоцитов [146].

Несмотря, на все вышеописанные эффекты «Актовегина»® , в нашем исследовании наиболее важным и актуальным вопросом является его способность воздействовать на систему апоптоза (Рисунок 3). «Актовегин»® способен модулировать активность NF-kB, предотвращая апоптоз, вызванный амилоидными β-пептидами при этом увеличивая окислительную мощность митохондрий клеток [7]. Повышение экспрессии NF-kB ведет к активации антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-x с последующей защитой клеток от апоптоза, индуцированного TNF-α [272].



Рисунок 3 - Эффекты применения препарата «Актовегин»®

В работе M. Aoki et al. (2001) была продемонстрирована способность антиоксидантной терапии ингибировать транслокацию Bax в мембране клеток, опосредованную активностью NF-kB в эндотелии в условиях гипоксии [115]. В одной из своих работ M.W. Elmlinger et al. (2011) продемонстрировали способность «Актовегина»® снижать интенсивность активации каспазы-3 и АФК в зависимости от применяемой дозы препарата на фоне увеличения активности белков Bcl-2 и Bcl-x [48]. Также следует отметить косвенное влияние «Актовегина»® на активность вышеупомянутых белков за счет своего метаболического эффекта (усиления утилизации кислорода и переноса глюкозы в

митохондрии клеток, окислительного их фосфорилирования с увеличением выработки кислорода на 40%) [36]. В свою очередь, X.W. Wang (2009) с коллегами привели доказательство того, что «Актовегин»® в условиях острого повреждения сосудистой стенки уменьшает апоптоз клеток посредством подавления экспрессии проапоптотического белка Bax [108]. М. Yurinskaya (2014) с помощью проведения экспериментального опыта показал, что применение перекиси водорода индуцирует апоптоз клеток до 43%, а, в случае инкубации клеток совместно с «Актовегином»®, данный показатель снижался до 17% [45].

D. Schönwald (1991) в своем исследовании показал, что применение «Актовегина»® оказывает синергетическое действие на пролиферацию ЭК *in vivo* совместно с факторами роста FGF и VEGF, вызывая увеличение их количества, повышение активности фосфатаз и улучшение включения тимидина в пролиферирующие клетки эндотелия [118]. «Актовегин»®, в частности, улучшает защитные функции эндотелия за счет сфинголипидов (один из основных компонентов входящий в состав препарата), которые связываются с лизофосфолипидными рецепторами посредством перестройки цитоскелета. Сфинголипиды в силу своей гидрофильно-гидрофобной бинарной природы легко интегрируются в клеточную мембрану с дальнейшей ее стабилизацией [146].

Суммируя все вышеизложенные результаты проведенных исследований, можно прийти к закономерному выводу, что комплексное изучение динамики маркеров апоптоза, пролиферации и миграции клеток, а также дисфункции эндотелия у пациентов с ОААНК в различные сроки послеоперационного периода позволит расширить представления о механизмах развития рестеноза и прогрессирования атеросклероза зоны реконструкции. А поиск новых фармакологических путей в лечении пациентов с ОААНК, базирующийся на коррекции маркеров системы апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия является актуальным и перспективным направлением в сосудистой хирургии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Диссертационное исследование проводилось на базе кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России в период с 2018 по 2022 г. Одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол № 7 от 03.03.2020) и зарегистрировано на платформе Clinicaltrials.gov, идентификатор NCT04502849. Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации по теме «Комплексная оценка показателей апоптоза, пролиферации клеток и эндотелиальной дисфункции и способ их коррекции у пациентов с атеросклерозом периферических артерий», №МК-1214.2022.3. По дизайну исследование организовано как открытое, проспективное с параллельными группами пациентов.

В исследование включено 282 пациента с ОААНК IIБ-III стадией заболевания согласно классификации А.В. Покровского-Фонтейна и 20 здоровых добровольцев, без артериальной патологии нижних конечностей (по данным дуплексного сканирования (ДС)).

Все пациенты проходили обследование и подвергались лечению в отделении сосудистой хирургии ГБУ РО «Областная клиническая больница» г. Рязани. Средний возраст пациентов с ОААНК составил 65 [60; 71] лет. Количество мужчин составило 238 (84,4%), женщин 44 (15,6%). Средний возраст здоровых добровольцев 64 [59; 70]. Количество мужчин составило 12 (60%).

Критерии включения в исследование: мужчины или женщины старше 40 лет; наличие заболевания магистральных артерий атеросклеротического генеза.

Критерии исключения: хроническая ишемия нижних конечностей другой этиологии (болезнь Бюргера, аортоартериит и т. д.), активный рак или период ремиссии менее 5 лет; сахарный диабет; беременность или кормление грудью у женщин, отказ пациентов от участия в исследовании.

В зависимости от типа проведения реконструктивно-восстановительных вмешательств на артериях нижних конечностей и получаемой терапии все пациенты были разделены на следующие группы (Рисунок 4).

Группа А: 30 пациентов, которым была проведена консервативная терапия.

Группа В-Д: по 45 пациентов, которым было выполнено эндоваскулярное (В), гибридное (С), открытое (Д) вмешательство на артериях аорто-бедренного и бедренно-подколенного сегментов.

Группа Е: 39 пациентов, которым за неделю до эндоваскулярного вмешательства и в течение 1 недели после операции был назначен прием препарата витамина Е в дозе 400 МЕ 1 раз в сутки в сочетании с препаратом «Актовегин»® в дозе 1200 мг 1 раз в день внутривенно капельно в течение 7 дней после операции, начиная с интраоперационного введения препарата.

Группа F: 39 пациентов, которым за неделю до гибридного вмешательства и в течение 1 недели после операции был назначен прием препарата витамина Е в дозе 400 МЕ 1 раз в сутки в сочетании с препаратом «Актовегин»® в дозе 1200 мг 1 раз в день внутривенно капельно в течение 7 дней после операции, начиная с интраоперационного введения препарата.

Группа G: 39 пациентов, которым за неделю до открытого вмешательства и в течение 1 недели после операции был назначен прием препарата витамина Е в дозе 400 МЕ 1 раз в сутки в сочетании с препаратом «Актовегин»® в дозе 1200 мг 1 раз в день внутривенно капельно в течение 7 дней после операции, начиная с интраоперационного введения препарата.

Сопоставимость исследуемых групп гарантируется по следующим признакам: возрасту, гендерному составу, сопутствующей патологии, клинико-лабораторным параметрам, $p > 0,05$. Характеристика пациентов исследуемых групп представлена в таблице 1.

Решение по выбору хирургического метода лечения принималось командой, состоящей из сосудистого хирурга, рентгенэндоваскулярного хирурга и кардиолога, исходя из индивидуальных анатомофизиологических особенностей пациентов, данных лабораторных и инструментальных методов исследования.

Таблица 1 - Клиническая характеристика пациентов исследуемых групп

Показатели	Эндоваскулярное вмешательство		p	Гибридное вмешательство		p	Открытое вмешательство		p	Консервативная терапия Группа А
	Группа В	Группа Е		Группа С	Группа F		Группа D	Группа G		
Возраст, годы	63 [59,5; 69]	68 [63; 72,5]	0,678	63 [60; 69]	63 [60; 69]	0,932	65 [61; 69]	65,5 [59,2; 69]	0,767	66 [62; 71]
Мужчины, n (%)	38 (84%)	31 (79,5%)	0,453	36 (80%)	30 (76%)	0,675	42 (93%)	29 (74%)	0,534	27 (90%)
Стадия хронической ишемии нижних конечностей										
ИБ ст., n (%)	20 (44%)	18 (46%)	0,892	19 (42%)	14 (36%)	0,754	21 (46%)	17 (43%)	0,678	17 (56%)
III ст., n (%)	25 (56%)	21 (54%)	0,675	26 (58%)	25 (64%)	0,862	24 (54%)	22 (57%)	0,789	13 (44%)
Уровень поражения										
Подвздошно-бедренная окклюзия	18 (40%)	13 (33,3%)	0,433	х	х	х	9 (20%)	13 (33,3%)	0,863	10 (33,3%)
Бедренно-подколенная окклюзия	14 (31,2%)	13 (33,3%)	0,545	х	х	х	21 (46,6%)	17 (43,5%)	0,678	11 (37%)
Подколенно-берцовая окклюзия	11 (24,4%)	11 (28,3%)	0,932	х	х	х	10 (22,2%)	8 (20,6%)	0,789	7 (23,4%)
Многоуровневое поражение	2 (4,4%)	2 (5,1%)	0,945	45 (100%)	39 (100%)	0,675	5 (11,2%)	1 (2,6%)	0,456	1 (3,3%)
Сопутствующие заболевания										
Ишемическая болезнь сердца, n (%)	7 (16%)	9 (23%)	0,673	13 (28,8%)	13 (33%)	0,921	9 (20%)	11 (28%)	0,784	8 (2%)
Артериальная гипертензия, n (%)	17 (38%)	18 (46%)	0,821	21 (47%)	22 (56%)	0,873	19 (42%)	20 (51%)	0,832	12 (40%)
Инфаркт в анамнезе, n (%)	4 (9%)	5 (13%)	0,920	6 (13%)	7 (17,9%)	0,743	4 (9%)	6 (15%)	0,678	3 (10%)
Обструктивная болезнь легких, n (%)	11 (24%)	10 (26%)	0,673	13 (29%)	16 (41%)	0,672	14 (31%)	13 (33%)	0,897	13 (43%)
Инсульт в анамнезе, n (%)	3 (7%)	4 (10%)	0,784	3 (7%)	3 (8%)	0,978	2 (4%)	2 (5%)	0,931	1 (3%)

Оценку периферического русла производили с помощью шкалы оценки периферического сопротивления, разработанной R. Rutherford. Виды проведенных оперативных вмешательств на артериях нижних конечностей представлены в таблицах 2-4.

Таблица 2 - Виды хирургического вмешательства у пациентов групп В и Е

Группа В	Группа Е
Эндоваскулярная реканализация с баллонной ангиопластикой артерий подвздошного сегмента	
6 (13,5%)	3 (7,7%)
Реканализация и стентирование артерий подвздошного сегмента	
12 (26,7%)	10 (25,7%)
Баллонная ангиопластика/стентирование подвздошного сегмента и ангиопластика поверхностной бедренной артерии	
2 (4,4%)	2 (5,1%)
Баллонная ангиопластика поверхностной бедренной артерии и подколенной артерии	
12 (26,6%)	11 (28,2%)
Баллонная ангиопластика поверхностной бедренной артерии	
11 (24,4%)	11 (28,2%)
Стентирование поверхностной бедренной артерии	
2 (4,4%)	2 (5,1%)

Таблица 3 - Виды хирургического лечения у пациентов групп С и F

Группа С	Группа F
Стентирование подвздошного сегмента и бедренно-подколенного шунтирования выше щели коленного сустава синтетическим протезом	
17 (37,7%)	13 (33,3%)
Стентирование подвздошного сегмента и бедренно-подколенного шунтирования выше щели коленного сустава аутовеной	
9 (20%)	4 (10,3%)
Стентирование подвздошного сегмента и эндартерэктомия из бедренных артерий с аутовенозной/аллопластикой	
9 (20%)	10 (25,6%)
Стентирование подвздошного сегмента и перекрестное бедренно-бедренное шунтирование	
2 (4,5%)	3 (7,7%)
Бедренно-подколенное шунтирование и ангиопластика артерий подколенно-берцового сегмента	
4 (8,9%)	5 (12,9%)
Эндартерэктомия из бедренных артерий с ангиопластикой поверхностной бедренной и подколенной артерией	
4 (8,9%)	4 (10,2%)

Таблица 4 - Виды хирургического вмешательства у пациентов групп D и G

Группа D	Группа G
Бифуркационное аорто-бедренное шунтирование	
6 (13,3%)	10 (25,6%)
Бифуркационное аорто-бедренное шунтирование совместно с бедренно-подколенным шунтированием	
4 (8,9%)	1 (2,6%)
Подвздошно-бедренное шунтирование	
2 (4,4%)	2 (5,1%)
Бедренно-подколенное шунтирование/протезирование выше щели коленного сустава синтетическим протезом	
14 (31,1%)	9 (23,1%)
Бедренно-подколенное шунтирование выше щели коленного сустава с помощью аутовены	
7 (15,7%)	8 (20,4%)
Бедренно-подколенное шунтирование ниже щели коленного сустава с помощью аутовены	
6 (13,3%)	5 (12,9%)
Бедренно-подколенное шунтирование/протезирование ниже щели коленного сустава с помощью синтетического протеза	
4 (8,9%)	3 (7,7%)
Перекрестное бедренно-бедренное шунтирование и бедренно-подколенное шунтирование	
1 (2,2%)	-
Перекрестное бедренно-бедренное шунтирование	
1 (2,2%)	1 (2,6%)

Всем больным проводились традиционные методы клинической лабораторной и инструментальной диагностики (общий и биохимический анализ крови, общий анализ мочи, коагулограмма, ЭКГ, при необходимости ультразвуковое исследование сердца, органов брюшной полости и фиброгастродуоденоскопия). При поступлении пациентов в отделение сосудистой хирургии с целью выявления локализации поражения и определения дальнейшей тактики ведения, проводилось выполнение аортоартериографии нижних конечностей на аппарате Philips «Integris 5000» и Siemens SOMATOM Emotion 6 в соответствии с практикой ведения пациентов принятой в сосудистой хирургии.

Согласно дизайну исследования (Таблица 5), пациентам групп В-D и Е-G в сроки поступления в стационар, непосредственно до операции, в первые часы, 1, 7, 14, 21, 30 сутки после операции производился забор периферической крови для определения количества маркеров апоптоза (Bcl-2, Вах, sFas), пролиферации

клеток (PDGF BB, VEGF A165), дисфункции эндотелия (NO). У пациентов группы А эти показатели были оценены только при включении в исследование.

Определение количества белков Вах, Bcl-2, PDGF BB, sFas, VEGF A165 в сыворотке крови производилось с помощью иммуноферментного анализа коммерческими наборами. Количество белка Bcl-2 Associated X Protein (BAX) – с помощью набора «Cloud-Clone Corporation» (Китай), sFas, Bcl-2, PDGF BB, VEGF A165 с использованием коммерческих наборов «Invitrogen Thermo Fisher» (США) в соответствии с инструкциями производителя. Определение уровня NO в сыворотке крови производили фотоколориметрическим методом, оценивая развитие окраски в реакции диазотирования нитратом сульфаниламида, который входит в состав реактива Грисса. С помощью иммуноферментного анализатора Stat Fax 3200 («Awareness Technology, Inc.») при длине волны 540 нм определяли интенсивность окраски.

У пациентов групп С, D во время оперативного вмешательства проводился забор 3-х слоев артериальной стенки в области атеросклеротического поражения для приготовления гомогената сосудистой стенки и последующей количественной оценки показателей апоптоза (Bcl-2, Вах, p53, sFas) и пролиферации клеток (PDGF BB, VEGF A165). В случаях развития рестеноза зоны вмешательства, либо прогрессирования атеросклеротического поражения в отдаленном послеоперационном периоде в результате выполнения повторных артериальных реконструкций, интраоперационно забирался участок сосудистой стенки с рестенозом зоны реконструкции, либо с участком прогрессирования атеросклероза для последующей оценки вышеперечисленных показателей. Образцы измельчали и готовили гомогенат с помощью лизирующего буфера «Thermo Fisher Scientific» (США) и роторного высокоскоростного гомогенизатора DIAХ 900 («Heidolph», Германия) (насадка 6G), со скоростью 24000 об/мин в течение 60 секунд при температуре +2°C. Полученный гомогенат центрифугировали при 1000 g в течение 10 минут (t +2°C). В полученном супернатанте определяли количество протеина Bcl-2 Associated X Protein (BAX) – с помощью набора «Cloud-Clone Corporation» (Китай), количество маркеров p53,

Bcl-2, PDGF BB, VEGF A165, sFas определялся с помощью наборов «Invitrogen Thermo Fisher» (США) в соответствии с инструкциями производителей. Полученные показатели пересчитывали на содержание белка, которое оценивали по методу Бредфорда с помощью Coomassie Plus (Bradford) AssayKit («Thermo Fisher Scientific», США).

Общий период наблюдения за пациентами исследуемых групп составил 2 года. Пациенты всех исследуемых групп на контрольных визитах через 1, 6, 12, 18, 24 месяцев подвергались физикальному осмотру, ДС артерий нижних конечностей с целью оценки проходимости зоны реконструкций, измерения толщины неоинтимы в зоне проведенных реконструкций, выявления рестеноза зоны вмешательства и прогрессирования атеросклеротического поражения. Измерение лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ) производилось на контрольном визите через 2 года. Прогрессирование атеросклеротического поражения определялось как любое значимое увеличение степени стеноза, отличное от области реваскуляризации, либо выявление нового атеросклеротического поражения. За рестеноз зоны реконструкции принимался гемодинамически значимый стеноз $\geq 50\%$ именно в зоне ранее проведенного вмешательства.

В исследуемых оперативных группах были пациенты, у которых, диагностировалось сочетание рестеноза зоны реконструкции, а позднее - прогрессирование атеросклероза. В связи с тем, что таких пациентов наблюдалось менее 4-5% в каждой группе, то было решено отказаться от включения данных пациентов в исследование из-за невозможности последующей статистической обработки. Схематично исследование представлено в Таблице 5.

Ультразвуковое исследование сосудистой системы проводилось на аппарате экспертного класса Esaote MyLab Alpha. Использовался линейный датчик с частотой 3-12 МГц и конвексный датчик с частотой 3-5 МГц. Линейный датчик использовался для исследования общей бедренной артерии (ОБА), ПБА, устья глубокой артерии бедра (ГАБ), подколенной артерии (ПКА), передней большеберцовой артерии (ПББА), задней большеберцовой артерии (ЗББА), межберцовой артерии (МБА). В исследованиях применялись: серошкальный В –

режим, режим цветового доплеровского картирования, режим спектральной доплерографии, X-flow.

Таблица 5 - Дизайн исследования

Виды обследования	Сроки контрольных визитов пациентов			
	<u>V1</u> Начало исследования	<u>V2</u> Интраоперационный забор материала	<u>V3</u> Первые часы, 1, 7, 14, 21, 30 сутки после операции	<u>V5</u> Через 6, 12, 18, 24 месяцев после операции
Информирование согласие	x	-	-	-
Сбор анамнеза	x	-	-	-
Физикальное обследование	x	-	x	x
Забор периферической крови для определения количества Bcl-2, Вах, sFas, PDGF BB, VEGF A165, NO).	x	-	x (для оперативных групп)	-
Ангиография артерий нижних конечностей	x	-	-	-
Дуплексное сканирование артерий нижних конечностей	x	-	x (только на 1 месяц)	x
Забор интроперационного материала для определения количества Bcl-2, Вах, sFas, p53, PDFG BB, VEGF A165)**	-	x (для оперативных групп)	-	-
<ul style="list-style-type: none"> В случае развития прогрессирования атеросклероза/рестеноза зоны реконструкции и выполнения повторных реконструкций производился интраоперационной забор сосудистой стенки с зоной рестеноза и прогрессирования атеросклероза. 				

Для визуализации аорты и подвздошных артерий использовался конвексный датчик. Исследовались следующие гемодинамические параметры: пиковая систолическая скорость кровотока (V_{ps}), индекс периферического сопротивления (RI).



Рисунок 4 - Дизайн исследования

Статистический анализ данных проводился с использованием пакета программ SPSS Statistics 26,0 (IBM company, США) и Microsoft Excel 2016. В связи с отклонением от нормального распределения данных (использовался критерий Колмогорова-Смирнова, $p < 0,05$) для дальнейшего анализа были использованы непараметрические методы. В случае сравнения связанных выборок использовался многофакторный непараметрический дисперсионный анализ Фридмана для подтверждения оснований принятия гипотезы о наличии различий между всеми временными точками. Post-hoc тестом для парных сравнений выступил критерий Уилкоксона для связанных выборок с поправкой на множественные сравнения по Бонферрони. Гипотеза о наличии различий между группами проверялась с помощью рангового критерия Краскела-Уоллиса. Для сравнения двух независимых групп использовался критерий Манна-Уитни. Для определения силы связей между переменными использовался t - критерий ранговой корреляции Спирмена.

Метод бинарной логистической регрессии использовался для нахождения любых ассоциаций между значениями маркеров апоптоза, пролиферации, и эндотелиальной дисфункции и развитием либо рестеноза зоны реконструкции, либо прогрессирования атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде. Рос-анализ, использовался для нахождения точки cut-off, значения маркеров выше/ниже которые ассоциируются с риском вышеперечисленных осложнений.

Расчет минимального количества пациентов в каждую из групп исследования для выявления достоверных различий между показателями апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия проводился по формуле расчета минимального объема независимых выборок для количественных показателей. Формула расчета:

$$n_1 = \frac{\sigma_1^2 * t^2 + \sigma_2^2 * t^2}{(X_1 - X_2)^2} \quad (1)$$

$$n_2 = \frac{\sigma_2^2 * t^2}{(X_1 - X_2)^2 - \frac{\sigma_1^2 * t^2}{n_1}} \quad (2)$$

где t^2 - критическое значение критерия Стьюдента при соответствующем уровне значимости, σ - стандартное отклонение изучаемого в исследовании признака в каждой группе, X - среднее арифметическое признака, который будет изучаться в каждой группе, n_1 - выборка размер для группы 1, n_2 - размер выборки для группы 2.

Критический уровень статистической значимости составляет $p < 0,05$. Мощность исследования $\beta = 0,8$. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала (Ме [Q1-Q3]).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данном разделе освещены результаты оценки количества маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия и способа их коррекции у пациентов с ОААНК после оперативных вмешательств на артериях нижних конечностей. Также в данной главе показаны результаты исследования вышеуказанных маркеров непосредственно в сосудистой стенке в области атеросклеротического поражения; рестеноза зоны реконструкции и прогрессирования атеросклеротического поражения у пациентов с ОААНК.

3.1. Показатели апоптоза, пролиферации клеток непосредственно в сосудистой стенке в области атеросклеротического поражения

Мы провели изучение значений маркеров апоптоза и пролиферации клеток непосредственно в артериальной стенке, в области атеросклеротического поражения, полученных во время выполнения открытых и гибридных вмешательств у пациентов с ОААНК. Количество полученных образцов - 30. Были получены следующие результаты. Количество проапоптотического белка Вах в артериальной стенке в области атеросклеротической бляшки у пациентов с ОААНК ($p < 0,001$) было повышено на 47% по сравнению с его значением в контрольных образцах. Из маркеров апоптоза также был повышен уровень белка p53 при сниженном количестве ингибитора рецепторного пути апоптоза sFas в образцах сосудистой стенки с атеросклеротическим поражением на 55% ($p = 0,04$) и 45% ($p < 0,001$) соответственно, по сравнению с их значениями в контрольных образцах.

На фоне роста значений проапоптотических маркеров, показатели пролиферации и миграции клеток PDGF BB и VEGF A165 были увеличены в 1,9 и 1,7 раза в образцах с атеросклеротической бляшкой ($p < 0,01$) (Таблица 6).

В результате проведения корреляционного анализа между исследуемыми биомаркерами в артериальной стенке в зоне атеросклеротической бляшки у пациентов с ОААНК была выявлена обратная взаимосвязь между маркером sFas и

проапоптотическим маркером Вах ($r=-0,938$, $p<0,001$). При этом маркеры VEGF A165 и PDGF BB ($r=+0,561$, $p<0,001$) прямо коррелировали между собой.

Таблица 6 - Сравнение значений, изучаемых биомаркеров в атеросклеротической бляшке и в нормальной артериальной стенке

Показатели Ме [Q1-Q3]	p53 (ед/мг белка)	PDGF BB (нг/мг белка)	Bcl-2 (нг/мг белка)	Вах (нг/мг белка)	sFas (нг/мг белка)	VEGF A 165 (нг/мг белка)
Образцы с нормальной артериальной стенкой	0,19 [0,1; 0,2]	0,09 [0,07; 0,1]	1,0 [0,9; 1,2]	4,8 [3,8; 6,3]	0,3 [0,24; 0,39]	8,1 [6,8; 9,3]
Образцы сосудистой стенки с атеросклеротической бляшкой	0,29* [0,2; 0,3]	0,18* [0,1; 0,3]	0,9 [0,64; 1]	7,1* [6,5; 7,6]	0,17* [0,1; 0,2]	14,5* [12; 18]
*-статистически значимая разница, $p<0,05$						

Результаты нашей работы показали, что все изученные биомаркеры системы апоптоза и клеточной пролиферации выявляются в интактной артериальной стенке. Это может быть связано с тем, что в норме клетки сосудистой стенки подвергаются апоптотической гибели, что дает возможность удаления поврежденных клеток без развития воспалительных реакций. В этом случае, естественная гибель клеток компенсируется митогенезом новых клеток, находящимся под контролем факторов роста.

При атеросклеротическом поражении сосудистой стенки были повышены все проапоптотические маркеры двух путей апоптоза, а именно Вах, p53, при сниженном уровне ингибитора рецепторного пути апоптоза sFas. Имеется ряд зарубежных исследований, рассматривающих провоспалительные интерлейкины, окисленные липопротеиды, гипоксию, окислительный стресс с позиции триггеров клеточного апоптоза в атеросклеротической бляшке [74, 112].

В нашем исследовании, помимо увеличения количества маркеров апоптоза, также было обнаружено увеличение значений маркеров PDGF BB и VEGF A165. Совместное присутствие факторов роста (PDGF BB и VEGF A165) и маркеров гибели клеток в атеросклеротической бляшке можно объяснить следующим образом: два процесса, а именно апоптоз и пролиферация, взаимосвязаны и

регулируют друг друга. М.М. Kavurma (2019) в своей статье отмечает, что при атерогенезе апоптотическая гибель клеток в сосудистой стенке уравнивается соседними фагоцитами (процесс эффероцитоза) с высоким клиренсом мертвых клеток, что ограничивает распространение поражения при сохранении его целостности [167].

Не менее важным пунктом исследования является анализ соответствий и взаимосвязей между показателями апоптоза и пролиферации клеток непосредственно в сыворотке и в стенке сосуда в области атеросклеротического поражения. В процессе сопоставления исходных значений путем применения коэффициента корреляции Спирмена было выявлено взаимосвязи между значениями маркеров Bcl-2 ($r=+0,709$, DI: 0,395; 0,885, $p<0,01$) и Bax ($r=+0,714$, DI: 0,441; 0,862, $p<0,01$) в стенке сосуда и в сыворотке крови (Рисунки 5, 6). Основываясь на обнаруженной связи между уровнями маркеров в сосудистой стенке и в сыворотке крови, была рассмотрена возможность экстраполяции значений маркеров в сыворотке крови на значения тех же маркеров в сосудистой стенке в области атеросклеротического поражения. Методика предполагала использование однофакторной гиперболической регрессионной функции.

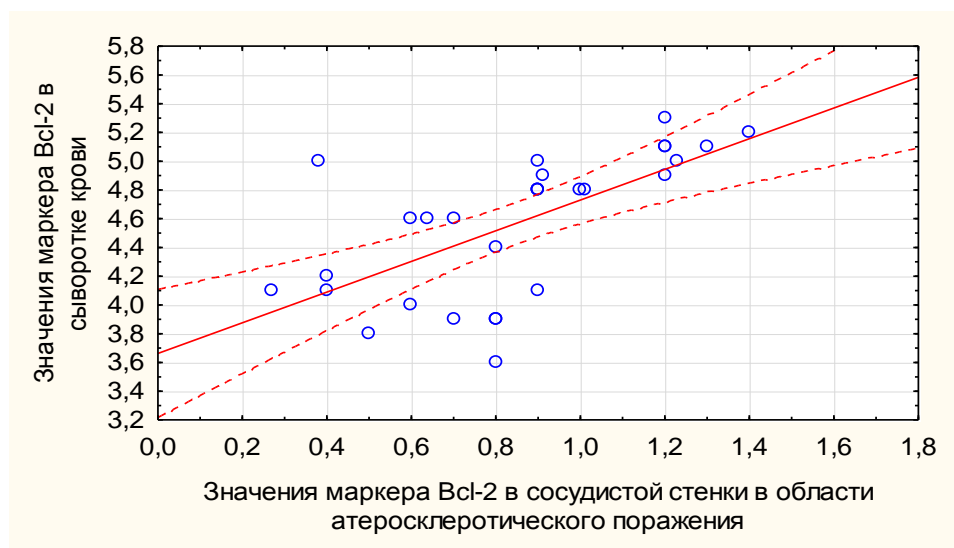


Рисунок 5 – Корреляционная взаимосвязь между значениями маркера Bcl-2 в сыворотке крови и сосудистой стенке в области атеросклеротического поражения

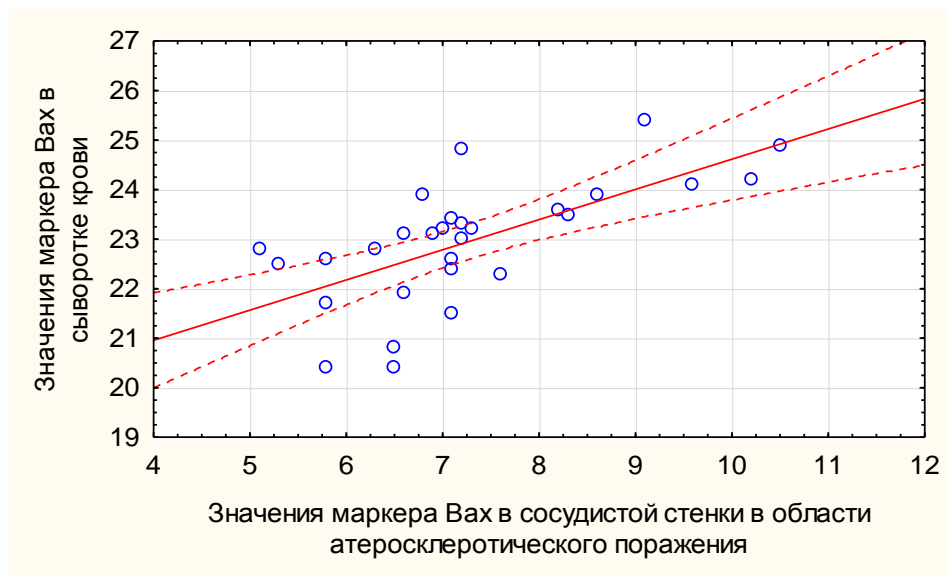


Рисунок 6 – Корреляционная взаимосвязь между значениями маркера Вах в сыворотке крови и сосудистой стенке в области атеросклеротического поражения

В итоге были получены две функции, с помощью которых можно, зная исходные значения Vcl-2 и Вах в сыворотке крови, получить значения белков Vcl-2 и Вах уже в сосудистой стенке.

$$y = 0,802 - 0,633*x + 0,224*x^2 - 0,015*x^3,$$

где: y - количество белка Vcl-2 в сосудистой стенке,

x - количество белка Vcl-2 в сыворотке крови.

$$k = 12,46 - 0,875*m + 0,025* m^2,$$

k - количество белка Вах в сосудистой стенке,

m - количество белка Вах в сыворотке крови.

3.1.1. Показатели апоптоза, пролиферации клеток непосредственно в сосудистой стенке в области прогрессирования атеросклеротического поражения

У 12 из 30 вышеупомянутых пациентов групп С и D, через 18 [17; 19] месяцев произошло прогрессирование атеросклеротического поражения, что вызвало необходимость проведения повторных реконструкций, во время выполнения которых забирался участок стенки сосуда с зоной прогрессирования атеросклероза. В текущих пробах отмечалось увеличение значений маркеров p53

в 2,1 раза ($p < 0,01$) и Вах в 1,9 раза ($p < 0,01$) по сравнению с его значениями в нормальной артериальной стенке. Количество маркеров пролиферации и миграции клеток сосудистой стенки PDGF BB и VEGF A165 было увеличено в 2,3 и 2 раза ($p < 0,01$) соответственно по сравнению с их значениями в нормальной стенке. Уровень ингибитора рецепторного пути апоптоза sFas был снижен в 4,6 раза ($p < 0,01$) (Таблица 7).

Таблица 7 - Сравнение значений, изучаемых биомаркеров в образцах сосудистой стенки при прогрессировании атеросклероза и норме

Показатели Me [Q1-Q3]	P53 (ед/мг белка)	PDGF BB (нг/мг белка)	Bcl-2 (нг/мг белка)	Вах (нг/мг белка)	sFas (нг/мг белка)	VEGF A 165 (пг/мг белка)
Образцы с нормальной артериальной стенкой	0,19 [0,17; 0,2]	0,09 [0,07; 0,1]	1,0 [0,9; 1,2]	4,8 [3,8; 6,3]	0,3 [0,2; 0,4]	8,1 [6,8; 9,3]
Образцы с прогрессированием атеросклероза	0,41* [0,4; 0,48]	0,21* [0,1; 0,29]	0,82 [0,7; 0,9]	9,3* [8,8; 10,3]	0,06* [0,05; 0,1]	16,5* [15; 18,5]
*-статистически значимая разница, $p < 0,05$						

При сравнении исходных значений биомаркеров в сосудистой стенке в зоне атеросклеротического поражения у больных с прогрессированием атеросклероза и у больных без этого осложнения были получены следующие отличия (Рисунки 7 и 8).

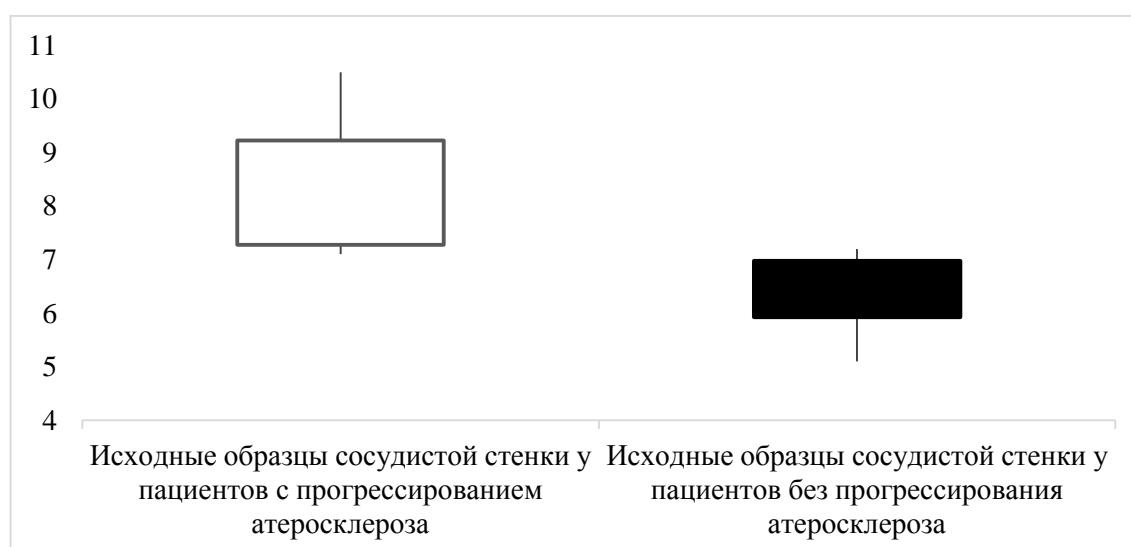


Рисунок 7 - Сравнение исходных значений маркера Вах в сосудистой стенке у пациентов с и без прогрессирования атеросклероза

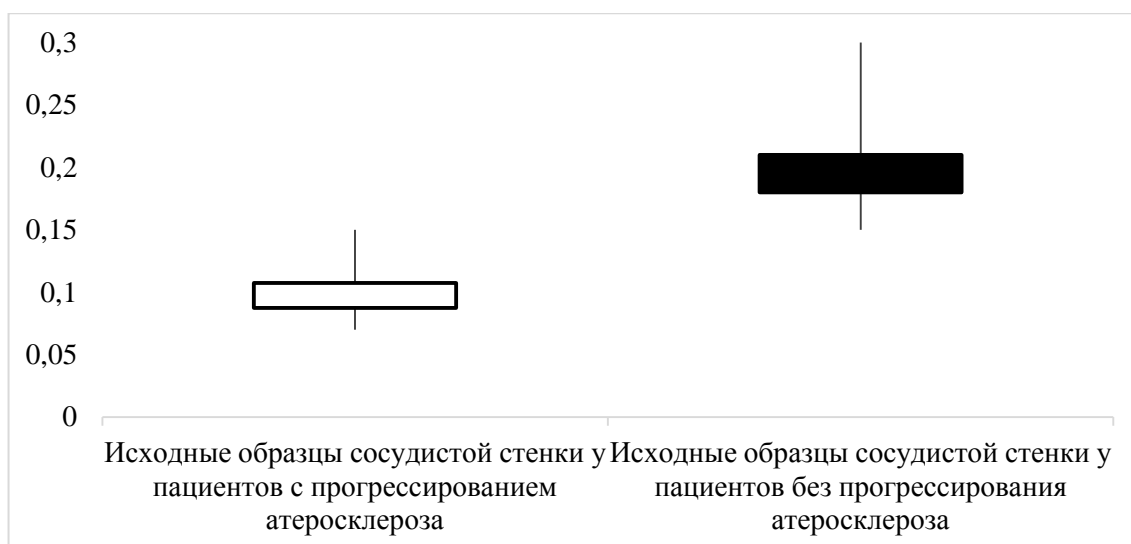


Рисунок 8 - Сравнение исходных значений маркера sFas в сосудистой стенке у пациентов с и без прогрессирования атеросклероза

Количество маркера Вах было увеличено в 1,3 раза, а уровень sFas снижен в 1,9 у больных с прогрессированием атеросклероза по сравнению с больными без этого осложнения ($p < 0,01$).

В последующим был проведен Roc-анализ для исходных значений маркеров апоптоза Вах и sFas, который позволил получить пороговые значения показателей для прогнозирования прогрессирования атеросклероза (Рисунок 9).

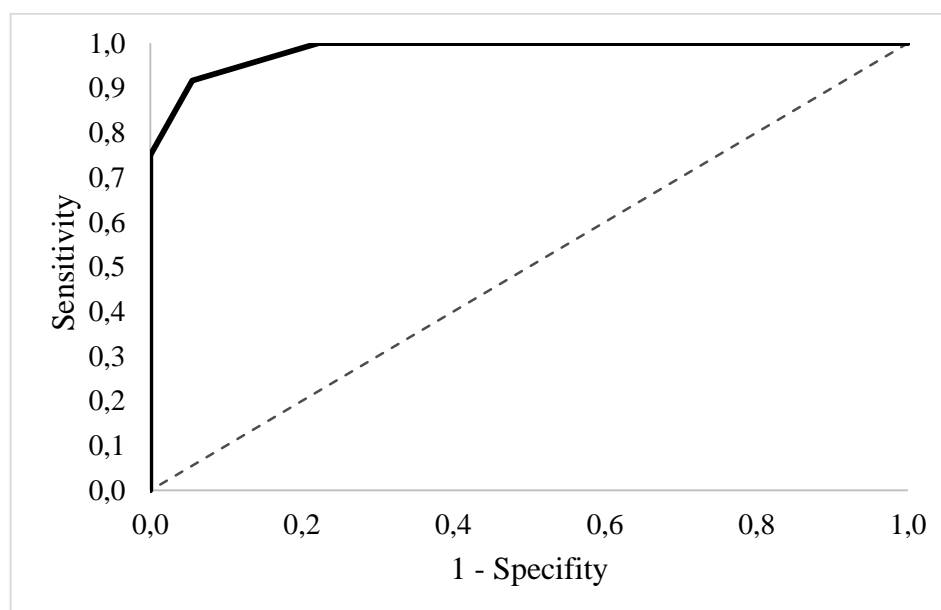


Рисунок 9 - Влияние исходных значений маркера Вах в сосудистой стенке в зоне атеросклеротического поражения на прогрессирование атеросклероза в послеоперационном периоде

Рос-анализ, выполненный для исходных значений маркера Вах в образцах артерий с атеросклеротическим поражением, показал, что прогностическое пороговое значение, которое ассоциируется с прогрессированием атеросклероза составляет $\geq 7,15$ нг/мг белка (AUC = 0,98, 95% DI:0,95–1; p=0,001). Чувствительность и специфичность метода составили 91,7% и 94,4% соответственно.

Для маркера sFas пороговое значение в точке отсечения, определенное с помощью индекса Юдена, составляет 0,14 нг/мг белка (AUC 1,0, 95% DI:0,98-1,0, p<0,001). Когда значение sFas в стенках сосудов в области атеросклеротической бляшки равно или ниже порогового значения, прогнозируется прогрессирование заболевания. Чувствительность и специфичность метода составляют 91,7% и 100% соответственно (Рисунок 10).

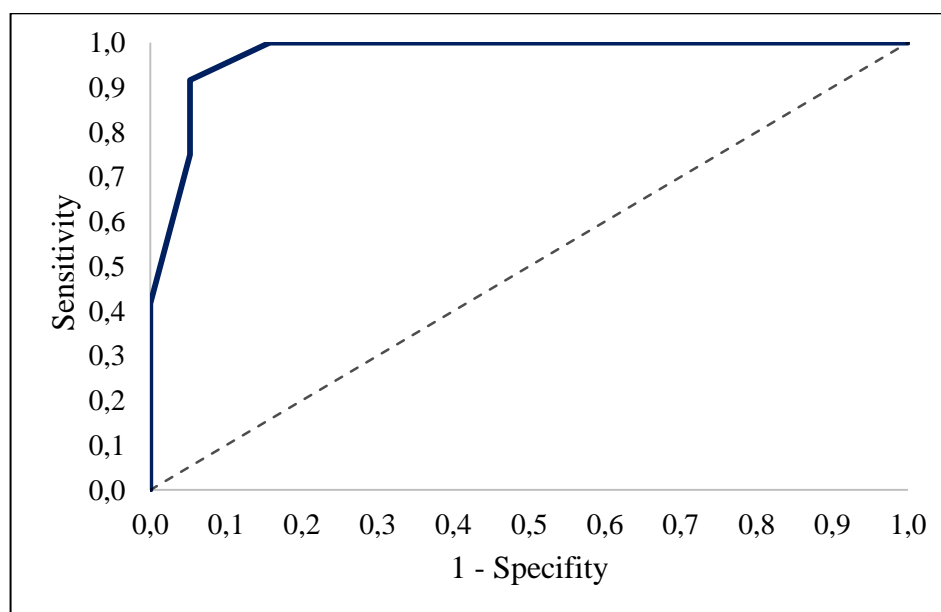


Рисунок 10 - Влияние исходных значений маркера sFas в сосудистой стенке в зоне атеросклеротического поражения на прогрессирование атеросклероза в послеоперационном периоде

Таким образом, нами было обнаружено, что именно повышенное количество маркеров митохондриального пути апоптоза Вах на фоне сниженного количества sFas обуславливало прогрессирование атеросклеротического поражения как на оперированной, так и на контралатеральной конечности.

Данное явление может быть обосновано тем, что повышенные в разы значения вышеупомянутых показателей вызывают смену типа гибели клеток с апоптоза на некроз. Это происходит в случае неэффективности процесса эффероцитоза, когда апоптотические клетки подвергаются вторичному некрозу с последующим развитием воспалительных реакций, что в свою очередь стимулирует соседние клетки сосудистой стенки к пролиферации и миграции с дальнейшей кальцификацией бляшки и прогрессированием атеросклероза [243].

3.1.2. Показатели апоптоза, пролиферации клеток в сосудистой стенке в области рестеноза после проведения артериальных реконструкций

В последующем мы продолжили изучение исследуемых биомаркеров, но уже в образцах артериальной стенки с зонами рестеноза, полученных при выполнении повторных операций. Количество исследуемых образцов составило 17. Значения белка p53 в образцах с рестенозом были ниже его количества в нормальной артериальной стенке в 3,2 раза ($p < 0,01$). При этом уровень PDGF BB в образцах с рестенозом превышал в 3,6 раза его количество в нормальной артериальной стенке ($p < 0,001$) (Таблица 8).

Таблица 8 - Сравнение значений, изучаемых биомаркеров в зоне рестеноза и в нормальной артериальной стенке

Показатели Me [Q1-Q3]	p53 (ед/мг белка)	PDGF BB (нг/мг белка)	Bcl-2 (нг/мг белка)	Bax (нг/мг белка)	sFas (нг/мг белка)	VEGF A 165 (пг/мг белка)
Образцы с нормальной артериальной стенкой	0,19 [0,17; 0,2]	0,09 [0,07; 0,12]	1,0 [0,9; 1,2]	4,8 [3,8; 6,3]	0,3 [0,2; 0,4]	8,1 [6,8; 9,3]
Образцы с рестенозом зоны артериальной реконструкции	0,06* [0,05; 0,07]	0,32* [0,28; 0,34]	1,6* [1,5; 1,8]	5,7 [5,1; 5,8]	0,51* [0,4; 0,6]	4,2* [3,4; 5,1]
*-статистически значимая разница, $p < 0,05$						

В зоне рестеноза количество антиапоптотического белка Bcl-2 было повышено на 60% ($p = 0,01$) по сравнению с их количеством в нормальной артериальной стенке. Количество ингибитора рецепторного пути апоптоза в

образцах с рестенозом было повышено на 70% по сравнению с его значением в нормальной артериальной стенке ($p=0,03$). При этом значения биомаркера VEGF A 165 ($p<0,01$) были в 1,9 раза снижены в образцах с рестенозом в сравнении с нормальной артериальной стенкой.

При проведении корреляционного анализа была выявлена взаимосвязь между маркерами в образцах с рестенозом зоны вмешательства:

а) Vcl-2 и PDGF BB ($r=+0,777$, $p=0,001$) (Рисунок 11);

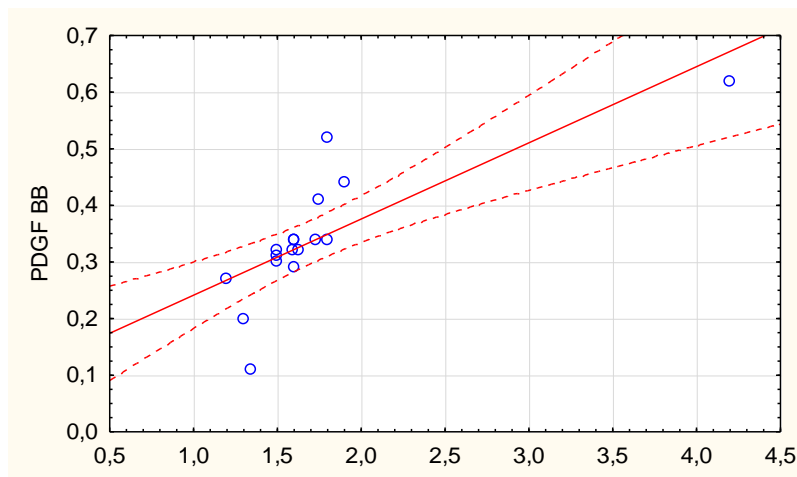


Рисунок 11 - Корреляционная взаимосвязь между значениями маркеров Vcl-2 и PDGF BB в области рестеноза зоны реконструкции

б) PDGF BB и p53 ($r=-0,901$, $p<0,001$) (Рисунок 12);

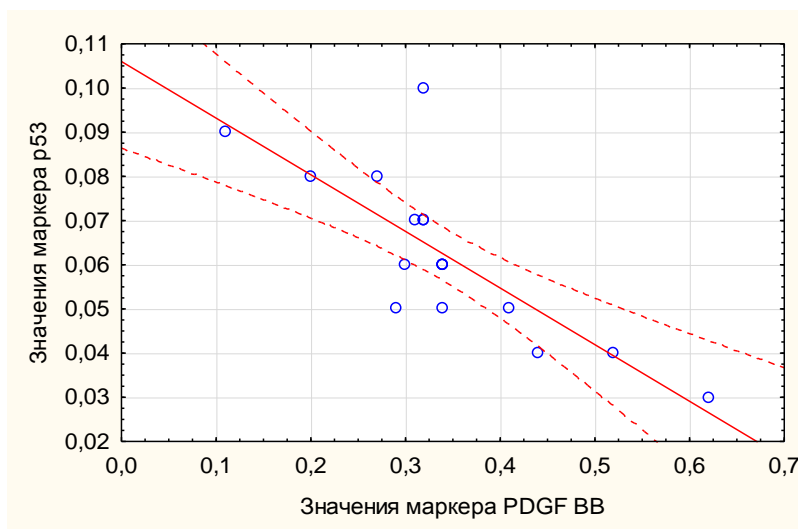


Рисунок 12 - Корреляционная взаимосвязь между значениями маркеров p53 и PDGF BB в области рестеноза зоны реконструкции

с) sFas и PDGF BB ($r=+0,545$, $p=0,001$) (Рисунок 13).

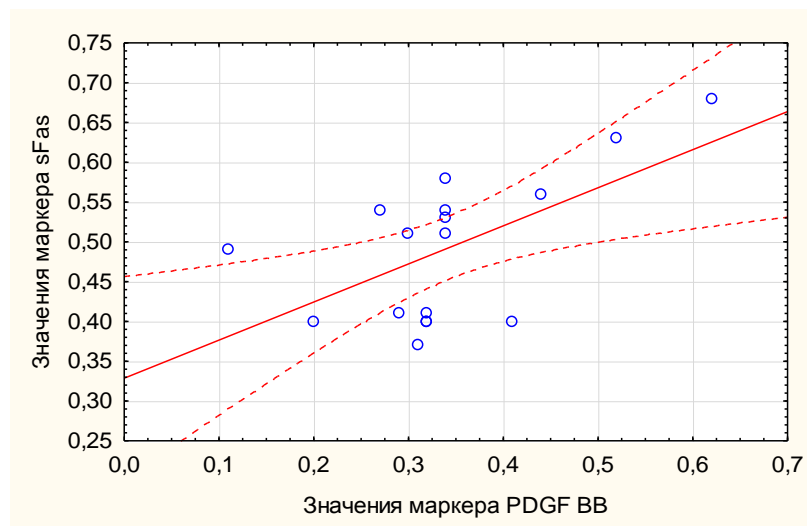


Рисунок 13 - Корреляционная взаимосвязь между значениями маркеров sFas и PDGF BB в области рестеноза зоны реконструкции

Анализ полученных результатов позволил сделать следующие выводы. Повышенный уровень биомаркера PDGF BB свидетельствует о высокой пролиферативной активности клеток в области рестеноза. Пролиферация клеток, образование и ремоделирование внеклеточного матрикса являются общепринятыми механизмами образования рестенозических повреждений [22, 69, 280]. Но механизмы, которые лежат в основе данного явления, до сих пор в мировой литературе до конца не определены. В свою очередь, мы обнаружили, что белок p53 в низких количествах не смог вызвать активацию апоптоза через белок Вах, и даже наоборот, за счет его контроля в регуляции клеточного цикла способствовал пролиферации клеток, усиливая митогенный эффект PDGF BB, что подтверждено проведенным корреляционным анализом. Остановка клеточного цикла, регуляция системы апоптоза, подавление пролиферации и миграции клеток являются основными точками приложения действия белка p53, что было доказано в различных научных работах. Наши данные согласуются с результатами экспериментальных исследований, в которых М. Sata (1998) продемонстрировал, что у мышей, имеющих дефицит белка p53, наблюдалась усиленная

пролиферация ГМК, приводящая к увеличению толщины НИ после выполнения ЧТБА на бедренных артериях [241].

Интересен тот факт, что в данных образцах мы обнаружили статистически значимое повышение количества антиапоптотического белка Bcl-2. В ранее проведенных исследованиях было отмечено, что клетки НИ менее чувствительны к апоптозу, чем клетки меди [157, 288]. Однако, механизм данного процесса был до конца не определен. Мы можем предположить, что именно повышенный уровень белка Bcl-2 защищает пролиферирующие клетки НИ от гибели, продлевая период их жизни (прямая корреляционная взаимосвязь между Bcl-2 и PDGF BB). С одной стороны, такое повышение количества белка Bcl-2 может быть обусловлено сменой фенотипа ГМК от сократительного к синтетическому после операционной травмы. С другой стороны, белок p53 осуществляет свое действие путем запуска апоптоза через семейство белков Bcl-2 (увеличивая соотношения Вах/Bcl-2). При этом пониженный его уровень мог способствовать повышению количества Bcl-2. В образцах с рестенозом, количество Вах было повышено, но статистически незначимо, поэтому он не смог уравновесить такой усиленный пролиферативный ответ, что и повлияло на развитие данного осложнения.

3.2. Маркеры системы апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы А

Всего в исследование было включено 30 пациентов с ОААНК со IIВ-III стадии заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна, которым проводилась консервативная терапия согласно Национальным клиническим рекомендациям.

У пациентов данной группы наблюдалось повышение значений маркеров PDGF BB, VEGF A165 и Вах, при снижении Bcl-2, sFas, NO по сравнению с их значениями у здоровых добровольцев. Уровень значимости различий составил ($p < 0,01$) (Таблица 9). Исходно повышенный уровень маркера PDGF BB у пациентов с ОААНК связан с его непосредственным участием в регуляции

митогенеза клеток сосудистой стенки, воспалительных реакциях и оксидативном стрессе и взаимосвязи с системой апоптоза [216]. Нужно понимать, что PDGF BB, необходим как для роста атеросклеротической бляшек, так и для стабилизации их покрышек [95]. Это обусловлено тем, что при атеросклеротическом поражении наблюдается повышенная адгезия тромбоцитов к клеткам сосудистой стенки с последующим синтезом таких молекул как PDGF BB, провоспалительных цитокинов, молекул адгезии, которые в свою очередь способствуют дальнейшему развитию атеросклеротического поражения.

Повышенное количество VEGF A165 может быть обусловлено тем, что при атеросклеротическом поражении сосудистой стенки создаются местные специфические условия (гипоксия, воспаление, окислительный стресс), индуцирующие выработку ангиогенных факторов, которые способствуют ангиогенезу из ранее существовавших *vasa vasorum*. Неоваскуляризация увеличивает локальный поток питательных веществ и кислорода, таким образом, способствуя росту и ремоделированию бляшек [56].

При сравнении исходных значений маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов групп А-Д достоверно значимых различий получено не было ($p > 0,05$).

Таблица 9 - Сравнение исходных значений исследуемых показателей у пациентов группы А со значениями здоровых добровольцев

Показатели, Me [Q1-Q3]	Vax (нг/мл)	Vcl-2 (нг/мл)	sFas (нг/мл)	PDGF BB (нг/мл)	NO (ммоль/л)	VEGF A 165 (пг/мл)
Здоровые добровольцы	15,1 [13,9; 15,7]	5,3 [4,7; 5,9]	1,1 [0,9; 1,2]	8,9 [8,3; 9,5]	340 [308; 377]	86 [67; 108]
Пациенты группы А	23,9 [22,8; 24,9]	4,5 [4,2; 4,9]	0,95 [0,9; 1]	12,4 [11; 14,6]	271 [249; 278]	336 [256; 427]
*-статистически значимая разница, $p < 0,05$						

При проведении корреляционного анализа была обнаружена прямая взаимосвязь между маркерами Vcl-2 и NO ($r = +0,506$, $p = 0,001$), Vax и уровнем холестерина ($r = +0,62$, $p < 0,01$) и обратная между NO и PDGF BB ($r = -0,535$,

$p < 0,01$), Bcl-2 и Вах ($r = -0,469$, $p = 0,01$), Вах и sFas ($r = -0,648$, $p = 0,01$), sFas и уровнем холестерина ($r = -0,709$, $p < 0,01$).

Выявленные линейные коэффициенты корреляции между изучаемыми показателями апоптоза, пролиферации и дисфункции эндотелия у пациентов консервативной группы подтверждают гипотезу о том, что антиапоптотические маркеры выполняют функцию защиты клеток сосудистой стенки от гибели, способствуя выработке эндотелием защитного фактора NO. Тот, в свою очередь, оказывает воздействие на маркер, отвечающий за пролиферацию клеток сосудистой стенки - PDGF BB, что приводит к уменьшению его значений. Помимо этого, нам удалось установить непосредственную антагонистическую связь между маркерами митохондриального пути апоптоза - Bcl-2 и Вах, а также между биомаркерами двух путей апоптоза.

У 6 (20%) пациентов группы А через 17 [16; 18] месяцев после включения в исследование произошло прогрессирование атеросклероза, подтвержденный данными ДС артерий нижних конечностей. Данные пациенты были госпитализированы в отделение сосудистой хирургии для дальнейшей дообследования и решения вопроса об оперативном лечении.

При сопоставлении исходных значений вышеуказанных пациентов со значениями остальных пациентов группы А были получены следующие результаты. Значения маркера Вах были повышены на фоне сниженных значений показателей sFas, NO ($p < 0,05$) у пациентов с прогрессированием атеросклеротического поражения (Таблица 10).

Таблица 10 - Сравнение значений исследуемых показателей у пациентов группы А с прогрессированием и без прогрессирования атеросклероза

Показатели, Ме [Q1-Q3]	Вах (нг/мл)	Bcl-2 (нг/мл)	sFas (нг/мл)	PDGF BB (нг/мл)	NO (ммоль/л)	VEGF A 165 (пг/мл)
Пациенты без прогрессирования атеросклероза	23,5 [22,7; 24,5]	4,7 [4,3; 4,9]	0,97 [0,94; 1,0]	11,9 [11; 13,9]	276 [262; 284]	305 [240; 432]
Пациенты с прогрессированием атеросклероза	25,9* [25,5; 26,1]	4,1 [3,6; 4,4]	0,86* [0,8; 0,9]	14,2 [11,6; 14,8]	232* [196; 255]	352 [327; 391]
*-статистически значимая разница, $p < 0,05$						

При проведении корреляционного анализа были выявлены взаимосвязи между значениями маркеров апоптоза и дисфункции эндотелия, а именно sFas и NO ($r=+0,98$, $p<0,01$), Вах и NO ($r=-0,94$, $p<0,01$) у пациентов с прогрессированием атеросклероза. Усиленная активация двух путей апоптоза ведет к значительной гибели клеток эндотелия и его дисфункции, которая выражается в снижении синтеза вырабатываемых эндотелием медиаторов, а именно метаболитов NO.

Несмотря, на интенсивное изучение маркеров апоптоза, их количественное значение и роль в прогрессировании атеросклероза остается до конца не исследованной. Прогрессирование атеросклероза представляет собой сложный, многоэтапный процесс. Рост атеросклеротических бляшек характеризуется повторяющимися циклами бессимптомного разрыва фиброзных покрышек атеросклеротических бляшек с последующим восстановлением их целостности.

Наши результаты предполагают, что исследуемые биомаркеры апоптоза и пролиферации клеток могут секретироваться ЭК и выступать сигнальными молекулами, свидетельствующими о повреждении клеток сосудистой стенки при атеросклерозе. Последствием апоптоза ГМК в фиброзной капсуле является ее истончение и расширение непосредственно некротического ядра.

Сами апоптотические клетки вызывают локальное высвобождение MCP-1 и интерлейкина-6, что приводит как к рекрутированию, так и к активации макрофагов в области запуска системы апоптоза. Активация маркеров воспаления дополнительно ослабляет фиброзную покрышку бляшки, за счет секреции матриксных металлопротеиназ, что ведет в последующем к развитию тромботических осложнений [89].

Исходя из вышеизложенного, мы предполагаем, что воздействие на систему апоптоза клеток сосудистой стенки, может быть использовано в качестве нового и перспективного терапевтического подхода в лечении атеросклероза.

3.3. Исследование динамика маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы В и их роли в развитии отдаленных послеоперационных осложнений

В результате предварительных расчетов, минимальный объем группы В должен составлять - 31 пациент для получения достоверно значимых различий в сравниваемых подгруппах ($p < 0,05$, $\beta > 0,8$).

Значения PDGF BB, VEGFA 165 и Вах у пациентов группы В были исходно повышены, при том, что количество sFas, Vcl-2 и NO были снижены по сравнению со значениями у здоровых добровольцев (Таблица 11) ($p < 0,01$).

Таблица 11 - Сравнение исходных значений, исследуемых показателей у пациентов группы В со здоровыми добровольцами

Показатели, Ме [Q1-Q3]	Вах (нг/мл)	Vcl-2 (нг/мл)	sFas (нг/мл)	PDGF BB (нг/мл)	NO (ммоль/л)	VEGF A 165 (пг/мл)
Здоровые добровольцы	15,1 [13,9; 15,7]	5,3 [4,8; 5,8]	1,1 [0,97; 1,2]	8,9 [8,3; 9,5]	340 [308; 377]	86 [66,5; 107,8]
Значения пациентов группы В	23,9* [22,4; 24,8]	4,2* [3,8; 4,8]	0,9 * [0,76; 1,09]	12,8* [11,3; 14,3]	247* [224; 257]	356* [299; 410]
*- статистически значимая разница, $p < 0,01$						

Помимо этого, нам удалось выявить, что у пациентов с III стадией заболевания исходные значения Vcl-2 были ниже в сравнении со значениями пациентов со IIВ стадией заболевания ($p = 0,04$). В результате проведенного корреляционного анализа была обнаружена прямая взаимосвязь между исходно повышенными уровнями холестерина с Вах ($r = +0,84$, $p < 0,001$) и PDGF BB ($r = +0,65$, $p < 0,01$), PDGF BB и Вах ($r = +0,558$, $p = 0,002$).

Исходя из полученных результатов был сделан следующий вывод: все пациенты с ОААНК со IIВ - III стадией заболевания исходно имели проапоптотический статус. Это может быть связано с тем, что в физиологических условиях апоптотические клетки быстро поглощаются фагоцитами и соседними клетками (эффероцитоз), не вызывая при этом развития воспалительной реакции. В случае с атеросклеротическим поражением, в индукции двух путей апоптоза принимают активное участие множество дополнительных факторов, таких как:

гипоксия, изменение скоростных характеристик кровотока, воспалительные медиаторы, оксидативный стресс [243]. Причем, чем выше стадия заболевания, тем больше происходит снижение количества антиапоптотических маркеров. Известно, что гипоксия запускает апоптоз путем повреждения митохондрий клетки, что ведет к выделению гбнущими клетками микровезикул с биоактивными молекулами, которые повреждают нормальные соседние клетки [293]. Так, F. Xiao et al. (2019) показали, что в условиях экспериментальной гипоксии наблюдается падение количества антиапоптотического белка Bcl-x1 и, как следствие, соотношения Bcl-x1/Bax [186].

Выявленные в ходе исследования статистически значимые зависимости явились доказательством того, что повышенный уровень холестерина в сыворотке крови является одним из триггеров апоптоза, причем как через рецепторный (путем снижения количества ингибитора данного пути - sFas), так и митохондриальный (регулируя соотношение белков Bax/Bcl-2) пути. Это обусловлено тем, что с одной стороны, повышенное количество холестерина при атеросклеротическом поражении нарушают функционирование клеточной мембраны и ее внутриклеточных компонентов за счет увеличения выработки АФК, что и ведет к дисбалансу между маркерами Bax и Bcl-2. С другой стороны, повышенное количество холестерина способствует увеличению экспрессии молекул адгезии и провоспалительных цитокинов к сосудистой стенке, тем самым способствуя запуску системы апоптоза.

После проведения эндоваскулярных вмешательств на артериях нижних конечностей удалось выявить следующую динамику изменения исследуемых маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия.

В первые часы наблюдалось повышение проапоптотического маркера Bax ($p < 0,01$) до пиковых значений при снижении количества маркера Bcl-2 ($p < 0,001$) и маркера пролиферации эндотелиальных клеток VEGF A165 ($p < 0,001$) в сравнении с исходными значениями. Нужно отметить, что при одномоментном выполнении многоуровневых реконструкций на артериях нижних конечностей наблюдалось достоверно значимое повышение значений маркеров Bax в первые часы после

операции по сравнению с его значениями у пациентов с одноуровневыми вмешательствами ($p < 0,001$) (Рисунки 14-16).

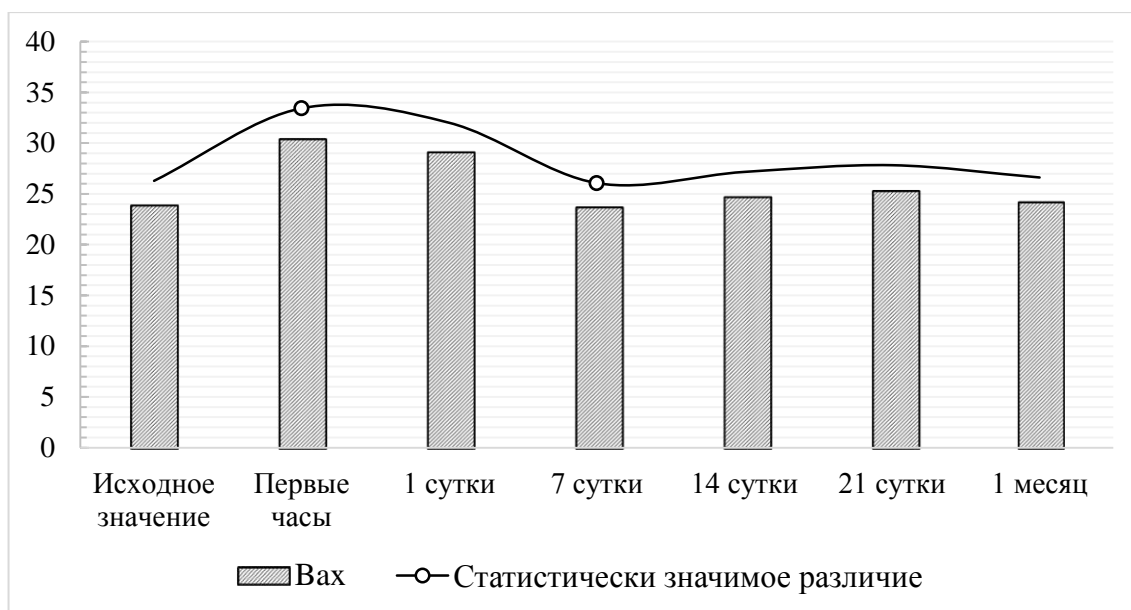


Рисунок 14 - Динамика изменений маркера Вах у пациентов группы В в послеоперационном периоде

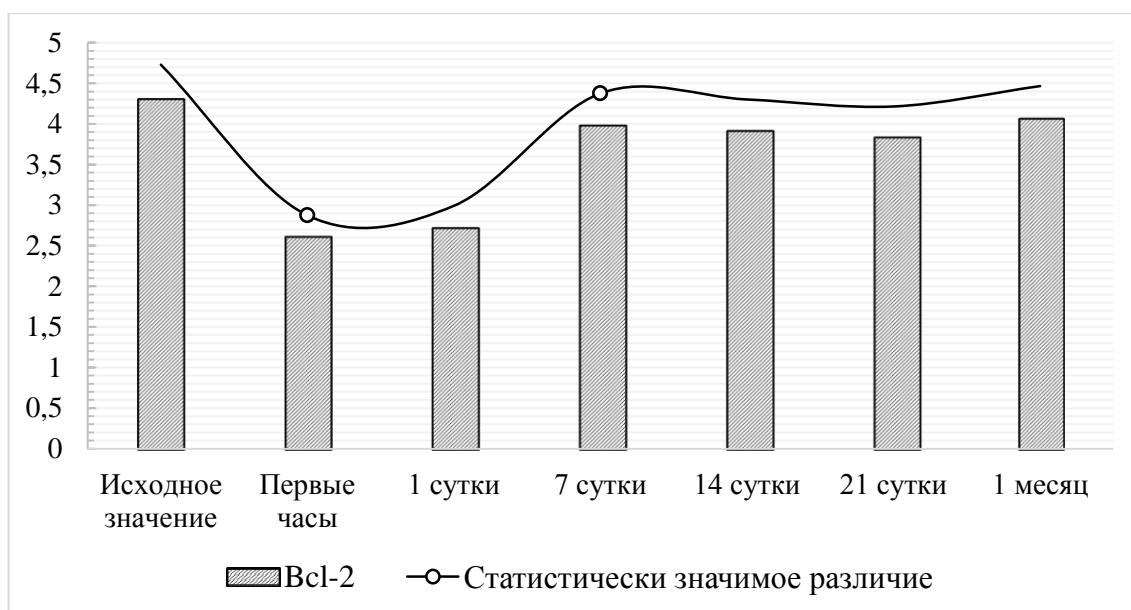


Рисунок 15 - Динамика изменения маркера Вс1-2 у пациентов группы В в послеоперационном периоде

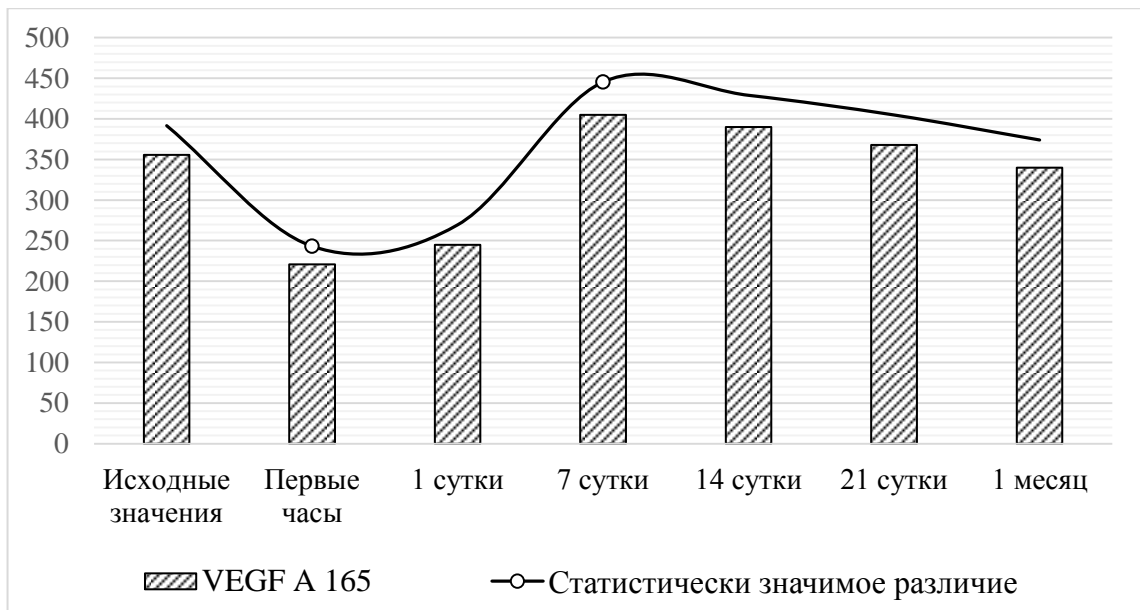


Рисунок 16 - Динамика изменения маркера VEGF A165 у пациентов группы В в послеоперационном периоде

Основываясь на результатах нашего исследования, можно прийти к закономерному выводу, что различные виды оперативных вмешательств на артериях нижних конечностей ведут к запуску системы апоптоза клеток сосудистой стенки путем активации маркеров двух путей апоптоза, протекающих в виде двух волн.

Первая волна представляет собой всплеск апоптоза с достижением пикового уровня белка Вах к первому часу после оперативных действий. Следует отметить, что в интервал первые часы - первые сутки после оперативного вмешательства запускается преимущественно митохондриальный путь, выражающийся в снижении антиапоптотического маркера апоптоза Bcl-2 и повышении проапоптотического маркера Вах. Это может быть обусловлено тем, что при выполнении эндартерэктомии или баллонной ангиопластики/стентировании артерий нижних конечностей происходит повреждение клеток всех слоев артериальной стенки. При этом преимущественно вырабатываются маркеры митохондриального пути, оказывающие воздействие на все клетки сосудистой стенки. Помимо непосредственно самой травмы сосудистой стенки, к активации системы апоптоза также могут приводить окислительный стресс,

провоспалительные цитокины, реперфузия, которые наиболее выражены в первые часы после операции.

Результаты нашей работы согласуются с результатами экспериментальных исследований на моделях животных. Суть экспериментов заключалась в выполнении ЧТБА на сонных артериях кроликов, что впоследствии приводило к индукции апоптоза ГМК меди с максимальной экспрессией маркеров апоптоза через 30 минут. Повреждение сосудистой стенки во время проведения ЧТБА, по мнению авторов, было связано с окислительным стрессом, о чем также свидетельствует снижение уровня глутатиона на 63% в течение 30 минут после травмы [228]. Н. Perlman et al. (1997), в свою очередь, продемонстрировали на образцах сосудистой стенки, взятых при выполнении эндартерэктомии, что активация системы апоптоза происходит через 1-2 часа после операции. Значительному апоптозу подвергаются клетки эндотелия и меди, в которых количество маркера Bcl-2 резко падает [120].

На 1-е сутки на фоне запуска митохондриального пути апоптоза произошло снижение количества маркера дисфункции эндотелия NO ($p < 0,001$) при повышении количества маркера пролиферации клеток сосудистой стенки PDGF BB ($p = 0,03$) по сравнению со значениями в первые часы (Рисунок 17).

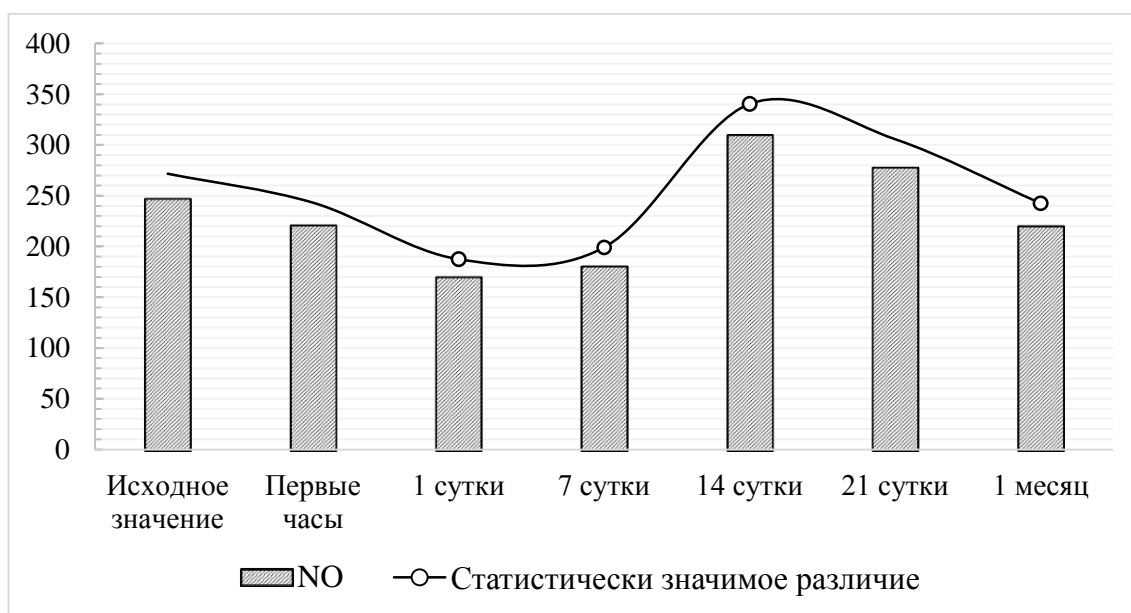


Рисунок 17 - Динамика изменений метаболитов оксида азота у пациентов группы В в послеоперационном периоде

Проведенный корреляционный анализ на 1-е сутки свидетельствует о наличии связи между Vcl-2 и NO ($r = +0,678$, $p < 0,01$).

Система апоптоза, находящаяся в активированном состоянии после операции, ведет к гибели эндотелиальных клеток и, следовательно, к уменьшению медиаторов, которые эти клетки вырабатывают, приводя к дисфункции эндотелия. Следствием апоптоза эндотелия является разрушение сосудистого барьера, в связи с чем, ГМК подвергаются воздействию непосредственного кровотока, усиливая адгезию и активацию тромбоцитов и воспалительных медиаторов в сосудистой стенке. В свою очередь воспалительные цитокины производят чрезмерное количество АФК, которые дополнительно индуцируют апоптоз и повреждение клеток стенки сосуда. Создается своеобразный порочный круг, так как АФК также стимулирует дополнительный приток хемоаттрактантов, нейтрофилов, молекул адгезии, что ведет к задержке эпителизации зоны оперативного вмешательства. Данный процесс в нашем исследовании сопровождался значительным снижением метаболитов NO к концу 1-х суток, что было подтверждено результатами проведенного корреляционного анализа. Также было отмечено снижение выработки эндотелием VEGF A165 в первые часы, когда активность системы апоптоза достигла своего пика. При этом биомаркер VEGF A165 действует как важный биологический барьер, защищая от адгезии тромбоцитов и моноцитов и подавляя пролиферацию ГМК.

На 7-е сутки максимальных значений достигли показатели PDGF BB ($p < 0,001$) и VEGF A 165 ($p < 0,001$). При этом количество маркеров системы апоптоза Вах снизилось ($p < 0,001$) при повышении маркера Vcl-2 ($p < 0,001$) и постепенном увеличении количества NO ($p = 0,03$). В вышеуказанный период времени выявлена корреляция между Vcl-2 и NO ($r = +0,51$, $p = 0,02$), VEGF A165 и NO ($r = +0,55$, $p = 0,02$), VEGF A165 и Vcl-2 ($r = +0,681$, $p < 0,001$) (Рисунок 18).

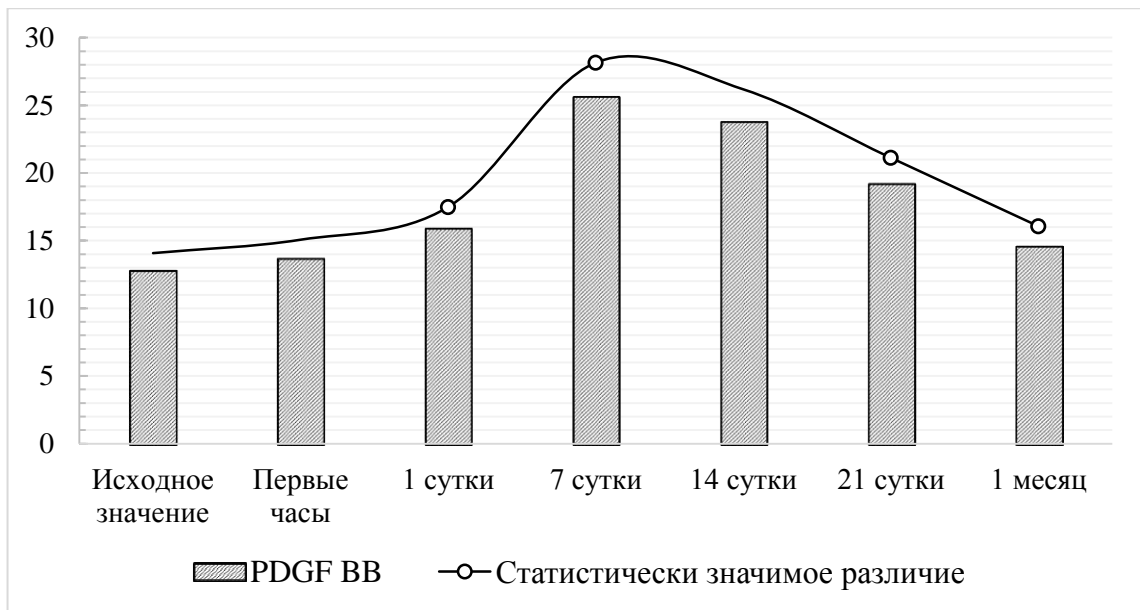


Рисунок 18 - Динамика изменения маркера PDGF BB у пациентов группы В в послеоперационном периоде

Следует отметить, что именно апоптоз как гомеостатический процесс, находясь в постоянной взаимосвязи с процессом клеточной пролиферации, помогает поддерживать клеточную массу и структуру ткани. Таким образом, ответная пролиферация и миграция соседних клеток компенсирует потерю клеток, вызванную первой волной апоптоза. Поэтому повышение PDGF BB на 7 сутки может быть связано с несколькими механизмами. Во-первых, в результате гибели клеток можно наблюдать потерю контактов между соседними клетками сосудистой стенки и, как следствие, апоптотические клетки сами начинают высвобождать цитокины, которые усиливают пролиферацию и миграцию соседних клеток при смене их фенотипа с сократительного на синтетический. В ряде последних исследований появляются доказательства, что в некоторых случаях каспазы могут осуществлять свои апоптотические и митогенные функции, одновременно вызывая разрушение одной клетки, индуцируя при этом пролиферацию соседних клеток - механизм, который может быть очень ценным для компенсации потери клеток [217]. Сам по себе апоптоз ведет к увеличению проницаемости эндотелиального монослоя и снижению ингибирующих сигналов пролиферации и миграции ГМК при увеличении экспрессии молекул клеточной

адгезии. Во-вторых, при низких концентрациях, NO не способен подавлять пролиферацию и миграцию клеток из меди в интиму. В-третьих, апоптотические клетки проявляют прокоагулянтные свойства, усиливающие ответную пролиферативную реакцию для преодоления клеточного дефицита. Нужно отметить, что сами ГМК продуцируют цитокины, которые привлекают и активируют лейкоциты, индуцируя при этом пролиферацию соседних ГМК, способствуя дисфункции эндотелия и выработки компонентов внеклеточного матрикса.

Мы также обнаружили, что, начиная с 7-х суток, происходило постепенное повышение количества NO приводящее к нормализации значений белка Vcl-2, и как следствие этого, ограничению гибели клеток сосудистой стенки в первую волну апоптоза.

К концу второй недели наибольших значений достигло количество NO ($p < 0,001$), которое в последующем привело к постепенному снижению значений sFas ($p < 0,001$) по сравнению с их значениями на 7-ые сутки, что подтверждено отрицательным коэффициентом корреляции для sFas и NO ($r = -0,526$, $p = 0,004$). Также с пониженным значением sFas был обратно взаимосвязан в этом период времени показатель PDGF BB ($r = -0,526$, $p < 0,001$).

Восстановление магистрального кровотока после оперативного вмешательства оказывает прямое воздействие как на маркеры, вырабатываемые эндотелием, так и на биомаркеры системы апоптоза и пролиферации клеток. Эндотелиальные клетки постоянно подвергаются воздействию целого ряда гемодинамических факторов, которые оказывают значительное влияние на их клеточную структуру и функции. Воздействие восстановленного ламинарного кровотока (подтвержденного данными цветового доплеровского картирования и спектральной доплерографии артерий нижних конечностей) непосредственно ингибирует апоптоз и способствует подавлению ответной пролиферации ГМК из меди в интиму. В работе, принадлежащей S. Dimmeler (1996), было показано, что напряжение сдвига, создаваемое кровотоком, оказывает влияние на целостность эндотелиальных клеток, достигаемую за счет ингибирования

запрограммированной гибели клеток [246]. В нашей работе наблюдалось увеличение выработки эндотелиальными клетками сосудистой стенки маркеров NO и VEGF, начиная с 7 суток, которые могут обуславливать его защиту от гибели. При выполнении ДС артерий нижних конечностей в указанный срок, определялся магистральный кровоток в зоне реконструкции. Мы полагаем, что восстановленный магистральный кровоток оказывает протекторное воздействие на эндотелий сосудистой стенки за счет выработки эндотелиальной NO-синтазы. NO, высвобождаемый в ответ на напряжение сдвига, приводит к изменению соотношения Bcl-2/Bax в сторону увеличения первого. Так, повышение маркера Bcl-2 к концу первой недели, не только является признаком окончания первой волны апоптоза, но и обладает еще цитопротекторными свойствами для эндотелиальных клеток за счет собственных антиоксидантных свойств, способствуя выживанию пролиферирующих и мигрирующих клеток эндотелия.

На 21-е сутки происходит активация второй волны апоптоза, выражающейся в достоверно значимом снижении маркера sFas ($p=0,01$) и PDGF BB ($p=0,01$) по сравнению с их количеством на 14-ые сутки. В этот период также была обнаружена связь между маркерами PDGF BB и sFas ($r=+0,82$, $p=0,001$) (Рисунок 19).

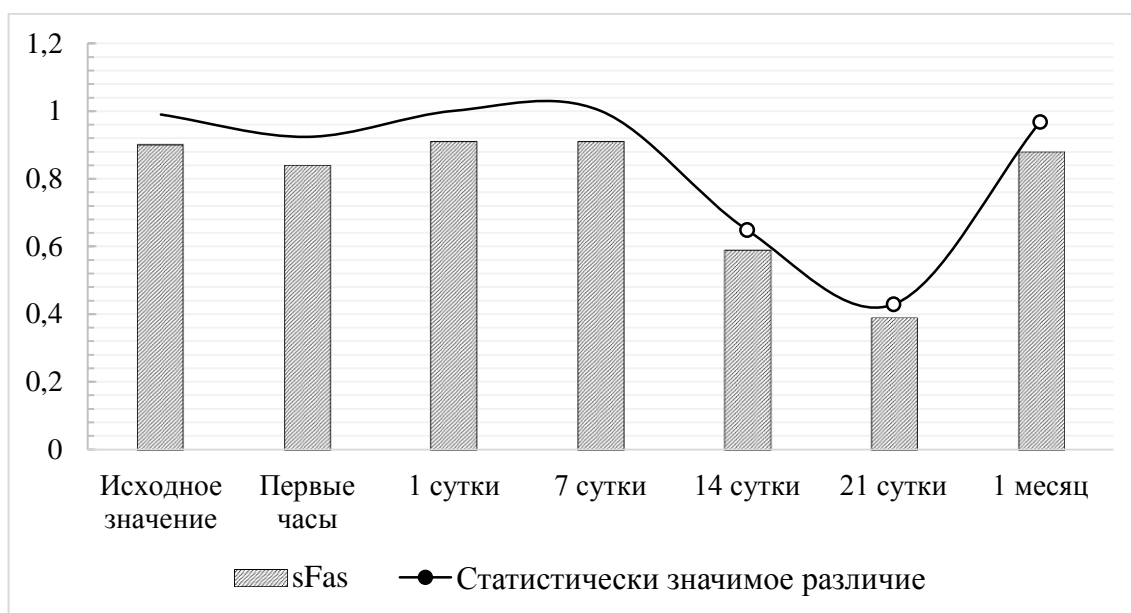


Рисунок 19 - Динамика изменений маркера sFas у пациентов группы В в послеоперационном периоде

Мы предполагаем, что активация второй волны апоптоза ограничивает ответную пролиферацию, которая направлена на преодоление клеточного дефицита. Следовательно, повышение значений PDGF BB на 7 и 14 сутки можно рассматривать в качестве одного из активатора второй волны апоптоза, что подтверждено данными корреляционного анализа (отрицательная взаимосвязь между значениями sFas и PDGF BB на 14 сутки).

Другим их возможным индуктором в запуске данной волны является NO, количество которого достигает максимума к концу второй недели. Более того, его значения имеют обратную корреляцию с ингибитором рецепторного пути апоптоза sFas во всех оперативных группах на 14-е сутки. Следует отметить, что проапоптотические эффекты NO проявляются при его высоких концентрациях, в то время как его антиапоптотические эффекты наблюдались при более низких значениях. Так, в нашем исследовании, начиная с 14-ых суток, наблюдалось значительное снижение ингибитора рецепторного пути апоптоза sFas с достижением минимального значения на 21-ые сутки, что, как следствие, привело к значимому уменьшению пролиферации и миграции клеток. Это было подтверждено результатами выявленной прямой взаимосвязи между значениями маркера PDGF BB и sFas. Активация преимущественно рецепторного пути во вторую волну связана с тем, что ГМК формирующейся НИ чувствительны к рецепторному пути апоптоза. В отличие от ГМК, клетки эндотелия устойчивы к Fas-опосредованному апоптозу. В этом и заключается уникальность данной системы, которая индуцируя апоптоз в ГМК формирующейся НИ, не препятствует процессу реэндотелизации зоны реконструкции. Кроме того, Fas-Fas ligand подавляет воспалительную реакцию за счет отмирания Т-клеток и макрофагов, стимулируя продукцию противовоспалительного интерлейкина-10, а также препятствуя экстравазации лейкоцитов в сосудистую стенку. Учитывая все вышеперечисленные возможности данной системы, активация ее во вторую волну несет в себе все предпосылки ограничения роста НИ.

К концу 1-го месяца произошло дальнейшее снижение значений PDGF BB ($p < 0,001$), NO ($p < 0,001$) на фоне повышения значения sFas ($p < 0,001$) по сравнению с 21-ми сутками.

Кумулятивная первичная проходимость после проведенных оперативных вмешательств у всех оперативных групп составила 100% в течение 6 месяцев послеоперационного периода. На основании клинической картины, а также объективного обследования пациентов в послеоперационном периоде, было выявлено улучшение перфузии в оперированной конечности. При выполнении ДС артерий нижних конечностей на контрольных визитах пациентов оперативных групп через 6 месяцев после операции, была подтверждена проходимость оперированного сегмента, без гемодинамически значимых остаточных стенозов.

У пациентов в группе В первичная проходимость зоны оперативного вмешательства через 1 и 2 года составила 73% и 60%, соответственно. Клинические исходы эндоваскулярных вмешательств у пациентов группы В представлены в Таблице 12.

Таблица 12 - Клинические исходы эндоваскулярных вмешательств у пациентов группы В

Тип исхода	Количество пациентов, n (%)	Срок возникновения, Ме [Q1;Q3]
Рестеноз зоны реконструкции	12 (26,6%)	12 [10; 13]
Прогрессирование атеросклероза	6 (13,3%)	17 [16; 18]
Прогрессирование атеросклероза в других сосудистых бассейнах	2 (4,4%)	17 [16; 18]
Тромбозы	1 (2,2%)	12 месяцев
Ампутации	1 (2,2%)	19 месяцев
Летальные исходы	3 (6,7%)	-

У 12 (26,6%) пациентов группы В через 12 [10; 13] месяцев было диагностировано развитие рестеноза зоны вмешательства, подтвержденное данными ДС и аортоартериографией нижних конечностей. У всех пациентов с данным осложнением была диагностирована III стадия заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна.

Представим подробное описание пациентов с рестенозом зоны реконструкции в отдаленном послеоперационном периоде. Так, у семи пациентов был выявлен гемодинамически значимый стеноз (более 80%) ПБА в области первично выполненной ангиопластики данного сегмента. У трех пациентов данной погруппы, наблюдался стеноз до 80% в зоне ранее выполненного ЧТБА наружной подвздошной артерии (НПА). Данным пациентам были успешно проведены повторные эндоваскулярные вмешательства (ангиопластика/стентирование) пораженного сегмента. У одного пациента после первично выполненной реканализации и ангиопластики НПА и ПБА через 10 месяцев были выявлены стеноз в НПА до 70% и окклюзия ПБА на всем протяжении. После дообследования пациенту выполнено гибридное оперативное вмешательство- стентирование НПА и БПШ выше щели коленного сустава с использованием синтетического протеза с компенсацией кровообращения на оперированной конечности. Другой пациент был госпитализирован в отделение сосудистой хирургии с посттромботической окклюзией бедренно-подколенного сегмента правой нижней конечности после выполненной ангиопластики ПБА в средней и нижней трети бедра. При выполнении ангиографии артерий нижних конечностей было выявлено: окклюзия ПБА от устья с коллатеральным заполнением ПкА в первой порции выше щели коленного сустава; подвздошный сегмент и артерии голени проходимы, с неровностью контуров. В последующем пациенту было выполнено БПШ выше щели коленного сустава синтетическим протезом.

Проведенное сравнение исследуемых биомаркеров между пациентами группы В с рестенозом зоны реконструкции и пациентами с нормальным течением послеоперационного периода показало следующие результаты.

У пациентов с рестенозом зоны реконструкции в первые часы после операции было повышено количество маркера митохондриального пути апоптоза Вах ($p < 0,001$) при сниженных значениях Vcl-2 ($p < 0,001$), VEGF A165 ($p < 0,001$) в сравнении с пациентами группы В без данного осложнения. Нужно отметить, что

значения маркера VEGF A165 обратно взаимосвязаны с количеством белка Вах ($r=-0,916$, $p<0,001$) в первые часы после операции.

К концу 1-х суток после операции, у пациентов с рестенозом уровни маркеров NO ($p<0,001$), Vcl-2 ($p=0,003$) были снижены в сравнении с пациентами группы В без данного осложнения. При этом уровень проапоптотического маркера Вах был значительно выше у пациентов группы В с рестенозом зоны вмешательства ($p=0,02$). На 1-ые сутки после операции также была выявлена взаимосвязь между маркерами Вах и NO ($r=-0,55$, $p<0,001$).

На 7-е сутки максимально было повышено количество маркера пролиферации клеток PDGF BB ($p=0,002$) при сниженном значении NO ($p<0,001$) и VEGF A165 ($p<0,001$) у пациентов с рестенозом, в сравнении с группой пациентов без данного осложнения.

На 14-е сутки было замечено снижение количества NO ($p<0,001$), VEGF A165 ($p<0,001$) и повышение значения sFas ($p<0,001$) у пациентов с рестенозом, в сравнении с пациентами без рестеноза зоны вмешательства. Вышеупомянутые маркеры – NO и sFas имели отрицательный коэффициент корреляции в указанный период времени ($r=-0,846$, $p<0,001$).

На 21-е сутки у пациентов с рестенозом не произошла активация второй волны апоптоза, и, более того, значения ингибитора рецепторного пути апоптоза sFas ($p<0,001$) были повышены у пациентов с рестенозом зоны реконструкции. Данный маркер, как выяснилось при проведении корреляционного анализа, имел прямую связь с маркером пролиферации PDGF BB ($r=+0,82$, $p=0,01$).

Из-за неэффективности второй волны апоптоза к концу первого месяца, у пациентов с рестенозом было повышено количество маркера PDGF BB ($p<0,001$) на фоне сниженных значений VEGF A165 ($p<0,01$) по сравнению с остальными пациентами данной группы (Рисунок 20).

В указанный промежуток времени значения Vps у пациентов с рестенозом зоны реконструкции составляли 125 [100; 130] см/с и были повышены по сравнению со значениями у пациентов без данного осложнения – 90 [78; 93] см/с,

$p < 0,01$. При этом была выявлена прямая взаимосвязь между значениями показателя PDGF BB и V_{ps} ($r = +0,83$, $p < 0,001$).

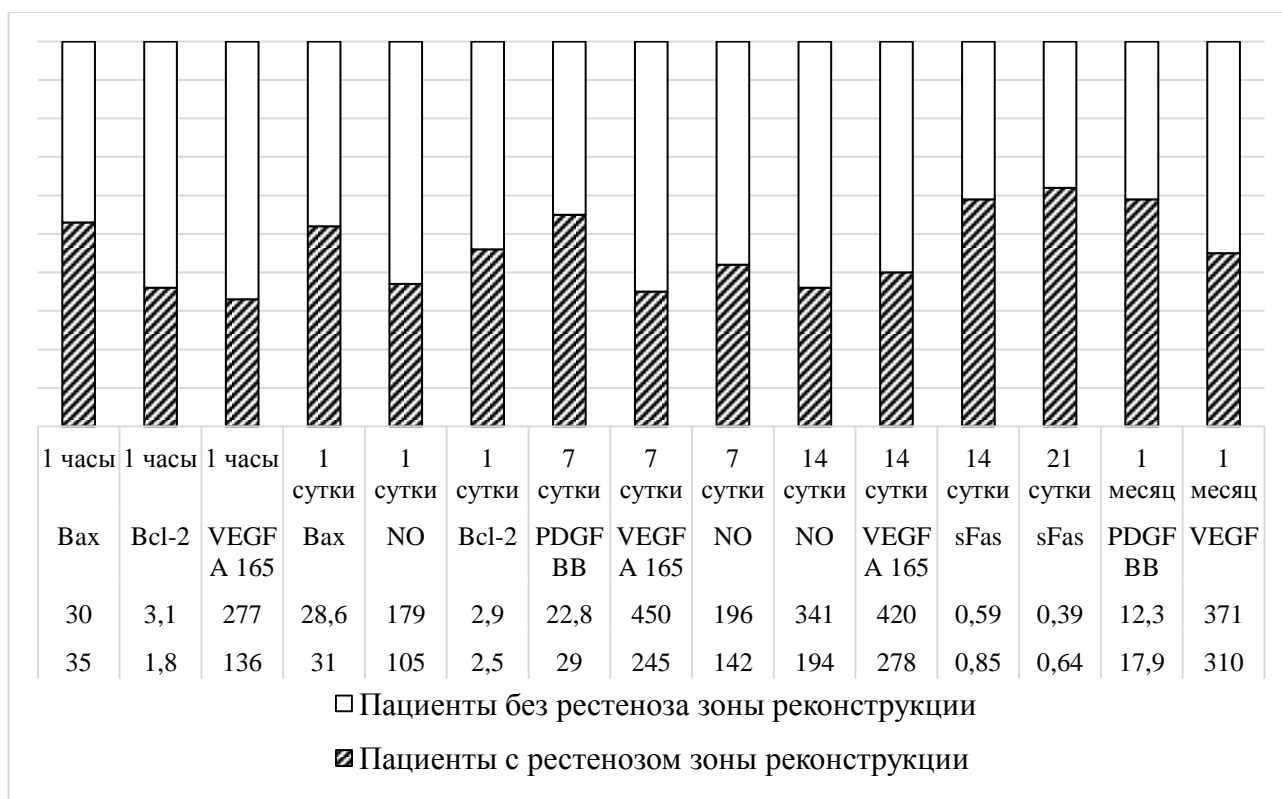


Рисунок 20 - Сравнение исследуемых показателей у пациентов группы В с рестенозом зоны вмешательства и без данного осложнения

Предварительно, в качестве факторов риска развития рестеноза зоны реконструкции были рассмотрены следующие клинические характеристики пациентов: пол, возраст, сопутствующая патология, стадия заболевания, количество реконструированных сегментов артериальной стенки во время операции, значения показателей липидного спектра. В результате статистической обработки все вышперечисленные факторы нельзя рассматривать в качестве предикторов развития рестеноза зоны реконструкции ($p > 0,05$). В свою очередь количество лейкоцитов в сыворотке крови на 1 сутки, а также значения V_{ps} к концу первого месяца можно считать прогностическими маркерами развития рестеноза в отдаленном послеоперационном периоде (Таблица 13).

В результате применения логистической регрессии с последующим Рос-анализом были получены пороговые значения для маркеров Вах, Bcl-2, VEGF

A165 в первые часы, NO на 1-е сутки, PDGF BB, NO, VEGF A 165 на 7-е сутки, NO и VEGF A 165 на 14-е сутки, sFas на 21-е сутки, VEGF A165 и PDGF BB на 1 месяц ассоциируемые с повышенным риском развития рестеноза зоны реконструкции в отдаленном послеоперационном периоде (Таблица 13).

Таблица 13 - Рос-анализ маркеров апоптоза, пролиферации и дисфункции у пациентов в группе В с позиции риска развития рестеноза зоны артериальной реконструкции

Пороговые значения	95% ДИ	AUC	Sp., %	Se., %	p
Вах в первые часы					
$\geq 32,9$ нг/мл	0; 1,0	0,92	76	96	0,01
Vcl-2 в первые часы					
$\leq 2,05$ нг/мл	0,80; 0,99	0,86	54	84	0,01
VEGF A165 в первые часы					
≤ 208 пг/мл	0,84; 1,0	0,92	78	87	0,01
NO на первые сутки					
$\leq 125,3$ ммоль/л	0; 1,0	1,0	100	100	0,01
VEGF A 165 на 7 сутки					
$\leq 307,5$ пг/мл	0,94; 1,0	0,97	92	97	0,01
PDGF BB на 7 сутки					
$\geq 29,5$ нг/мл	0,66; 0,97	0,814	66,6	82,8	0,02
NO 7 на сутки					
≤ 159 ммоль/л	0; 1,0	0,97	90	95	0,01
NO на 14 сутки					
$\leq 272,4$ ммоль/л	0; 1,0	0,99	91	96	0,01
VEGF 165A на 14 сутки					
$\leq 345,5$ пг/мл	0,82; 0,99	0,9	64	86,1	0,01
sFas на 21 сутки					
$\geq 0,515$ нг/мл	0,73; 1,0	0,87	100	67	0,01
PDGF BB на 1 месяц					
$\geq 15,4$ нг/мл	0,95; 1,0	0,98	96	100	0,01
VEGF A165 на 1 месяц					
≤ 355 нг/мл	0,65; 0,93	0,79	60	100	0,01

По результатам многофакторного анализа, выполненного с использованием логистической регрессии, нам удалось выявить следующие факторы риска развития рестеноза зоны реконструкции: Вах первые часы, NO на 1 и 7-е сутки, VEGF A165 на 14-е сутки, sFas на 21-е сутки, значения Vps на 1 месяц (Таблица 14).

Таблица 14 - Выявление факторов риска развития рестеноза зоны реконструкции у пациентов группы В

Показатели		Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
Маркер	Период	RR	95% ДИ	p-value	RR	95% ДИ	p
Bax	Первые часы	23,6	1,56; 355	0,02	NA	NA	NA
Bcl-2	Первые часы	1,95	1,1; 3,78	0,04	NA	NA	NA
VEGF A 165	Первые часы	2,26	1,1; 4,4	0,02	NA	NA	NA
NO	1-е сутки	23,6	1,56; 355	0,02	NA	NA	NA
Лейкоциты	1-е сутки	3,5	1,3; 9,6	0,01	NA	NA	NA
PDGF BB	7-е сутки	1,77	1,0; 3,17	0,04	NA	NA	NA
VEGF A 165	7-е сутки	11,7	1,78; 76,2	0,01	NA	NA	NA
NO	7-е сутки	23,6	1,68; 355	0,02	NA	NA	NA
VEGF A 165	14-е сутки	12	1,83; 78	0,01	25,5	1,6; 387	0,02
NO	14-е сутки	2,1	1,1; 4,2	0,03			
sFas	21-е сутки	3,85	1,44; 10,3	0,01	NA	NA	NA
PDGF BB	1 месяц	11,6	1,7; 75,6	0,01	NA	NA	NA
Vps	1 месяц	25,5	1,6; 387	0,02	NA	NA	NA

Опираясь на вышеизложенное, можно прийти к выводу, что индуцированный операционной травмой запуск апоптоза клеток сосудистой стенки является важным фактором, определяющим ремоделирование и рестеноз зоны реконструкции в отдаленном послеоперационном периоде. В ряде иностранных исследований, посвященных изучению апоптоза в образцах с рестенозом зоны реконструкции, были получены противоречивые результаты. J.M. Isner et al. (1995) наблюдали повышенную активность апоптоза в рестенозированных образцах по сравнению с образцами сосудистой стенки с атеросклеротическим поражением, полученными при выполнении эндартерэктомии из коронарных артерий [68]. Данные исследователи связывали это с тем, что в основном апоптоз усиленно протекает в тканях с повышенной пролиферацией, а зона рестеноза как раз и является областью с повышенной митогенной активностью.

В нашем исследовании пациенты с рестенозом зоны реконструкции имели более выраженную активацию маркеров митохондриального пути апоптоза (повышенное соотношение маркеров Bax/Bcl-2) по сравнению с пациентами без рестеноза зоны реконструкции в раннем послеоперационном периоде. На фоне такой массивной гибели клеток сосудистой стенки произошло снижение количества VEGF A165 в первые часы и NO на 1-е сутки. Несмотря на восстановление магистрального кровотока, мы наблюдали более медленное увеличение значений NO и VEGF A165, и к концу 2-ой недели их значения были достоверно ниже, чем значения у пациентов без рестеноза зоны реконструкции. В результате чего активация второй волны апоптоза не произошла, и значение показателя sFas сохранялось повышенным у пациентов с рестенозом. В итоге, к концу 1-го месяца значения маркера пролиферации и миграции клеток PDGF BB были повышены на фоне сниженных значений VEGF A165, что впоследствии привело к развитию рестеноза зоны реконструкции. На наш взгляд, отсутствие запуска второй волны апоптоза на фоне ярко выраженной гибели клеток сосудистой стенки в первую волну апоптоза не смогло ограничить усиленный пролиферативный ответ, что привело к развитию данного осложнения. Обращает на себя внимание, повышение значений Vps у пациентов с рестенозом зоны реконструкции к концу первого месяца при их прямой корреляционной взаимосвязи с маркером пролиферации и миграции клеток сосудистой стенки PDGF BB.

У 6 (13%) пациентов группы В за период наблюдения через 17 [16; 18] месяцев после эндоваскулярных интервенций, было выявлено прогрессирование атеросклеротического поражения выше/ниже зоны реконструкции на оперированной или на контралатеральной конечности. Предоставим описание группы пациентов с прогрессированием атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде.

В ходе наблюдения за шестью пациентами, у двух из них были выявлены критические стенозы в НПА и ОПА, составляющие 70-90%. Изначально, данным пациентам было выполнено ЧТБА ПБА и ПКА. В плановом порядке данные

пациенты были повторно прооперированы, выполнялась ангиопластика со стентированием пораженного сегмента с использованием трансфemorального ретроградного доступа.

Два пациента перенесли первую операцию в виде эндоваскулярного вмешательства на артериях бедренно-подколенного сегмента. Через 18 месяцев на контрольном осмотре у данных пациентов были выявлены тандемные стенозы/окклюзии ЗББА и ПББА. Первому пациенту было выполнено повторное эндоваскулярное вмешательство - реканализации, ЧТБА ЗББА и ПББА с получением периферического пульса на операционном столе. У второго пациента с учетом развития влажной гангрены конечности и отсутствия периферического русла по данным аортоартиографии было принято решение о выполнении ампутации голени в отделении гнойной хирургии.

У двух пациентов данной подгруппы прогрессирование атеросклеротического поражения произошло на контралатеральной конечности. Так, в одном случае после выполнения стентирования НПА на правой нижней конечности было выявлено прогрессирование атеросклеротического поражения как на ранее оперированной (тандемные стенозы ОПА), так и на противоположной конечности (окклюзия НПА). В последующем пациенту было выполнено бифуркационное аорто-бедренное шунтирование (БАБШ) синтетическим протезом Intergard 18*9*9мм с компенсацией кровообращения. У другого пациента после выполнения реканализации и ангиопластики ПБА была выявлена окклюзия НПА контралатеральной конечности по данным ДС артерий нижних конечностей. В плановом порядке было выполнено общеподвздошно-бедренное шунтирование с использованием синтетического протеза Intergard 8 мм.

Нужно также отметить, что у двух из шести вышеуказанных пациентов было выявлено увеличение процента стеноза во внутренних сонных артериях (ВСА) с 40 до 55%, что расценивалось как прогрессирование атеросклероза в другом сосудистом бассейне.

Проведенное сравнение исследуемых маркеров между пациентами группы В с прогрессированием атеросклероза в сравнении с их количеством у пациентов

без данного осложнения в различные временные периоды позволить получить следующие результаты.

Исходное значение маркера апоптоза Вах ($p < 0,001$) было повышено на фоне сниженных значений sFas ($p = 0,03$) у пациентов с прогрессированием атеросклероза по сравнению со значениями у остальных пациентов данной группы.

В первые часы после операции наблюдалась активация сразу 2-х путей апоптоза, в виде повышения маркера митохондриального пути апоптоза Вах ($p < 0,001$) при снижении значений ингибитора рецепторного пути sFas ($p = 0,01$) и биомаркера VEGF A165 ($p = 0,01$) у пациентов с прогрессированием атеросклероза в сравнении со значениями пациентов без данного осложнения. В первые часы между маркерами Вах и NO ($r = -0,942$, $p < 0,001$), а также Вах и VEGF A165 ($r = -0,927$, $p < 0,001$), исходными значениями sFas и его количеством в первые часы ($r = +0,833$, $p = 0,01$) были выявлены корреляционные взаимосвязи.

На первые сутки у пациентов с прогрессированием атеросклероза, маркер пролиферации PDGF BB проявил более высокую активность ($p < 0,01$), на фоне снижения значений NO ($p < 0,001$). При этом наблюдалось сохранение сниженного количества sFas ($p = 0,003$). Маркеры sFas и NO ($r = +0,828$, $p = 0,04$), sFas и PDGF BB ($r = -0,898$, $p = 0,02$) были взаимосвязаны между собой в вышеупомянутый период времени.

На 7-е сутки у показателя PDGF BB наблюдалось повышение его значений ($p = 0,001$) у пациентов с прогрессированием атеросклероза в сравнении с пациентами без данного осложнения. У пациентов с прогрессированием атеросклероза на 14-е сутки уровень маркера пролиферации PDGF BB ($p = 0,001$) сохранялся повышенным при сниженном уровне NO ($p = 0,0008$) в сравнении со значениями пациентов с нормальным течением послеоперационного периода. Коэффициенты корреляции для sFas и PDGF BB ($r = -0,828$, $p = 0,04$) на 14-е сутки, sFas и PDGF BB ($r = +0,942$, $p = 0,004$) на 21-е сутки говорят о наличии связи между указанными маркерами. К концу первого месяца у пациентов с прогрессированием атеросклероза поддерживался повышенный уровень маркера

пролиферации клеток PDGF BB ($p=0,001$) на фоне сниженных значений маркера дисфункции эндотелия - NO ($p=0,01$) (Рисунок 21).

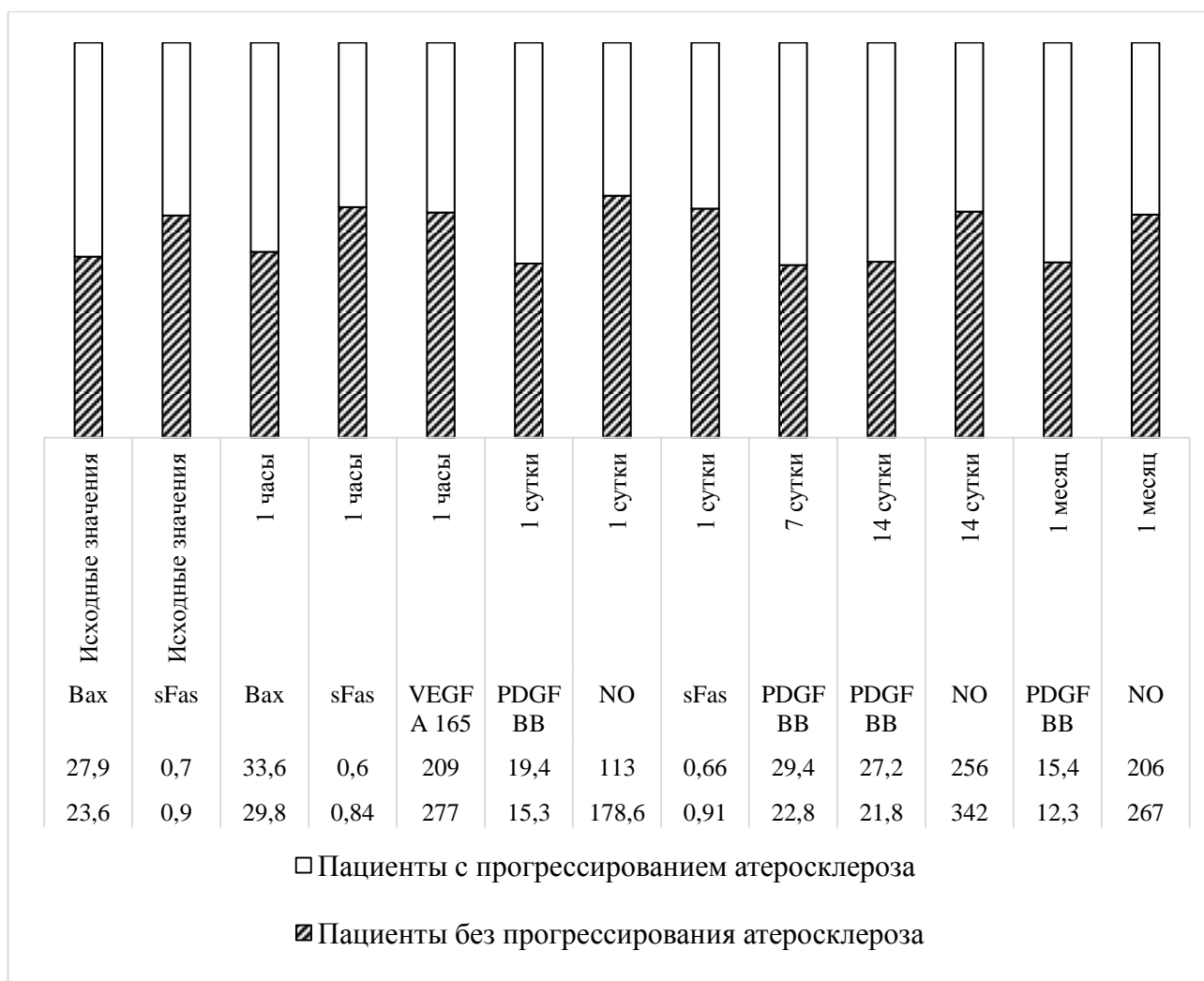


Рисунок 21 - Сравнение исследуемых показателей у пациентов группы В с и без прогрессирования атеросклеротического поражения в отдаленном послеоперационном периоде

В указанный промежуток времени значения показателя RI у пациентов с прогрессированием атеросклероза составили 1,37 [1,3; 1,4] и превышали в 1,2 раза его значения у пациентов без развития данного осложнения – 1,1 [1; 1,2], $p<0,001$. При этом данный показатель обратно коррелировал со значениями маркера дисфункции эндотелия NO ($r=-0,941$, $p<0,01$).

В связи с недостаточным количеством пациентов с прогрессированием атеросклероза в группе В, бинарная логистическая регрессия, и, как следствие

Рос-анализ для маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия не применялись.

Анализируя полученные результаты, можно сказать, что у пациентов с прогрессированием атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде наблюдался исходный проапоптотический статус в виде повышенных значений биомаркера митохондриального пути Вах и пониженного значения ингибитора пути рецептора sFas. У данных пациентов наблюдалось увеличение количества биомаркера Вах и снижение sFas в первые часы, что свидетельствует об активации сразу двух путей апоптоза после операции, в отличие от других пациентов группы В, у которых только значения биомаркера Вах увеличивались. Запуск рецепторного пути апоптоза, на наш взгляд, связан с изначально сниженными значениями sFas, а хирургическая травма, в свою очередь, привела к его дальнейшему снижению до конца первых суток (прямая корреляция между исходными значениями sFas и их значения в первый послеоперационный день). Гибель клеток сосудистой стенки в результате более интенсивной активации апоптоза привела к более выраженному снижению уровня метаболитов NO к концу первых суток и усилению пролиферативного ответа, что подтверждено данными корреляционного анализа. В дальнейшем повышенные значения маркера пролиферации PDGF BB на 7 и 14 сутки способствовали запуску второй волны апоптоза, которая выражалась в снижении значений sFas на 21 сутки. Несмотря на активацию второй волны апоптоза, она не смогла ограничить усиленную пролиферацию клеток, что в итоге привело к повышенному количеству PDGF BB к концу 1 месяца. Динамика роста NO после 1 суток у пациентов с прогрессированием заболевания была ниже, чем у других пациентов без данного осложнения, несмотря на восстановление магистрального кровотока. В итоге к концу 1 месяца значения NO были снижены в сравнении с пациентами группы В - без данного осложнения.

На контрольных визитах 27 (60%) пациентов группы В с нормальным течением послеоперационного периода по данным ДС артерий нижних конечностей, толщина неоинтимы в зоне операционного вмешательства составила

через год 1,3 [1,1; 1,5] мм. Через 1,5 года наблюдалось увеличение толщины неоинтимы до 1,4 [1,2; 1,6] мм ($p < 0,05$). Через 2 года, рост неоинтимы относительно 1,5 лет ($p > 0,05$) не произошел, ее толщина составила 1,42 [1,2; 1,7] мм. При этом значения V_{ps} составили 90 [78; 92] см/с, 89 [79; 92] см/с, 88 [80; 90] см/с через 1, 1,5, 2 года соответственно, без достоверно значимых различий между данными периодами времени ($p < 0,05$). По данным УЗДГ, через 2 года ЛПИ составил - 0,8 [0,8; 0,9] на оперированной конечности.

Летальные исходы в группе В составили 3 (6,6 %) случая; причиной двух смертей стала новая коронавирусная инфекция Covid-19, причина третьей инфаркт миокарда.

3.4. Исследование динамики маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы С и их роли в развитии отдаленных послеоперационных осложнений

Предварительные расчеты относительно минимального количества пациентов группы, для выявления достоверно значимых различий между исследуемыми показателями в группе С должно составлять 33 пациента ($p < 0,05$, $\beta > 0,8$). Уровень показателей PDGF BB, Вах, VEGF A165 до операции у пациентов группы С в сравнении со значениями у добровольцев, был повышен при сниженных значениях sFas, Bcl-2, NO. Уровень значимости различий составил $p < 0,001$ (Таблица 15).

Таблица 15 - Сравнение исходных значений исследуемых показателей у пациентов группы С со здоровыми добровольцами

Показатели, Me [Q1-Q3]	Вах (нг/мл)	Bcl-2 (нг/мл)	sFas (нг/мл)	PDGF BB (нг/мл)	NO (ммоль/л)	VEGF A165 (пг/мл)
Здоровые добровольцы	15,1 [13,9; 15,8]	5,3 [4,8; 5,8]	1,1 [0,97; 1,2]	8,9 [8,1; 9,5]	340,4 [306; 377]	86 [67; 107]
Значения пациентов группы С	23,9* [21,9; 25,4]	4,4* [4,0; 4,8]	0,93* [0,89; 0,97]	13,1* [12,7; 13,6]	241* [210; 262]	373* [332; 402]
*-статистически значимая разница, $p < 0,05$						

У пациентов со IIВ исходные значения маркера Вах были понижены в сравнении со значениями пациентов с III стадией заболевания ($p=0,02$). У пациентов с сопутствующим заболеванием в виде ишемической болезни сердца значения маркера sFas были снижены в сравнении с пациентами без данной сопутствующей патологии ($p=0,03$).

Анализ динамика исследуемых показателей после проведения гибридных вмешательств на артериях нижних конечности показал следующие результаты.

Так, в первые часы отмечался значимый рост количества Вах ($p<0,001$) при снижении Vcl-2 ($p<0,001$) и VEGF A165 ($p<0,001$) по сравнению с исходным уровнем (Рисунки 22-24).

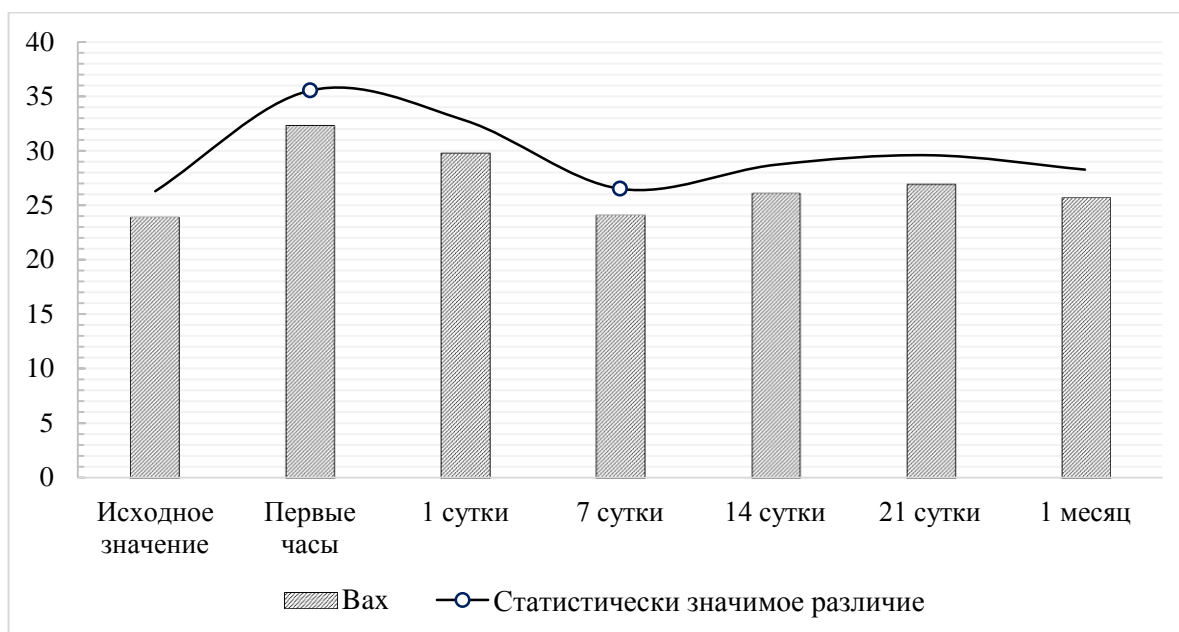


Рисунок 22 - Динамика маркера Вах в различные сроки послеоперационного периода у пациентов группы С

На первые сутки, как ответ на гибель клеток, происходит соответствующее повышение значений маркера пролиферации – PDGF ВВ ($p=0,01$) и снижение маркера дисфункции эндотелия – NO ($p<0,001$) относительно их значений в первые часы. Сниженное значение Vcl-2 напрямую связано с низким значением NO ($r=+0,487$, $p=0,01$). В свою очередь повышение количества лейкоцитов в сыворотке крови обратно коррелировало со значениями маркера Vcl-2 ($r=-0,489$, $p=0,03$) в указанный промежуток времени.

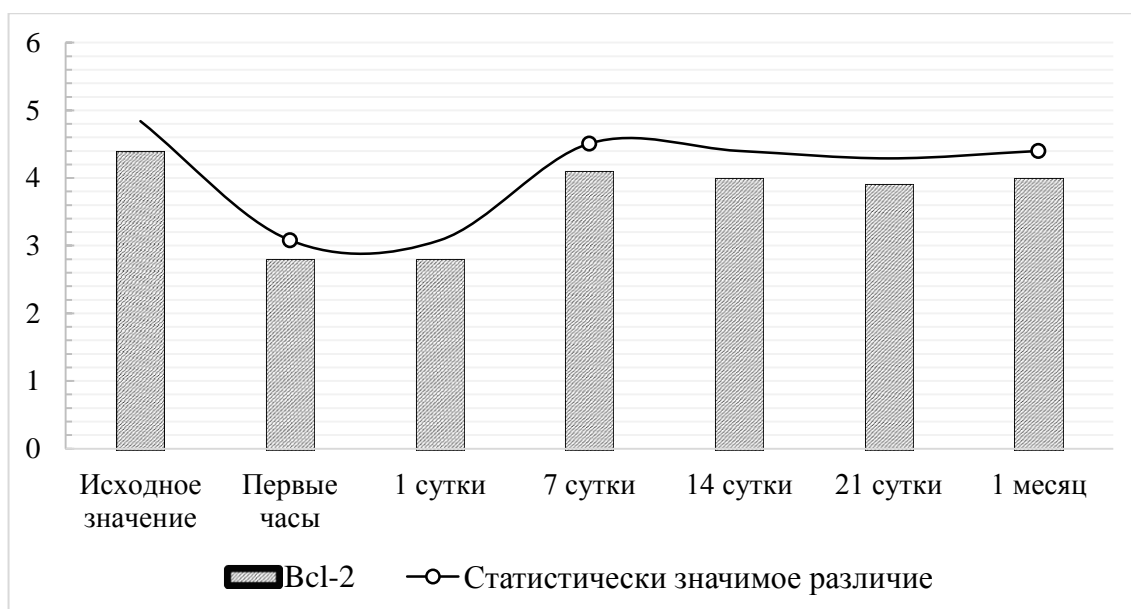


Рисунок 23 - Динамика маркера Bcl-2 в различные сроки послеоперационного периода у пациентов группы С

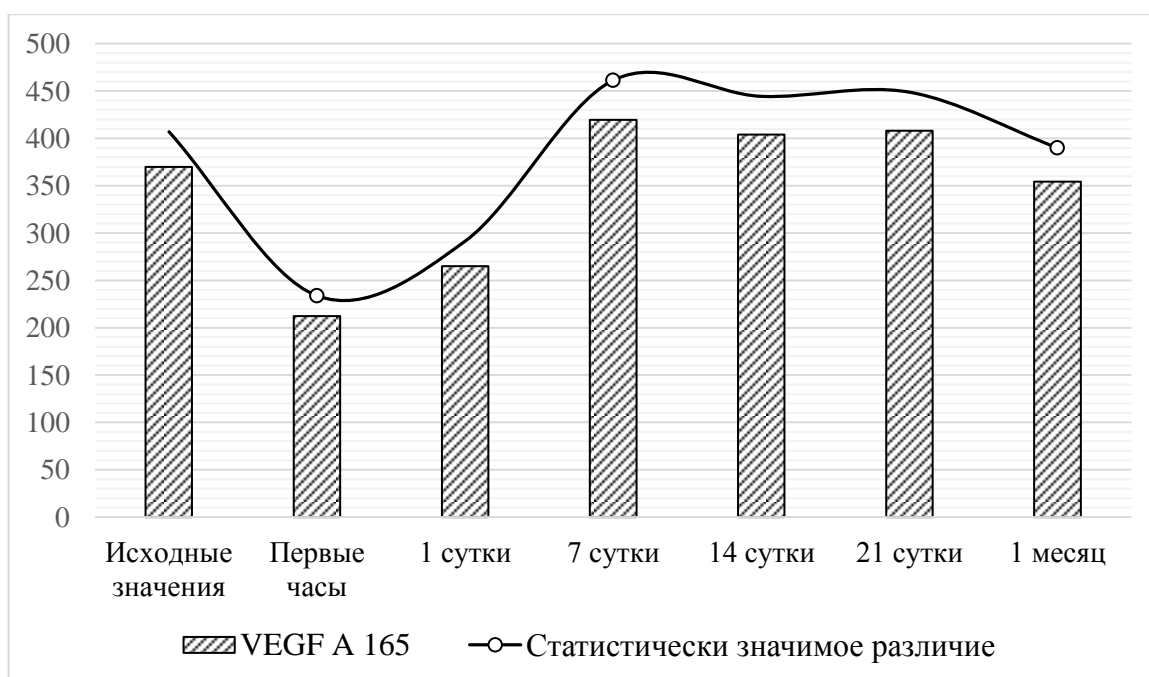


Рисунок 24 - Динамика маркера VEGF A165 в различные сроки послеоперационного периода у пациентов группы С

Анализируя полученные результаты можно сделать вывод, что эндоваскулярные и гибридные вмешательства в раннем послеоперационном периоде ведут к активации первой волны апоптоза, маркеры которой оказывают

непосредственной воздействию на функциональное состояние эндотелия и пролиферацию клеток сосудистой стенки.

На 7-е сутки наблюдалось значимое повышение количества маркеров PDGF BB ($p < 0,001$), VEGF A165 ($p < 0,001$) и Bcl-2 ($p < 0,001$) при снижении маркера Вах ($p < 0,001$) по сравнению со значениями маркеров на первые сутки. В связи с восстановлением ламинарного кровотока, наблюдалось постепенное повышение уровня NO ($p = 0,01$) и VEGF A165 в указанный промежуток времени (Рисунок 25).

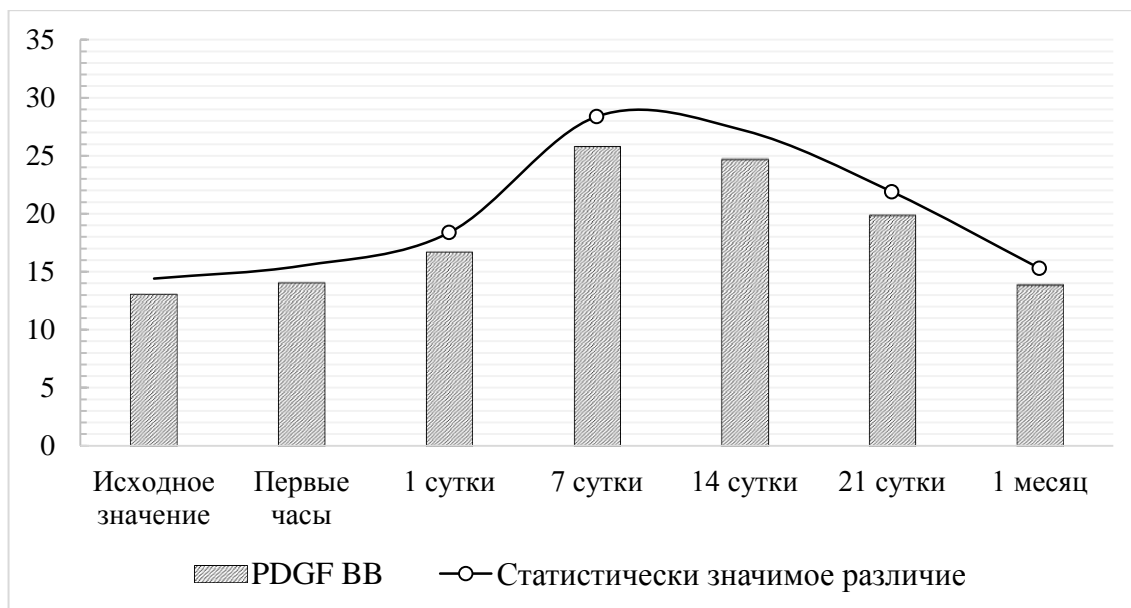


Рисунок 25 - Динамика маркера PDGF BB в различные сроки послеоперационного периода у пациентов группы С

При этом была выявлена прямая взаимосвязь между маркерами VEGF A165 и PDGF BB ($r = +0,778$, $p < 0,001$). Активация пролиферации клеток сосудистой стенки в указанный период времени направлена на возмещение погибших клеток в первую волну апоптоза и нормализации функции эндотелия.

На 14-е сутки наивысшего значения достиг показатель NO ($p < 0,001$), при этом значения маркеров PDGF BB, sFas, Вах, Bcl-2, VEGF A165 ($p > 0,05$) значимо никак не изменились относительно 7-х суток (Рисунок 26). Следует отметить наличие взаимосвязи между значениями NO и sFas на 14 сутки ($r = -0,659$, $p < 0,001$).

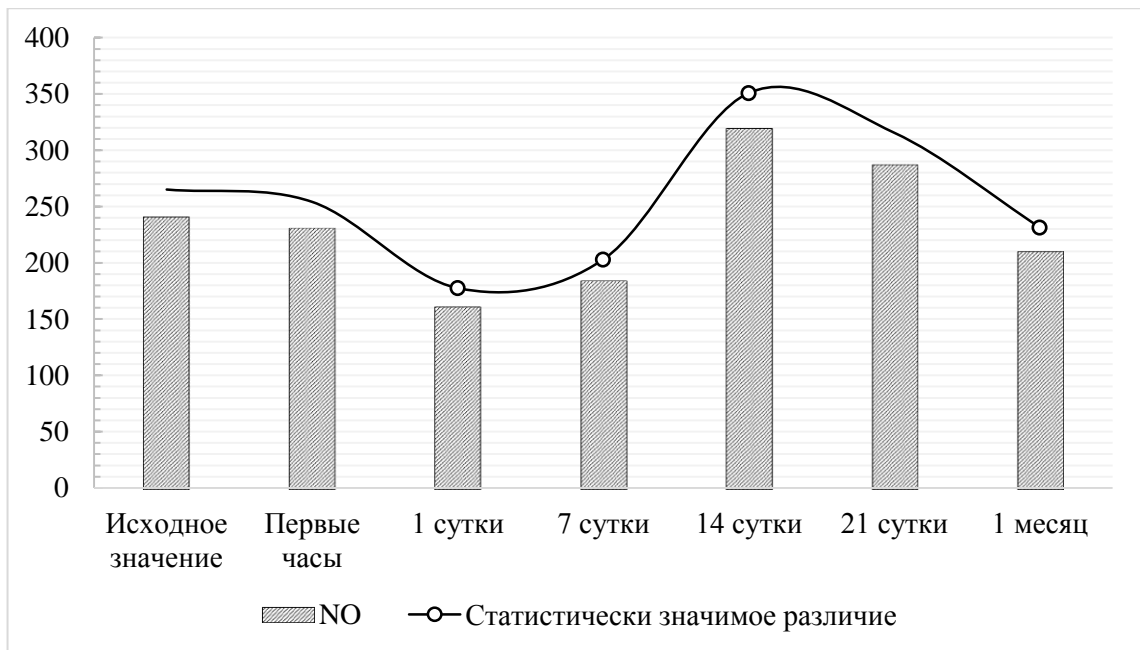


Рисунок 26 - Динамика маркера метаболитов оксида азота в различные сроки послеоперационного периода у пациентов группы С

На 21-е сутки произошло максимальное снижение показателя sFas ($p < 0,001$) на фоне удерживающихся на прежнем уровне значений NO ($p = 0,661$), что привело к снижению количества маркера PDGF BB ($p = 0,02$) относительно их значений на 14 сутки (Рисунок 27).

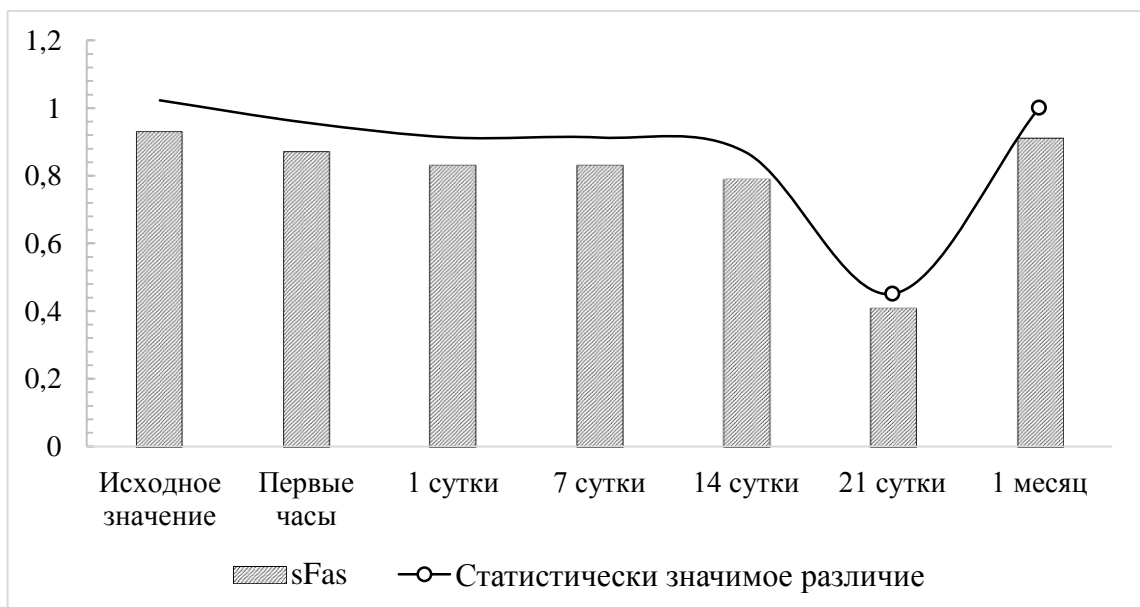


Рисунок 27 - Динамика маркера sFas в различные сроки послеоперационного периода у пациентов группы С

Согласно корреляционному анализу, сниженное количество sFas и PDGF BB имеют высокую силу связи на 21 сутки ($r=+0,74$, $p<0,001$). Повышение синтеза NO к концу второй недели при сохраненном повышенном уровне маркера PDGF BB способствовало запуску второй волны апоптоза, которая выражалась в сниженном количестве ингибитора рецепторного пути апоптоза на 21 сутки.

К концу первого месяца наблюдалась дальнейшая тенденция к снижению значений PDGF BB ($p<0,001$), VEGF A165 ($p<0,001$), NO ($p<0,001$), на фоне повышения значений sFas ($p<0,001$) и Bcl-2 ($p<0,001$) по сравнению с 21 сутками.

Динамика исследуемых маркеров у пациентов группы В была сопоставима с их динамикой у пациентов группы С, что подтверждает наличие двух волн апоптоза вызванных операционной травмой сосудистой стенки независимо от вида вмешательства ($p>0,05$).

В течение последующего двухгодичного наблюдения, первичная проходимость оперированного сегмента у пациентов группы С через один и два года составила 80% и 60%, соответственно. Клинические исходы оперативных вмешательств у пациентов группы С представлены в Таблице 16.

У 9 (20%) пациентов группы С через 12 [10; 13] месяцев был диагностирован рестеноз в области операционного вмешательства. Данное осложнение было подтверждено данными ДС артерий нижних конечностей в случае контрольных осмотров, либо аортоартериографией в случае госпитализации пациентов в отделение сосудистой хирургии.

Таблица 16 - Клинические исходы гибридных оперативных вмешательств у пациентов группы С

Вид исхода	Количество пациентов, n (%)	Срок возникновения, Ме [Q1, Q3]
Рестеноз зоны реконструкции	9 (20 %)	12 [10; 13]
Прогрессирование атеросклероза	9 (20 %)	18 [17; 19]
Прогрессирование атеросклероза в других сосудистых бассейнах	2 (4,4%)	18 [17; 19]
Тромбозы	8 (2,2%)	15 [13; 19]
Ампутации	2 (4,4%)	18 [17; 19]
Летальные исходы	3 (6,7%)	-

На момент осмотра у пяти из девяти пациентов была выявлена посттромботическая окклюзия синтетического БПШ коленного сустава на фоне рестеноза в области дистального анастомоза шунта. При этом зона стентированного сегмента в ОПА/НПА и подколенно-берцовый сегмент были проходимы по данным ДС артерий нижних конечностей. У всех пяти пациентов была диагностирована III стадия заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна. В дальнейшем, данным пациентам в плановом порядке было выполнено бедренно-подколенное рещунтирование выше щели коленного сустава с компенсацией кровообращения.

У трех пациентов после выполнения гибридного вмешательства – реканализации, ЧТБА/стентирования НПА с БПШ, были обнаружены критические стенозы в артериях подвздошно-бедренного сегмента до 80%. У данных пациентов была диагностирована III стадия заболевания. Позже, после дообследования, пациентам было выполнено повторное ЧТБА со стентированием НПА. На контрольной аортоартериографии остаточный стеноз после проведенного вмешательства составил менее 30%. Отметим, что один из девяти пациентов поступил в отделение сосудистой хирургии с клинической картиной трехсуточного тромбоза аутовенозного бедренно-подколенного шунта с ишемией IIБ степени. На контрольном визите через 6 месяцев после вмешательства была выявлена атеросклеротическая бляшка в области ранее выполненной ангиопластики ТПС до 50%, в зоне дистального анастомоза бедренно-подколенного шунта до 45-50%. Через 1 год по данным ДС артерий нижних конечностей БПШ тромбирован, по артериям голени определялся коллатеральный кровоток. В экстренном порядке была выполнена тромбнеоинтимоэктомия из БПШ с реконструкцией дистального анастомоза, ангиопластикой ПкА и ТПС с компенсацией кровообращения.

В дальнейшем нами было проведено сравнение значений исследуемых маркеров у пациентов группы С с рестенозом и без рестеноза зоны реконструкции. У пациентов с рестенозом зоны реконструкции в первые часы после операции было повышено количество маркера митохондриального пути

апоптоза, а именно Вах ($p < 0,001$) на фоне сниженных значения Vcl-2 ($p < 0,001$) и VEGF A165 ($p < 0,001$) в сравнении с остальными пациентами данной группы. При снижении значений показателя Vcl-2 наблюдалось уменьшение количества маркера VEGF A165 ($r = +0,735$, $p = 0,023$).

К концу 1-х суток после операции, у пациентов с рестенозом произошло стремительное снижение уровня NO ($p < 0,001$) в ответ на усиленный апоптоз, представленный повышенным значением Вах ($p < 0,001$). При проведении корреляционного анализа были выявлены взаимосвязи между маркерами Вах и NO ($r = -0,85$, $p = 0,003$), Vcl-2 и NO ($r = +0,881$, $p < 0,001$).

Через 7 суток произошло максимальное повышение количества маркера пролиферации клеток PDGF BB ($p < 0,001$) при снижении значения маркера VEGF A165 ($p < 0,001$) у пациентов с рестенозом в сравнении с пациентами этой группы без рестеноза.

На 14-е сутки сохранились сниженные значения маркеров NO ($p < 0,001$) и VEGF A165 ($p < 0,001$) у пациентов с рестенозом относительно пациентов без данного осложнения.

На 21-е сутки у пациентов с рестенозом, активация второй волны апоптоза не наблюдалась, и даже более того, как было выяснено, показатель sFas ($p < 0,001$) был повышен у данных пациентов, что в дальнейшем явилось причиной роста маркера пролиферации PDGF BB ($p < 0,001$). Данный вывод подтверждается весьма сильным коэффициентом корреляции для PDGF BB и sFas ($r = +0,915$, $p < 0,001$).

К концу первого месяца сохранялись повышенными значения PDGF BB ($p < 0,001$) на фоне сниженных значений VEGF A165 ($p < 0,001$) по сравнению с остальными пациентами данной группы (Рисунок 28).

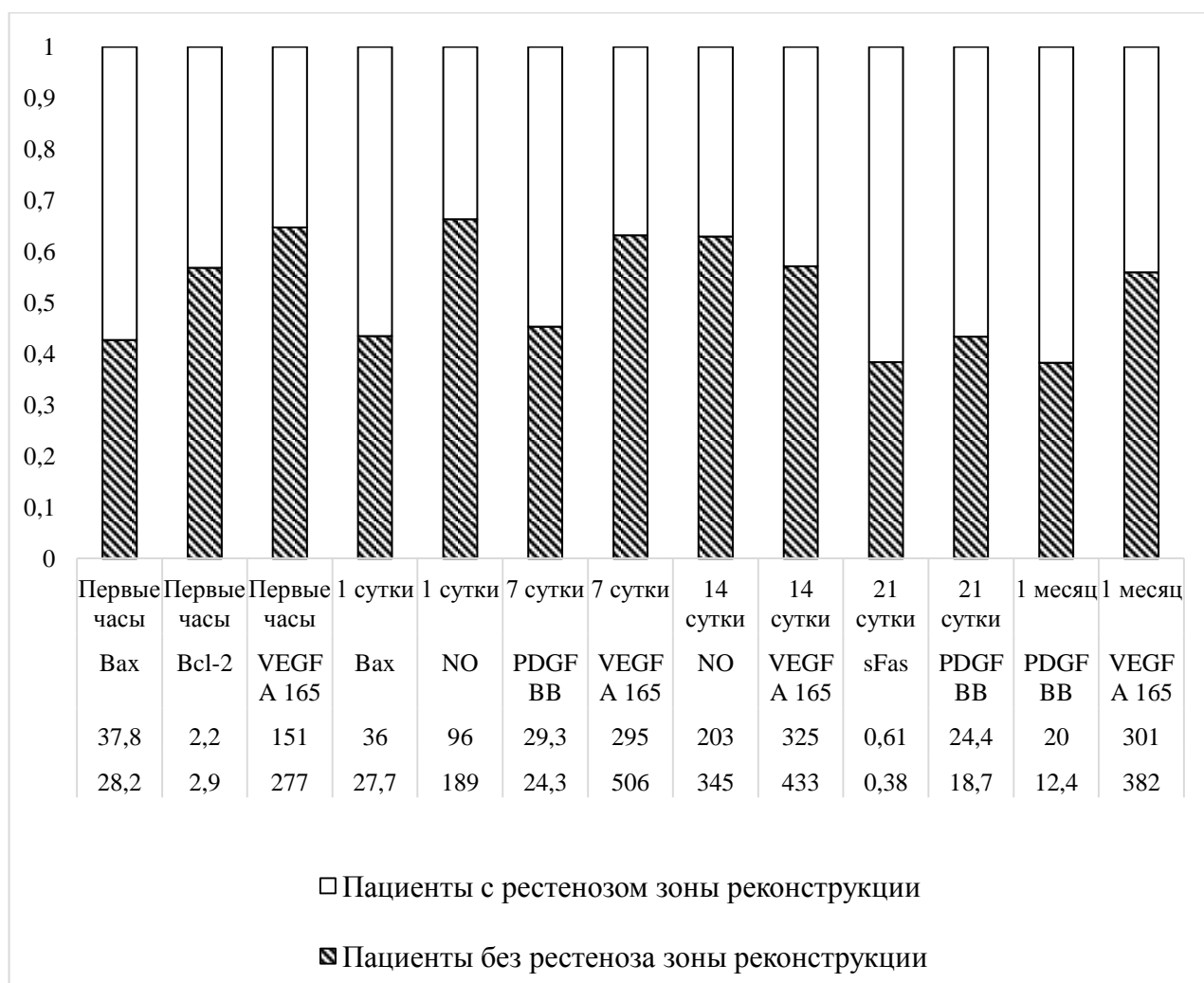


Рисунок 28 - Сравнение исследуемых показателей у пациентов группы С с рестенозом зоны вмешательства и без данного осложнения

Значения показателя V_{ps} у пациентов с рестенозом составили 125 [115; 129] см/с и превышали в 1,5 раза его значения у пациентов группы В без данного осложнения – 79 [75; 86] см/с, ($p < 0,001$). При этом была выявлена прямая взаимосвязь между значениями маркера PDGF BB и V_{ps} ($r = +0,694$, $p = 0,03$).

Рассмотрение в качестве факторов риска таких параметров как: возраст, пол, наличие сопутствующей патологии, стадия заболевания не дало оснований рассматривать данные факторы в качестве предиктора развития рестеноза в отдаленном послеоперационном периоде ($p > 0,05$). Однако, на 1 сутки после операционного периода значения лейкоцитов в сыворотке крови можно рассматривать как потенциально эффективный предиктор развития данного

осложнения ($p=0,04$). Не менее важным прогностическим фактором являлись значения Vps, которые были измерены к концу 1 месяца.

В дальнейшем, для исследования представляет интерес проведение Roc-анализа для нахождения пороговых значений, выше/ниже которых наблюдается увеличение вероятности развития рестеноза зоны реконструкции после оперативных вмешательств. В результате были получены пороговые значения для следующих маркеров представленных в таблице 17.

Таблица 17 - Roc-анализ для маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы С с рестенозом зоны реконструкции

Пороговые значения	95% ДИ	AUC	Sp, %	Se, %	P
Вах в первые часы					
$\geq 36,45$ нг/мл	0,81; 1,0	0,91	63	93	0,04
VEGF A165 в первые часы					
$\leq 182,5$ пг/мл	0,91; 1,0	0,97	77,8	93	0,01
Vcl-2 в первые часы					
$\leq 2,44$ нг/мл	0; 1,0	0,96	61	96	0,01
NO на первые сутки					
≤ 113 ммоль/л	0; 1,0	0,99	85	90	0,01
Вах на первые сутки					
$\geq 31,6$ нг/мл	0; 1,0	0,97	70	93	0,01
PDGF BB на 7 сутки					
≥ 28 нг/мл	0; 1,0	0,98	86	90	0,01
VEGF A165 на 7 сутки					
≤ 383 пг/мл	0,89; 1,0	0,95	75	90	0,01
NO на 14 сутки					
≤ 231 ммоль/л	0; 1,0	1	100	100	0,01
VEGF A165 на 14 сутки					
≤ 404 нг/мл	0,67; 0,95	0,81	50	81	0,01
sFas на 21 сутки					
$\geq 0,55$ нг/мл	0; 1,0	0,99	100	93	0,01
PDGF BB на 21 сутки					
$\geq 22,8$ нг/мл	0; 1,0	0,95	91	91	0,01
PDGF BB на 1 месяц					
$\geq 16,4$ нг/мл	0,95; 1,0	0,98	96	100	0,01
VEGF A165 на 1 месяц					
≤ 335 пг/мл	0,75; 0,98	0,87	75	100	0,01

Анализ результатов показал, что ключевые маркеры апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы С в большинстве точек наблюдений были схожи с теми же показателями, что у пациентов группы В с рестенозом зоны реконструкции.

С помощью применения однофакторного анализа, с последующим проведением многофакторного для статистически значимых результатов предыдущего, выполненного с использованием логистической регрессии, нам удалось выявить следующие факторы риска: значения Bcl-2 и VEGF A165 в первые часы, NO на 1 сутки, PDGF BB на 7 сутки, NO на 14 сутки, sFas на 21 сутки, PDGF BB и Vps на 1 месяц (Таблица 18).

Таблица 18 - Выявление факторов риска развития рестеноза зоны реконструкции у пациентов группы С

Показатели		Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
Маркер	Период	RR	95% ДИ	p	RR	95% ДИ	p
Вах	Первые часы	4	1,2; 13,6	0,03	NA	NA	NA
Bcl-2	Первые часы	7,3	1,1; 46	0,04	19,6	1,3; 46	0,03
VEGF A 165	Первые часы	4,1	1,2; 14,2	0,02			
NO	1 сутки	18,9	1,3; 282	0,03	NA	NA	NA
Вах	1 сутки	4,2	1,2; 14,2	0,02	NA	NA	NA
Лейкоциты	1 сутки	3,3	0,96; 11,5	0,04	NA	NA	NA
PDGF BB	7 сутки	8,7	1,4; 55	0,02	NA	NA	NA
VEGF A165	7 сутки	2,8	1,1; 7,1	0,03	NA	NA	NA
NO	14 сутки	8,7	1,4; 55	0,02	NA	NA	NA
sFas	21 сутки	18,9	1,3; 282	0,03	NA	NA	NA
PDGF BB	21 сутки	8,3	1,3; 53	0,03	NA	NA	NA
PDGF BB	1 месяц	19,3	1,3; 293	0,03	19,3	1,3; 293	0,03
Vps	1 месяц	19,3	1,3; 293	0,03			

Через 18 [17; 19] месяцев после гибридного вмешательства, у 9 (20%) пациентов группы С произошло прогрессирование атеросклеротического поражения как на оперированной, так и на контралатеральной конечности. У трех пациентов с прогрессированием атеросклероза был диагностирован гемодинамически значимый стеноз в ПБА в средней и нижней трети оперируемой конечности, достигающий до 70-85%. В связи с этим, в дальнейшем, была

выполнена ангиопластика пораженного сегмента. Изначально данным пациентам была выполнена эндартерэктомия из ОБА с аутовенозной/аллопластикой пластикой с реканализацией, ЧТБА/стентирование артерий подвздошного сегмента.

У четырех пациентов было выявлено прогрессирование атеросклеротического поражения на контралатеральной конечности с развитием критической ишемии. Так, два пациента были госпитализированы в отделение сосудистой хирургии с диагнозом - Атеросклероз. Бедренно-подколенная окклюзия. III стадия заболевания. Стентирование ЧТБА ОПА, НПА, СБА. Эндартерэктомия из бедренных артерий с аутовенозной пластикой на контралатеральной конечности. По данным аортоартериографии артерий нижних конечностей на контралатеральной конечности обнаружена окклюзия в нижней трети ПБА протяженностью 4-5 см. В зоне ранее выполненного оперативного вмешательства остаточный стеноз составил до 40%. В дальнейшем данным пациентам было выполнено хирургическое вмешательство - ЧТБА ПБА в нижней трети с использованием антеградного трансфemorального доступа с получением периферического пульса. У двух других пациентов после стентирования НПА и БПШ при выполнении ангиографии артерий нижних конечностей на контралатеральной конечности была выявлена окклюзия ПБА и ПКА на всем протяжении - в первом случае, и окклюзия НПА и стенозы в ОПА до 80% во втором случае. В последующем первому пациенту было выполнено БПШ ниже щели коленного сустава с использованием аутовены; второму пациенту – линейное аорто-бедренное шунтирование с компенсацией кровообращения.

В экстренном порядке двое пациентов данной подгруппы поступили в отделение сосудистой хирургии с диагнозом - Атеросклероз. Острый тромбоз бедренно-подколенного шунта. Ишемия ПБ-ША степени. Изначально данным пациентам было выполнено стентирование НПА и БПШ выше щели коленного сустава с использованием синтетического протеза PTFE 8мм. При выполнении ДС артерий нижних конечностей, было выяснено, что стент в НПА проходим; БПШ тромбирован на всем протяжении; в ПКА лоцируется атеросклеротическая

бляшка с эффектом стеноза 70-80%, артерии голени кальцинированы, кровоток по ним не определяется. Интраоперационно при ревизии артерий нижних конечностей периферическое русло было признано неудовлетворительным, в связи с чем, была выполнена ампутация бедра в средней трети.

Необходимо также отметить, что из этих девяти пациентов у двух было выявлено увеличение процента стеноза во ВСА с 40% до 65%, что расценивалось как прогрессирование атеросклероза в другом сосудистом бассейне.

При сравнении исходных значений было отмечено увеличение количества маркера митохондриального пути апоптоза Вах ($p < 0,001$) при сниженном количестве ингибитора рецепторного пути sFas ($p = 0,012$) у пациентов с прогрессированием атеросклероза относительно его количества у остальных пациентов данной группы. При этом следует акцентировать внимание на том, что значение холестерина имеет прямую корреляцию с Вах ($r = +0,878$, $p = 0,002$) и обратную с sFas ($r = -0,823$, $p = 0,006$).

В первые часы после операции, маркер Вах ($p < 0,001$) значительно вырос, при снижении количества ингибитора рецепторного пути апоптоза маркера sFas ($p = 0,01$) и маркера VEGF A165 ($p = 0,01$). Повышенное количество Вах, как было выяснено в результате корреляционного анализа, привело к снижению значений маркера дисфункции эндотелия NO ($r = -0,827$, $p = 0,005$), а также VEGF A165 ($r = -0,778$, $p = 0,003$).

В первые сутки у пациентов с прогрессированием атеросклероза сильнее снизил свои значения маркер дисфункции эндотелия NO ($p < 0,001$) на фоне повышенного уровня проапоптотического маркера Вах ($p < 0,001$). Маркер NO связан как с маркером митохондриального пути апоптоза Вах ($r = -0,907$, $p < 0,001$), так и с ингибитором рецепторного пути sFas ($r = +0,815$, $p = 0,007$).

На 7-е и 14-е сутки сохранялся повышенным показатель PDGF BB ($p < 0,001$) при сниженных значениях NO на 14-е сутки у пациентов с прогрессированием атеросклероза, по сравнению с остальными пациентами данной группы. На 14-е сутки наблюдалось повышенное количество маркера PDGF BB, приведшее к снижению sFas ($r = -0,928$, $p < 0,001$). На 21-е сутки наблюдалась прямая связь

между маркерами sFas и PDGF BB ($r=+0,779$, $p=0,01$) у пациентов с прогрессированием атеросклероза. К концу первого месяца у пациентов с прогрессированием атеросклероза удерживался повышенным показатель пролиферации клеток PDGF BB ($p<0,001$) на фоне сниженного значения маркера дисфункции эндотелия NO ($p<0,001$).

Предварительно проведенный однофакторный анализ в отношении скоростного параметра кровотока RI на 1 месяц после проведенной реконструкции показал, что данный показатель может являться предиктором развития прогрессирования атеросклероза. Благодаря применению метода логистической регрессии как бинарного классификатора, с последующим использованием Рос-кривых, были получены пороговые значения для следующих маркеров представленных в таблице 19.

Таблица 19 - Рос-анализ для маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы С с прогрессированием атеросклероза

Пороговые значения	95% ДИ	AUC	Sp, %	Se, %	p
Вах исходно					
$\geq 26,4$ нг/мл	0-1,0	0,98	90	90	0,01
sFas исходно					
$\leq 0,915$ нг/мл	0,6-0,9	0,77	51	85	0,02
Вах в первые часы					
$\geq 34,4$ нг/мл	0-1	0,94	75	90	0,01
sFas в первые часы					
$\leq 0,67$ нг/мл	0,6-0,9	0,77	83	88	0,04
NO на первые сутки					
≤ 116 ммоль/л	0-1	0,97	90	100	0,01
PDGF BB на 7 сутки					
$\geq 28,2$ нг/мл	0-1	0,96	93	93	0,01
PDGF BB на 14 сутки					
$\geq 28,5$ нг/мл	0-1	0,96	80	96	0,01
PDGF BB на 1 месяц					
$\geq 15,7$ нг/мл	0-1	1,0	100	100	0,01
NO на 1 месяц					
≤ 215 ммоль/л	0,7-0,96	0,82	75	100	0,01

Значения RI у пациентов с прогрессированием атеросклероза составили 1,4 [1,2; 1,5] и были в 1,3 раза повышены ($p<0,001$) в сравнении с его значениями у пациентов группы С без данного осложнения - 1,1 [1; 1,2] к концу первого месяца. При этом значения данного показателя были взаимосвязаны со значениями маркера пролиферации PDGF BB ($r=+0,762$, $p=0,01$).

В результате применения многофакторного анализа по статистически значимым результатам однофакторного анализа ($p<0,05$), проведенного с использованием логистической регрессии, нам удалось выявить следующие факторы риска: исходные и на первые часы значения Вах и sFas, NO на 1 сутки, значения PDGF BB на 7, 14 сутки и 1 месяц (Таблица 20).

Таблица 20 - Выявление факторов риска прогрессирования атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде у пациентов группы С

Показатели		Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
Маркер	Период	RR	95% ДИ	p-value	RR	95% ДИ	p
Вах	Исходно	8,7	1,4; 55	0,02	9,1	1,4; 59	0,02
sFas	Исходно	2,5	1; 2,7	0,05			
Вах	Первые часы	4	1,2; 13,7	0,03	4,66	0,08; 14,9	0,03
sFas	Первые часы	2,1	1; 4,4	0,048			
NO	1 сутки	18,2	1,2; 272	0,04	NA	NA	NA
PDGF BB	7 сутки	9,6	1,5; 62	0,02	NA	NA	NA
PDGF BB	14 сутки	8,7	1,4; 55	0,02	NA	NA	NA
PDGF BB	1 месяц	18,2	1,2; 27,2	0,02	NA	NA	NA
RI	1 месяц	4,5	1,3; 15,3	0,02	NA	NA	NA

Для оценки вероятности прогрессирования атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде был применен метод бинарной логистической регрессии.

Данный метод позволил выявить уравнение регрессии:

$$Y = -27,134 + 1,028x,$$

где: x – исходные значения маркера Вах до операции. R-квадрат Найджелкерка составил 0,9 ($R^2=0,9$). Значимость модели – $p<0,001$

Расчёт вероятности прогрессирования атеросклероза:

$$P = 1 / (1 + e^{-Y}), \quad (3)$$

где: P – вероятность прогрессирования атеросклероза, e – основание натурального логарифма (число Эйлера), Y – значение, полученное в уравнении регрессии.

Таким образом, определение исходного количества Вах до операции у пациентов с ОААНК с ПБ-III стадией заболевания, которым будут выполнены гибридные вмешательства на артериях нижних конечностей позволяет прогнозировать риск прогрессирования атеросклеротического поражения в отдаленном послеоперационном периоде.

При выполнении ДС-контролей артерий нижних конечностей 27 (60%) пациентам группы С с нормальным течением послеоперационного периода, толщина неоинтимы составила через год 1,1 [0,9; 1,3] мм. Через 1,5 года наблюдалось увеличение толщины неоинтимы до 1,3 [0,95; 1,4] мм ($p < 0,05$). Через 2 года рост неоинтимы относительно 1,5 лет ($p > 0,05$) не произошел, ее толщина составила 1,32 [0,95; 1,5] мм. При этом значения V_{ps} составили 78 [74; 84] см/с, 78 [72; 82] см/с, 77 [71; 83] см/с через 1, 1,5, 2 года соответственно, без достоверно значимых различий между данными периодами времени ($p < 0,05$). По данным УЗДГ через 2 года ЛПИ составил 0,86 [0,8; 1] на оперированной конечности.

Летальные исходы в группе С составили 3 (6,6 %) случая. Причиной одного летального исхода стала коронавирусная инфекция Covid-19, в двух других ишемический инсульт.

3.5. Исследование динамики изменения маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы D и их роли в развитии отдаленных послеоперационных осложнений

В результате предварительных расчетов (мощность исследования $\beta > 0,8$; $p < 0,05$) для выявления достоверно значимых различий между исследуемыми показателями в группе D для сравнения различных подгрупп, был определен минимальный объем пациентов исследования, который составил 31.

В данной группе исходно были отмечены повышенные значения PDGF BB, VEGF A165 ($p<0,001$) и Вах ($p<0,001$) при сниженном уровне sFas ($p<0,001$), Bcl-2 ($p<0,001$), NO ($p<0,001$) в сравнении со значениями у здоровых добровольцев (Таблица 21). С ростом стадии заболевания было отмечено соответствующее повышение исходных значений маркера PDGF BB ($p=0,003$). У пациентов, с наличием ишемической болезни сердца, наблюдался исходно пониженный уровень маркера sFas по сравнению с пациентами без вышеуказанной сопутствующей патологии ($p<0,001$).

Таблица 21 - Сравнение исходных значений исследуемых показателей у пациентов группы D со здоровыми добровольцами

Показатели, Me [Q1-Q3]	Вах (нг/мл)	Bcl-2 (нг/мл)	sFas (нг/мл)	PDGF BB (нг/мл)	NO (ммоль/л)	VEGF A165 (пг/мл)
Здоровые добровольцы	15,1 [13,9; 15,7]	5,3 [4,9; 5,7]	1,1 [0,97; 1,2]	8,9 [8,1; 9,5]	340,4 [306; 377]	86 [67; 107]
Пациенты группы D	24,4 * [23,6; 25,4]	4,6* [4,1; 4,9]	0,93* [0,8; 0,96]	13,4* [12,9; 14]	243 * [236; 250]	367* [305; 402]
*-статистически значимая разница, $p<0,05$						

В первые часы после операции, наблюдалось достижение маркером Вах ($p<0,001$) пиковых значений, на фоне снижения белка Bcl-2 ($p<0,001$) и VEGF A165 ($p<0,001$) по сравнению с исходными значениями. Выполнение многоуровневых артериальных реконструкций повлекло за собой более сильное снижение значений маркера Bcl-2 на фоне повышенного количества Вах в сравнении с пациентами с одноуровневыми вмешательствами в первые часы после операции ($p=0,04$) (Рисунки 29-31).

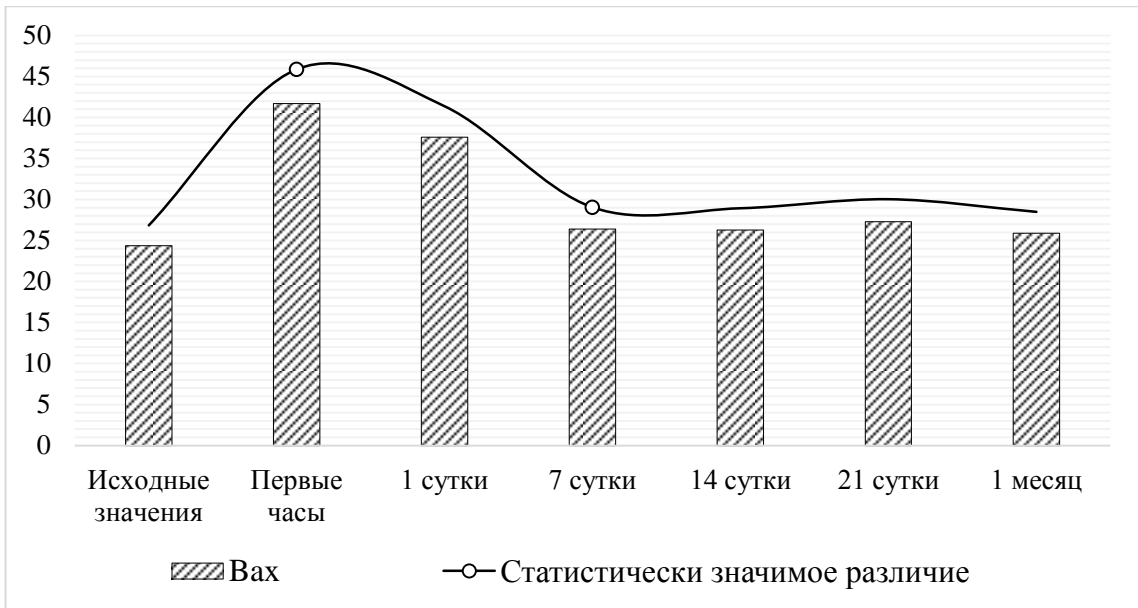


Рисунок 29 - Динамика изменения значений Вах в различные сроки послеоперационного периода у пациентов группы D

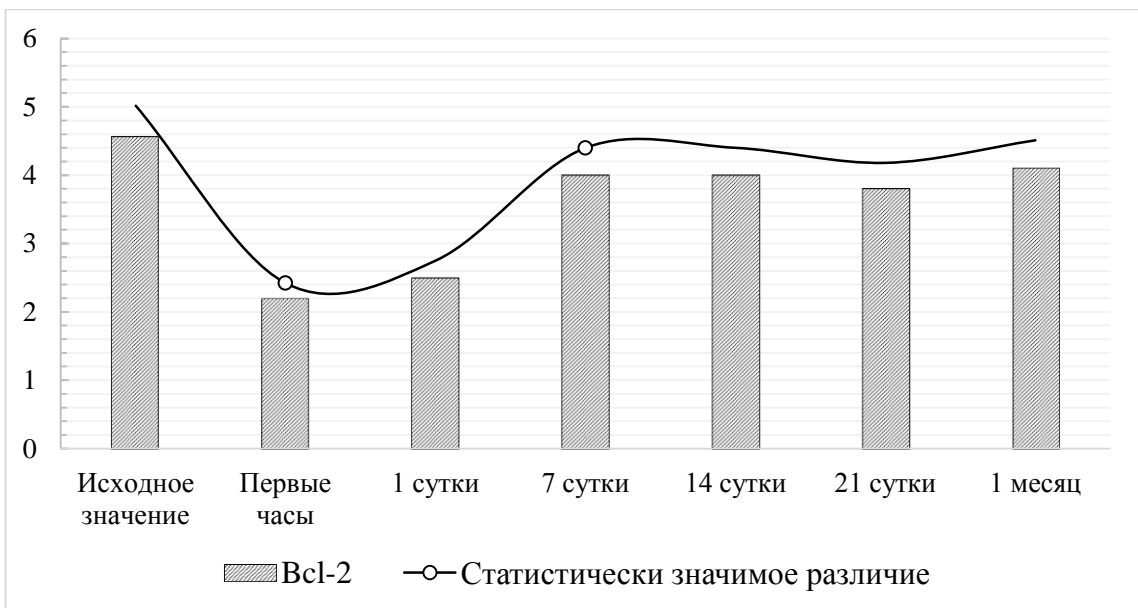


Рисунок 30 - Динамика изменения значений Всl-2 в различные сроки послеоперационного периода у пациентов группы D

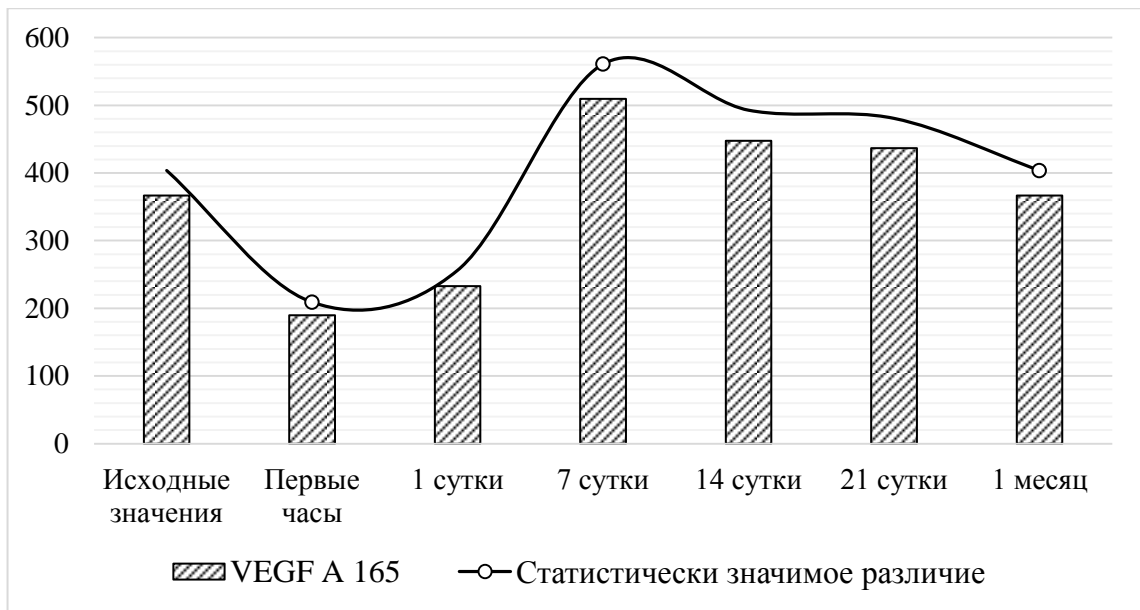


Рисунок 31 - Динамика изменения значений VEGF A165 в различные сроки послеоперационного периода у пациентов группы D

На 1-е сутки произошло повышение количества PDGF BB ($p=0,04$) при задерживающихся на том же уровне значениях Вах ($p=0,845$), Bcl-2 ($p=0,733$), sFas ($p=0,575$).

Однако, количество NO ($p<0,001$) существенно снизилось по сравнению с их значениями в первые часы после операции. Повышенное количество лейкоцитов на 1 сутки приводило к снижению значений количества маркера Bcl-2 ($r=-0,878$, $p=0,001$).

К концу первой недели пиковых значений достиг показатель PDGF BB ($p<0,001$) и VEGF A165 ($p<0,001$) на фоне снижения Вах ($p<0,001$) и повышения количества NO ($p<0,001$), Bcl-2 ($p<0,001$) по сравнению со значениями на 1 сутки (Рисунок 32).

Проведенный корреляционный анализ на 7-е сутки выявил обратную взаимосвязь между маркерами Вах и PDGF BB ($r=-0,675$, $p=0,01$) и прямую между значениями показателей NO и VEGF A165 ($r=+0,641$, $p=0,01$).

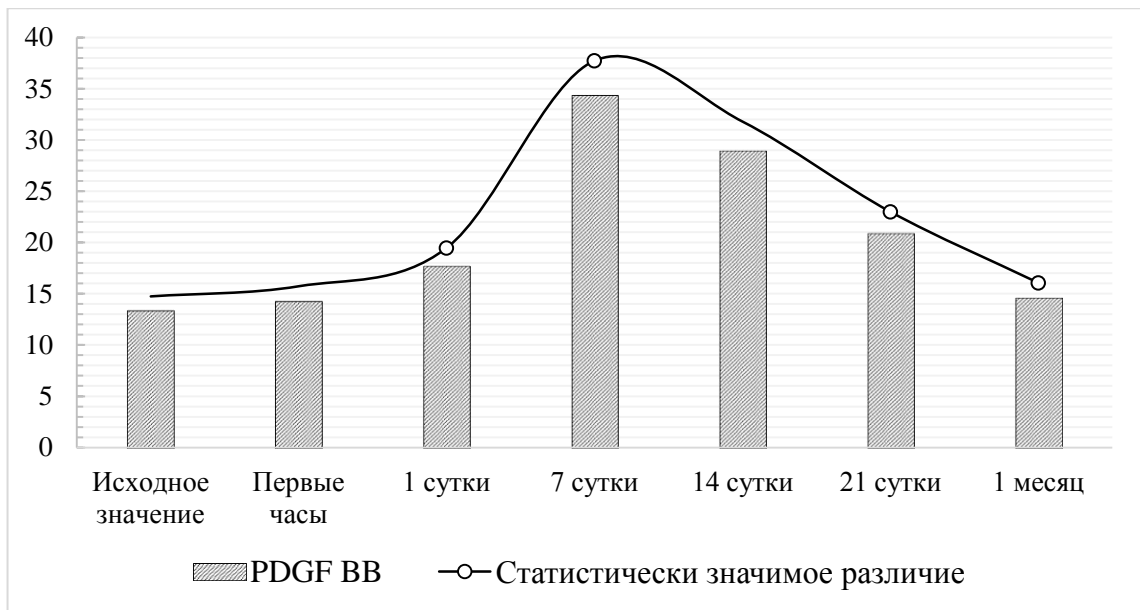


Рисунок 32 - Динамика изменения значений PDGF BB в различные сроки послеоперационного у пациентов группы D

К концу второй недели наблюдалось увеличение количества NO ($p < 0,001$) до максимальных значений по сравнению с его значениями на 7 сутки (Рисунок 33).

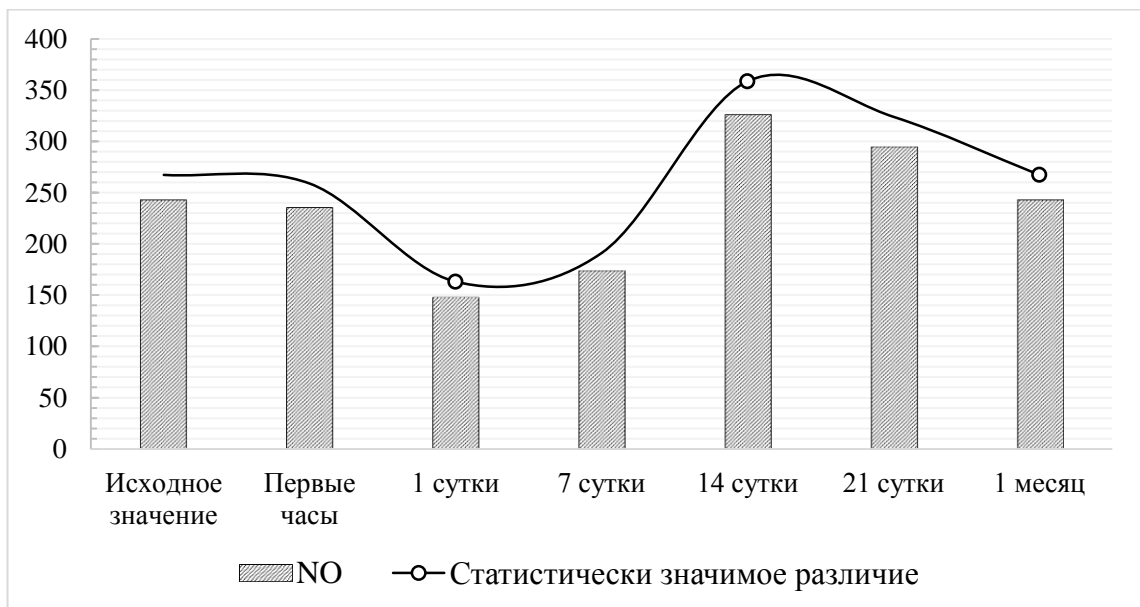


Рисунок 33 - Динамика изменения значений метаболитов оксида азота в различные сроки послеоперационного периода у пациентов группы D

На 21-е сутки происходит выраженное снижение количества sFas ($p<0,001$) и PDGF BB ($p=0,003$) по сравнению с их количеством на 14-е сутки (Рисунок 34).

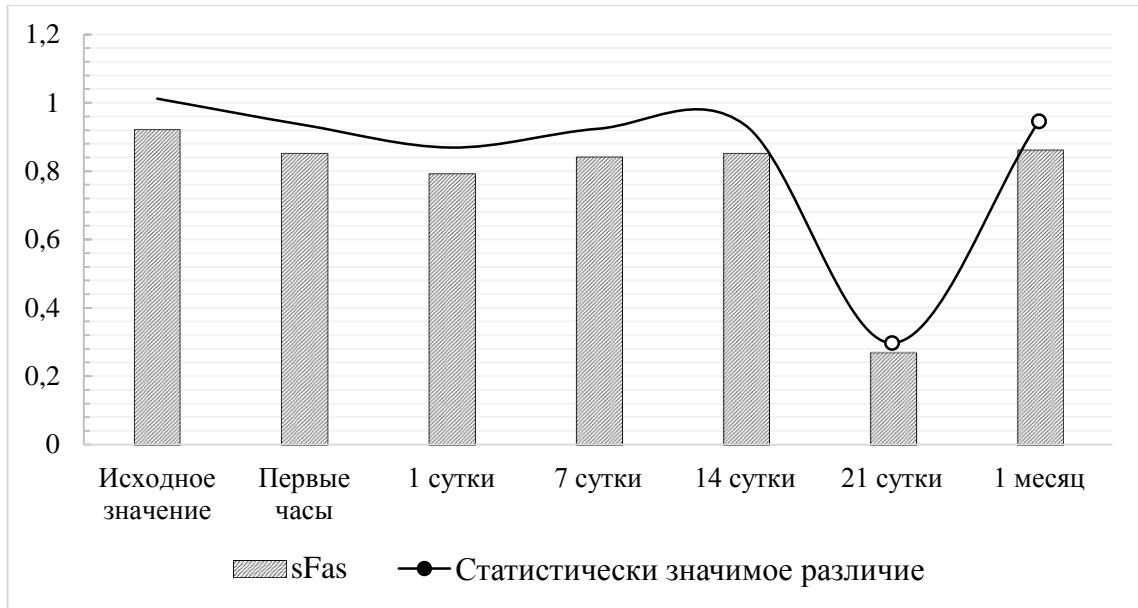


Рисунок 34 - Динамика изменения значений sFas в различные сроки послеоперационного периода у пациентов группы D

К концу 1-го месяца продолжается дальнейшее снижение значений PDGF BB ($p<0,001$), VEGF A165 ($p=0,029$) и NO ($p<0,001$) на фоне роста уровня sFas ($p<0,001$) по сравнению с 21 сутками.

При проведении корреляционного анализа у пациентов группы D с нормальным течением послеоперационного периода были выявлены взаимосвязи между маркерами VEGF A165 и Bcl-2 ($r=+0,631$, $p=0,01$) в первые часы; Вах и NO ($r=-0,47$, $p=0,02$) на 1-е сутки; между Вах и NO ($r=-0,624$, $p<0,001$), VEGF A165 и NO ($r=+0,641$, $p=0,01$) на 7-е сутки; sFas и PDGF BB ($r=-0,708$, $p<0,001$), NO и VEGF A165 ($r=+0,574$, $p<0,001$) на 14-е сутки.

Первичная проходимость после выполнения открытых вмешательств на артериях нижних конечностей у пациентов группы D через 1 и 2 года составила 87% и 60% соответственно.

Отдаленные результаты открытых оперативных вмешательств у пациентов группы D представлены в Таблице 22.

Таблица 22 - Клинические исходы открытых оперативных вмешательств у пациентов группы D

Вид исхода	Количество пациентов, n (%)	Срок возникновения, Ме [Q1; Q3]
Прогрессирование атеросклероза	12 (26,6%)	19 [18; 20]
Прогрессирование атеросклероза в других сосудистых бассейнах	3 (6,6%)	19 [18; 20]
Рестеноз зоны реконструкции	6 (13,3%)	11 [10; 12]
Тромбозы	14 (31,1%)	18 [12; 20]
Ампутации	5 (11,1%)	19 [18; 20]
Летальные исходы	3 (6,6%)	-

Через 19 [18; 20] месяцев у 12 пациентов (26,6%) группы D было диагностировано прогрессирование атеросклеротического поражения, подтвержденное данными ДС и ангиографией артерий нижних конечностей.

У четырех пациентов после выполнения БПШ выше щели коленного сустава синтетическим протезом «Intergard 8 мм» в указанный срок появился болевой синдром в покое в контралатеральной конечности. У трех пациентов по данным аортоартериографии была выявлена окклюзия ПБА на всем протяжении с заполнением подколенной артерии выше щели коленного сустава; ПКА и артерии голени с неровностью контуров. В плановом порядке данным пациентам было выполнено БПШ выше щели коленного сустава синтетическим протезом. У четвертого пациента во время проведения ангиографии артерий нижних конечностей была выявлена окклюзия длиной 4 см в нижней трети ПБА с последующим проведением реканализации и ангиопластики данного сегмента.

Пять пациентов были госпитализированы в стационар в экстренном порядке с диагнозом: Атеросклероз. Острый тромбоз бедренно-подколенного шунта ниже щели коленного сустава. Ишемия ПБ степени. ДС артерий нижних конечностей, согласно которому: подвздошный сегмент проходим, БПШ тромбирован, по ПКА и артериям голени кровотоков не лоцируется. После получения всех необходимых анализов в экстренном порядке пациент был доставлен в операционную, где была выполнена ревизия артерий подколенно-берцового сегмента. Периферическое русло было признано неудовлетворительным и выполнена ампутация бедра.

В результате проведения контрольных визитов после открытых реконструкций, у троих из двенадцати пациентов была выявлена посттромботическая окклюзия синтетических БПШ выше щели коленного сустава с развитием критической ишемии конечности. При дообследовании пациентов были обнаружены гемодинамически значимые стенозы в ПкА до 80%, а также стеноз в устье ГАБ доходящий до 70%. БПШ тромбированы, по артериям голени определялся коллатеральный кровоток. Впоследствии данные пациенты перенесли бедренно-подколенное рещунтирование с использованием свежеприготовленных аллографтов с выполнением эндартерэктомии из ГАБ. В послеоперационном периоде выполнен ДС контроль артерий нижних конечностей с подтверждением проходимости зоны оперативного вмешательства.

Необходимо также отметить, что из этих 12 пациентов у трех было выявлено увеличение процента стеноза во ВСА с 40% до 55%, что расценивалось как прогрессирование атеросклероза в другом сосудистом бассейне.

В последующем представляется необходимым проведение анализа динамики изменения исследуемых маркеров у пациентов с прогрессированием атеросклероза в сопоставлении с их значениями у пациентов с нормальным течением послеоперационного периода.

Исходные значения маркера митохондриального пути апоптоза Вах ($p < 0,001$) были увеличены при сниженном количестве исходного ингибитора рецепторного пути sFas ($p = 0,002$) у пациентов с прогрессированием атеросклероза в сравнении с его количеством у остальных пациентов данной группы.

В первые часы после операции наблюдалось повышение проапоптотического маркера Вах ($p < 0,001$), на фоне уменьшения количества маркера sFas ($p < 0,001$) и биомаркера VEGF A165 ($p < 0,001$).

В первые сутки у пациентов с прогрессированием атеросклероза наиболее сильно отреагировал маркер пролиферации клеток PDGF BB ($p < 0,001$) и Вах ($p < 0,001$) при падении уровня NO ($p < 0,001$) на фоне сохраняющегося снижения значений маркера sFas ($p < 0,001$).

На 7-е сутки сохранялся повышенным показатель PDGF BB ($p<0,001$) у пациентов с прогрессированием атеросклероза в сравнении с остальными пациентами данной группы. На 14-е сутки маркер пролиферации PDGF BB ($p<0,001$) оставался повышенным на фоне сниженных значений NO ($p<0,001$).

К концу первого месяца у пациентов с прогрессированием атеросклероза наблюдалось сохранение высоких значений показателя пролиферации клеток PDGF BB ($p<0,001$) и низких значений NO ($p<0,001$) (Рисунок 35). Значение RI у пациентов с прогрессированием атеросклероза составило 1,3 [1,2; 1,3], что в 1,2 раза больше значений у пациентов без данного осложнения – 1,1 [1,09; 1,2] ($p<0,01$).

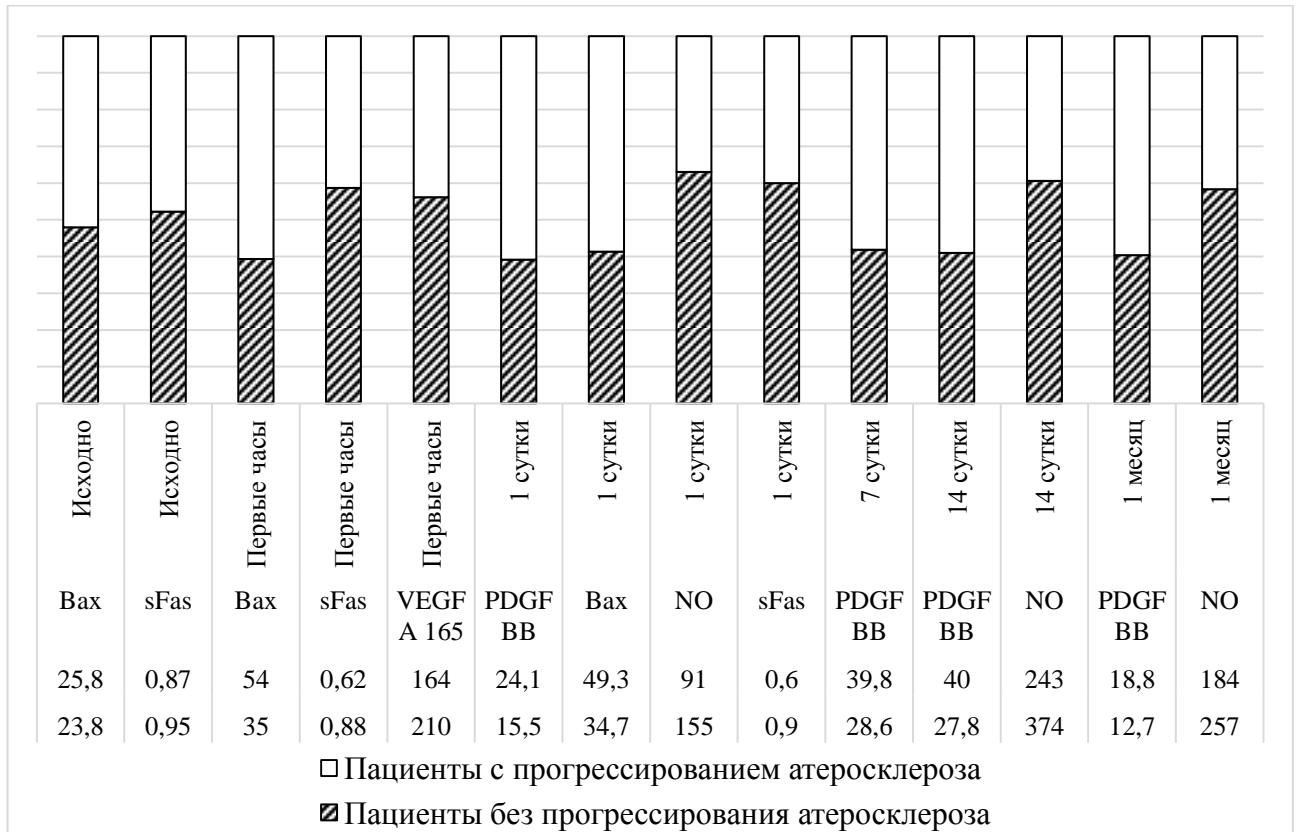


Рисунок 35 - Сравнение значений исследуемых показателей у пациентов группы D с прогрессированием и без прогрессирования атеросклероза

В результате проведения корреляционного анализа у пациентов группы D с прогрессированием атеросклеротического поражения были выявлены следующие взаимосвязи между показателями: исходные значения маркера sFas и холестерина ($r=-0,742$, $p=0,005$), VEGF A165 и Вах ($r=-0,877$, $p<0,01$) в первые часы; sFas и NO

($r=+0,822$, $p=0,001$), Вах и NO ($r=-0,840$, $p<0,001$), Вах и PDGF BB ($r=+0,854$, $p<0,001$), sFas и PDGF BB ($r=-0,823$, $p<0,001$) на 1 сутки; PDGF BB и NO ($r=-0,809$, $p=0,001$) на 7 сутки; PDGF BB и sFas на 14 сутки ($r=-0,896$, $p=0,001$), PDGF BB и RI ($r=+0,705$, $p=0,01$) к концу первого месяца.

При проведении однофакторного анализа предиктором прогрессирования атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде выступило количество реконструированных сегментов (RR=0,31; 95%; DI 0,13; 0,8, $p=0,01$).

В результате проведения регрессионного анализа с последующим отображением результатов в виде Рос-кривых были получены пороговые значения для маркеров ассоциированных с прогрессированием атеросклероза (Таблица 23).

Таблица 23 - Рос-анализ для маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы D с прогрессированием атеросклероза

Пороговые значения	95% ДИ	AUC	Sp, %	Se, %	p
Вах исходно					
$\geq 25,4$ нг/мл	0,86-1,0	0,94	75	90	0,01
sFas исходно					
$\leq 0,89$ нг/мл	0,64-0,91	0,78	50	86	0,03
Вах в первые часы					
≥ 50 нг/мл	0,82-1	0,91	89	88	0,01
VEGF A165 в первые часы					
≤ 202 пг/мл	0,6-0,88	0,74	57	92	0,01
sFas в первые часы					
$\leq 0,7$ нг/мл	0,7-0,96	0,83	86	84	0,01
NO на первые сутки					
≤ 118 ммоль/л	0-1	0,97	94	94	0,01
PDGF BB на 7 сутки					
$\geq 36,5$ нг/мл	0-1	0,98	84	100	0,01
PDGF BB на 14 сутки					
$\geq 35,7$ нг/мл	0-1	0,99	83	93	0,01
NO на 14 сутки					
≤ 255 ммоль/л	0,5-0,9	0,74	92	66	0,02
PDGF BB на 1 месяц					
$\geq 13,4$ нг/мл	0,8-1	0,92	70	100	0,01
NO на 1 месяц					
≤ 213 ммоль/л	0,96-1	0,99	96	100	0,01

По результатам многофакторного анализа нам удалось выявить следующие факторы риска: исходные и на первые часы значения Вах и sFas, NO на 1-е сутки, PDGF BB на 7 и 14-е сутки, NO и PDGF BB на 1 месяц (Таблица 24).

Таблица 24 - Выявление факторов риска прогрессирования атеросклероза после реконструктивных вмешательств у пациентов группы D

		Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
Маркер	Период	RR	95% DI	p-value	RR	95% DI	p
Вах	Исходно	5,55	1,56; 19,7	0,01	25,5	1,6; 387	0,01
sFas	Исходно	3,65	1,08; 12,1	0,03			
Вах	Первые часы	11,6	1,77; 76	0,01	24,6	1,6; 373	0,02
sFas	Первые часы	1,93	1,09; 3,4	0,02			
VEGF A 165	Первые часы	2,47	1,09; 5,6	0,03	NA	NA	NA
NO	1 сутки	25,6	1,68; 76,0	0,02	NA	NA	NA
PDGF BB	7 сутки	11,6	1,77; 76	0,01	NA	NA	NA
PDGF BB	14 сутки	5,62	1,58; 20	0,007	NA	NA	NA
NO	14 сутки	2,71	1,21; 6	0,02	NA	NA	NA
PDGF BB	1 месяц	3,6	1,3; 9,6	0,01	25,5	1,7; 387	0,01
NO	1 месяц	11,6	1,77; 76	0,01			

Выявленные маркеры апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия в такие моменты времени как до операции, на первые часы, 1, 7 и 14 сутки у пациентов группы D, ассоциированные с прогрессированием атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде совпадали с маркерами группы С.

Для вероятностной оценки прогрессирования атеросклероза у пациентов группы D в отдаленном послеоперационном периоде, использовалась бинарная логистическая регрессия с сигмоидальной функцией активации.

R-квадрат Найджелкерка составил 0,627 ($R^2=0,627$). Статистическая значимость модели – $p<0,001$. Уравнение регрессии:

$$Z = 3,413 - 3,815x_1 - 1,137x_2,$$

где: x_1 – количество sFas в первый час после операции,

x_2 – количество Вах в первый час.

Расчёт вероятности прогрессирования атеросклероза:

$$P = 1 / (1 + e^{-Z}), \quad (4)$$

где P – вероятность прогрессирования атеросклероза,

e – основание натурального логарифма (число Эйлера),

Z – значение, полученное в уравнении регрессии.

В срок до 11 [10; 12] месяцев, у 6 (13,3%) пациентов группы D произошло развитие рестеноза зоны реконструкции на оперированной конечности. По данным ДС была обнаружена посттромботическая окклюзия синтетических БПШ на фоне критического стеноза в зоне дистального анастомоза. У пациентов была диагностирована III стадия заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна. На контрольном осмотре пациентов через 6 месяцев стеноз в области дистального анастомоза составил 40-45%. При этом толщина неоитимы в протезах составляла 2,2 [2,0; 2,3] мм и превышала ее размер в 2 раза в сравнении с пациентами без рестеноза зоны вмешательства ($p < 0,001$) перед развитием тромботической окклюзии бедренно-подколенных шунтов. После дообследования, пяти пациентам было выполнено бедренно-подколенное рещунтирование выше щели коленного сустава с компенсацией кровообращения в оперированной конечности. У последнего пациента данной подгруппы после проведения консервативной терапии наблюдалось уменьшение болевого синдрома и необходимости в проведении повторных артериальных реконструкций не возникло.

У пациентов с рестенозом зоны реконструкции в первые часы после операции было повышено количество маркера митохондриального пути апоптоза Вах ($p < 0,001$) при сниженных значениях показателей Bcl-2 ($p < 0,001$) и VEGF A165 ($p < 0,001$) в сравнении с остальными пациентами данной группы.

К концу 1-х суток после операции у пациентов с рестенозом произошло резкое снижение уровня NO ($p < 0,001$) в ответ на усиленный апоптоз в виде повышенного Вах ($p = 0,01$) по сравнению с остальными пациентами данной группы.

На 7-е сутки наблюдалось достижение пикового уровня маркера пролиферации клеток PDGF BB ($p < 0,001$) при сниженных значениях NO ($p < 0,001$) и VEGF A165 ($p < 0,001$) у пациентов с рестенозом относительно остальных пациентов этой группы.

На 14-е сутки было обнаружено значительное снижение NO ($p < 0,001$) у пациентов с рестенозом в сравнении с остальными пациентами данной группы.

На 21-е сутки у пациентов с рестенозом, активация второй волны апоптоза замечена не была, более того, показатель маркера sFas ($p < 0,001$) был значительно выше, и на этом фоне сохранялся повышенным показатель пролиферации PDGF BB ($p < 0,001$) у данных пациентов в сравнении с остальными пациентами этой группы. В связи с недостаточной эффективностью второй волны апоптоза, у пациентов с рестенозом зоны реконструкции был повышен маркер пролиферации PDGF BB ($p < 0,001$) при сниженных значениях VEGF A165 ($p < 0,001$) по сравнению с остальными пациентами данной группы к концу первого месяца (Рисунок 36).

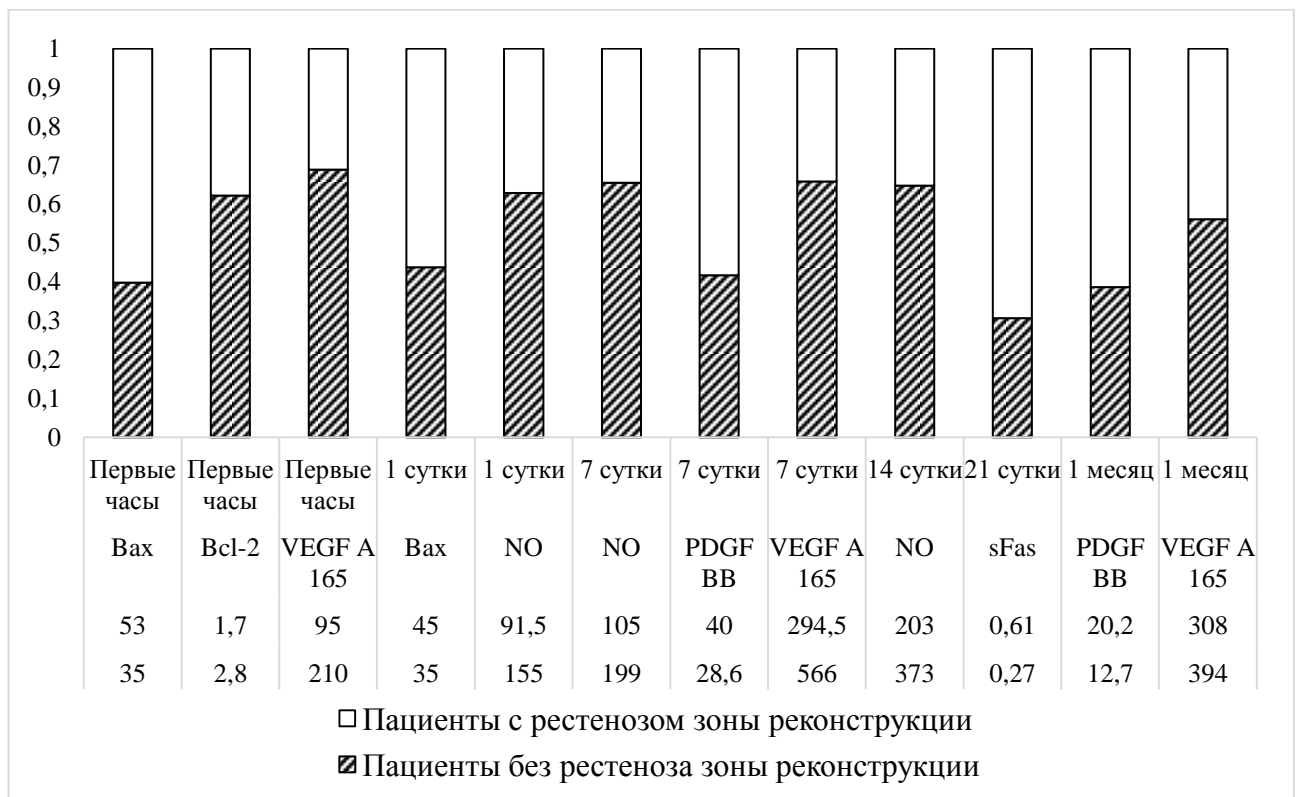


Рисунок 36 - Сравнение значений исследуемых показателей у пациентов группы D с и без рестеноза зоны реконструкции

К концу первого месяца у пациентов с рестенозом зоны реконструкции значения V_{ps} составляли 115 [112; 120] см/с и превышали в 1,2 раза значения пациентов без данного осложнения - 99 [94; 102] ($p=0,01$). При этом значения RI у пациентов с рестенозом составили 0,82 [0,7; 0,9] и были снижены в сравнении со значениями пациентов группы D без данного осложнения 1,27 [1,2; 1,3] ($p<0,01$).

Коэффициенты корреляции, полученные для маркеров апоптоза, пролиферации и дисфункции у пациентов группы D с рестенозом зоны реконструкции, подтверждают наши выводы. Наблюдались следующие связи между маркерами у пациентов с рестенозом зоны реконструкции: первые часы: Bcl-2 и VEGF A165 ($r=+0,971$, $p=0,01$); 1-е сутки: Вах и NO ($r=-0,886$, $p=0,019$), Bcl-2 и PDGF BB ($r=-0,927$, $p=0,008$), Bcl-2 и NO ($r=+0,985$, $p<0,001$); 14-е сутки: VEGF A165 и NO ($r=+0,942$, $p=0,001$); 21-е сутки: PDGF BB и sFas ($r=+0,898$, $p=0,014$).

Из-за малого количества пациентов в группе D с рестенозом зоны реконструкции, применение логистической регрессии, и как следствие Ros – анализа является малоэффективным.

В последующем мы провели оценку роста толщины неоинтимы в зоне проведенных реконструкций в отдаленном послеоперационном периоде с использованием ДС артерий нижних конечностей. Так, у 27 (60%) пациентов с нормальным течением послеоперационного периода, толщина неоинтимы составила через год 1,2 [1; 1,3] мм. Через 1,5 года наблюдалось увеличение толщины неоинтимы до 1,3 [1,1; 1,4] мм ($p<0,05$). Через 2 года наблюдался незначительный рост неоинтимы относительно 1,5 лет, значение которого составило 1,35 [1,2; 1,6] мм ($p>0,05$). При этом значения V_{ps} составили 98 [93; 100] см/с, 95 [91; 99] см/с, 91 [85; 100] см/с через 1, 1,5, 2 года соответственно, без достоверно значимых различий между данными периодами времени ($p>0,05$). По данным УЗДГ, через 2 года ЛПИ составил 0,85 [0,7; 0,9] на оперированной конечности.

Летальные исходы в группе D составили 3 (6,6%) случая; у двух пациентов причиной смертей стал инфаркт миокарда, у третьего причина неизвестна.

3.5.1. Сравнение показателей апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия в послеоперационном периоде у пациентов оперативных групп В-D

Любое оперативное вмешательство приводит к повреждению клеток сосудистой стенки. Однако, по степени воздействия различные виды артериальных вмешательств могут отличаться друг от друга. Поэтому, одним из этапов исследования явилось изучение влияния эндоваскулярных, гибридных и открытых вмешательств на динамику изучаемых биомаркеров в послеоперационном периоде. Так, при сравнении исходных значений всех исследуемых показателей, статистически значимых различий получено не было ($p>0,05$).

В первые часы у пациентов группы D было более выражено повышение количества маркера Вах на фоне снижения значений маркеров Vcl-2 в сравнении с их значениями у пациентов группы В и С ($p<0,05$).

На первые сутки после операции маркер митохондриального пути апоптоза Вах удерживался на высоком уровне у пациентов группы D в сравнении с его значениями у пациентов групп В и С ($p<0,001$). При этом стоит отметить, что маркер дисфункции эндотелия NO был достоверно снижен в сравнении с его значениями у пациентов группы В ($p=0,001$) и С ($p=0,01$).

К концу первой и второй недели показатель пролиферации PDGF BB был повышен у пациентов группы D относительно групп В ($p<0,001$) и С ($p<0,001$).

На 21-е сутки были достоверно значимо снижены значения sFas у пациентов группы D в сравнении с пациентами группы В ($p<0,001$) и группы С ($p<0,001$) (Рисунок 37). Однако, к концу первого месяца статистически значимых различий между исследуемыми группами получено не было ($p>0,05$).

Сопоставляя влияние различных вмешательств на маркеры апоптоза, пролиферации и дисфункции эндотелия, было доказано, что эндоваскулярные и гибридные вмешательства оказывают одинаковое воздействие на исследуемые показатели.

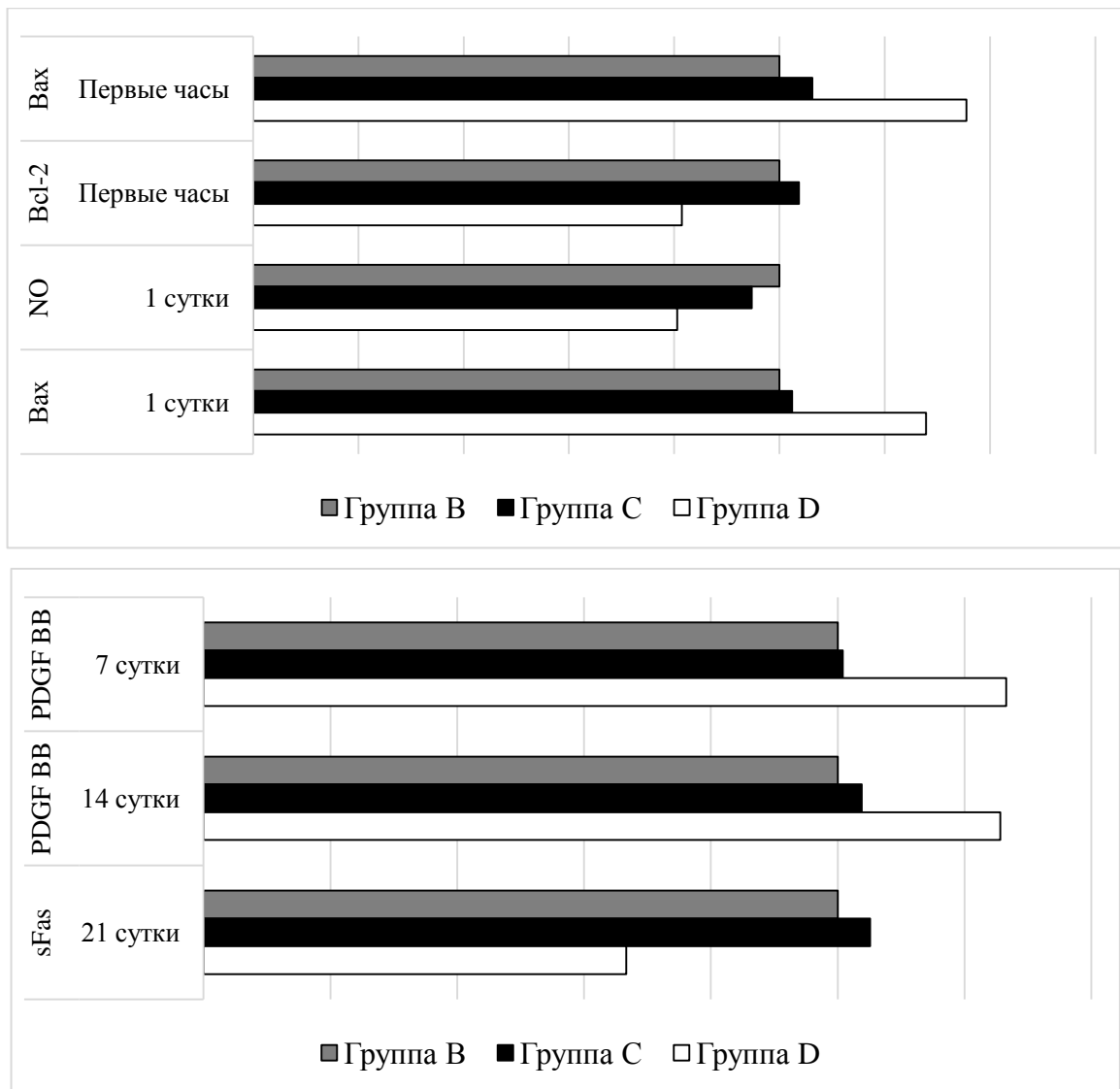


Рисунок 37 - Сравнение показателей апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия в послеоперационном периоде между исследуемыми группами В-Д

Открытые операции ведут к более интенсивной активации маркеров митохондриального пути апоптоза по сравнению с гибридными и эндоваскулярными вмешательствами. Выражается это в значительном снижении NO к 1-ым суткам с выраженной ответной пролиферацией клеток на 7-е и 14-е сутки, а также в виде более сильной активации второй волны апоптоза, с нормализацией значений исследуемых показателей к концу 1-го месяца. С нашей точки зрения, данное явление может быть обусловлено значительной травмой, как непосредственно самой артериальной стенки, так и окружающих тканей при

выполнении открытых вмешательств на артериях нижних конечностей. Другой возможной причиной объяснения данных результатов является тот момент, что при выполнении открытой реконструкции формируется обходной путь для восстановления кровотока с сохранением атеросклеротически измененного исходного сегмента.

Анализируя полученные результаты исследования нам удалось доказать наличие двух волн апоптоза, отраженных в динамике исследуемых маркеров. Была доказана их антагонистическая природа действия в восстановлении сосудистой стенки в зоне реконструкции в послеоперационном периоде. Так, активация проапоптотических маркеров в первую волну апоптоза, длительностью в 7 дней приводила к активации маркеров, ответственных за пролиферацию клеток сосудистой стенки и дисфункции эндотелия в последующем. Помимо этого, анализ отношения рисков позволил выявить предикторы, ассоциирующиеся с риском развития рестеноза зоны реконструкции после различных видов оперативных вмешательств в отдаленном послеоперационном периоде. Такими явились повышенные значения маркера митохондриального пути Вах на фоне сниженного количества Bcl-2 в первые часы после различных видов артериальных вмешательств. В случае с прогрессированием атеросклероза, активация одновременно двух путей апоптоза как до вмешательства, так и в первые часы - сутки после операции была ассоциирована с развитием данного осложнения. Полученная в результате применения корреляционного анализа оценка взаимосвязи между биомаркерами первой и второй волны свидетельствует об их прямой зависимости и воздействии на дисфункцию эндотелия и пролиферацию клеток.

По результатам многофакторного анализа, биомаркеры-предикторы и их количественные значения выступили основанием поиска новых профилактических, терапевтических стратегий, направленных на снижение риска развития рестеноза зоны реконструкции, прогрессирования атеросклероза, гиперплазии неоинтимы и последующих сосудистых осложнений в послеоперационном периоде.

В связи с этим мы начали поиск препаратов, которые оказывают непосредственное влияние на триггеры первой волны апоптоза, одним из которых является оксидативный стресс.

В последующем нами была выбрана стратегия лечения, направленная на сдерживание апоптоза в первую волну, которая описывается следующей схемой: витамин Е в дозе 400 МЕ/сутки за неделю до операции в сочетании с внутривенно капельным введением препарата «Актовегин»® в дозе 1200 мг интраоперационно, а затем сочетание двух препаратов в течение первой недели после операции дополнительно к базисной терапии.

Выбор именно антиоксидантов, а не другой фармакотерапии обосновывается, прежде всего, целенаправленностью действия данной группы препаратов на процессы свободнорадикального окисления клеточных структур и биомолекул. Сразу стоит отметить, что назначение антиоксидантной терапии должно именно модулировать апоптотический ответ на механическое повреждение сосудистой стенки, а не полностью подавлять апоптоз. Обновление клеток через апоптотический путь - необходимый процесс, который направлен на поддержание клеточного гомеостаза.

Сроки назначения вышеуказанной терапии обусловлены следующими моментами: во-первых, исходным проапоптотическим статусом пациентов с ОААНК. Во-вторых, воздействием операционной травмы на активацию системы апоптоза. В-третьих, непосредственно периодом действия первой волны апоптоза.

3.6. Динамика изменения маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы Е и их влияние на отдаленные результаты оперативного лечения

Предварительно, основываясь на результатах пилотного исследования, нами было определено минимально возможное количество пациентов в группах для выявления статистически значимого различия между исследуемыми показателями у пациентов с рестенозом зоны реконструкции, прогрессированием атеросклероза

и пациентов без данных осложнений. Так, согласно предварительным расчетам, оптимальное количество пациентов в группе E должно составлять 34.

Исследование группы E состояло из анализа динамики маркеров апоптоза/пролиферации и дисфункции эндотелия в послеоперационном периоде на фоне применения комбинированной антиоксидантной терапии. В связи с наличием атеросклеротического поражения сосудистой стенки в группе E, исходное количество маркеров PDGF BB, VEGF A165 и Вах было повышено, при том, что значения sFas, Bcl-2 и NO были снижены по сравнению со значениями этих маркеров у здоровых добровольцев ($p < 0,01$) (Таблица 25).

Таблица 25 - Сравнение исходных значений маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов групп B, E и здоровых добровольцев

Показатели, Me [Q1-Q3]	Вах (нг/мл)	Bcl-2 (нг/мл)	sFas (нг/мл)	PDGF BB (нг/мл)	NO (ммоль/л)	VEGF (пг/мл)
Здоровые добровольцы	15,1 [13; 15,7]	5,3 [4,8; 5,7]	1,1 [0,97; 1,2]	8,9 [8,1; 9,5]	340 [308; 377]	86 [66; 108]
Исходные значения пациентов группы B	23,9 [22,4; 24,8]	4,2 [3,8; 4,8]	0,9 [0,76; 1,1]	12,8 [11,3; 14]	247 [224; 257]	356 [299; 410]
Исходные значения пациентов группы E	24,9 [23,7; 25,9]	4,1 [4,0; 4,4]	0,92 [0,87; 0,93]	12,9 [12; 13,3]	239 [224; 247]	374 [316; 415]

Наличие сопутствующей патологии в виде ишемической болезни сердца и перенесенного инфаркта миокарда у пациентов с ОААНК привело к более высоким исходным значениям маркера Вах в сравнении с пациентами без данной сопутствующей патологии ($p < 0,001$). Наличие связи между количеством маркера Вах и уровнем холестерина в сыворотке крови было доказано с помощью проведения корреляционного анализа ($r = +0,614$, $p < 0,01$).

При этом отметим, что, сравнивая все те же исходные значения исследуемых показателей апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия между группами B и E, значимых различий получено не было ($p < 0,05$).

Применение витамина Е в дозе 400 МЕ/сутки у пациентов группы Е в течение 7 дней до проведения эндоваскулярного оперативного вмешательства не привело к достоверно значимым изменениям значений биомаркеров апоптоза (Вах, Bcl-2, sFas), пролиферация клеток (PDGF BB, VEGF A165), эндотелиальной дисфункции клеток (NO), $p > 0,05$.

В течение первых часов после вмешательства наблюдалось снижение значения маркера VEGF A165 ($p = 0,03$) относительно значений, полученных непосредственно до операции в группе Е. Достоверно значимых различий по другим маркерам апоптоза/пролиферации/дисфункции эндотелия получено не было ($p > 0,05$) (Рисунки 38-40).

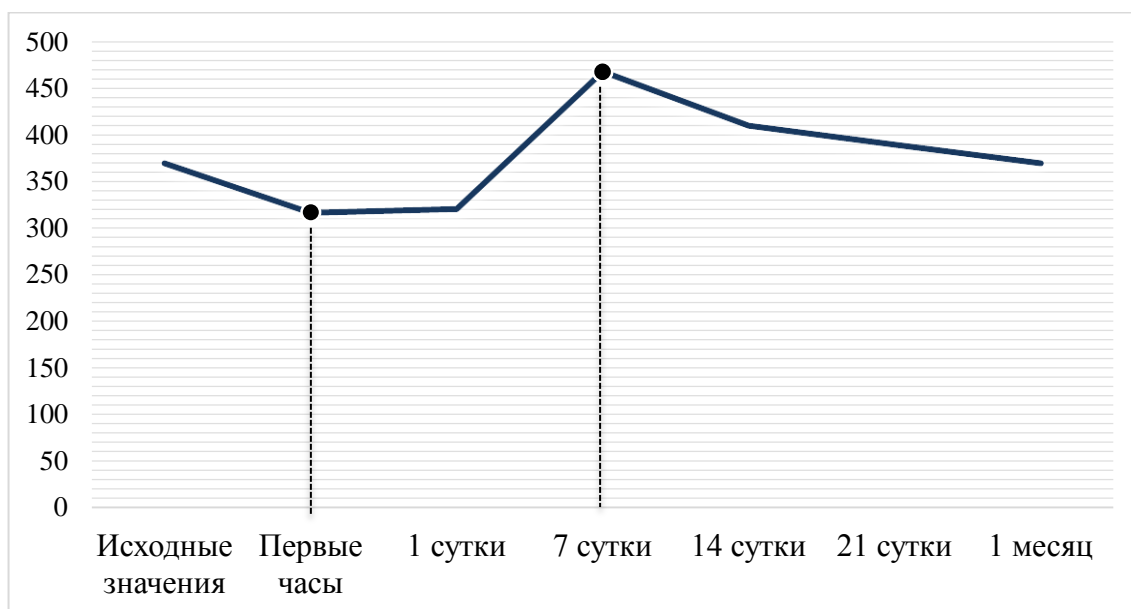


Рисунок 38 - Динамика изменения маркера VEGF A165 у пациентов группы Е в послеоперационном периоде

В результате сравнения маркера Вах в первые часы в группах В и Е, был отмечен его рост у пациентов первой группы, при том, что значение антиапоптотического маркера Bcl-2 ($p < 0,01$) и показателя VEGF A165 ($p < 0,01$) были снижены (Таблица 26).

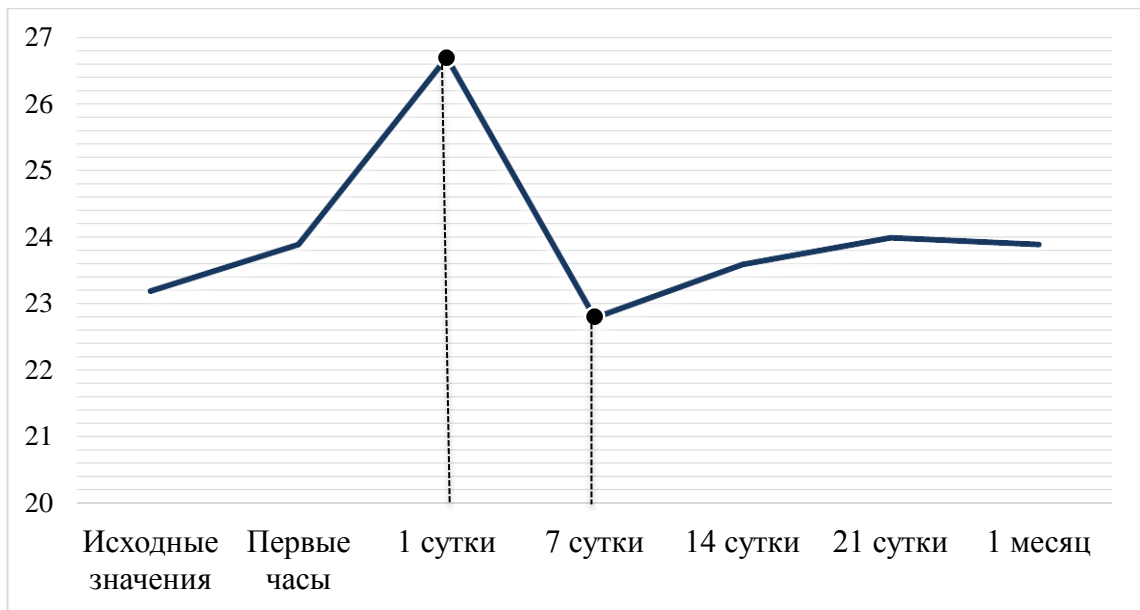


Рисунок 39 - Динамика изменения маркера Вах у пациентов группы Е в послеоперационном периоде

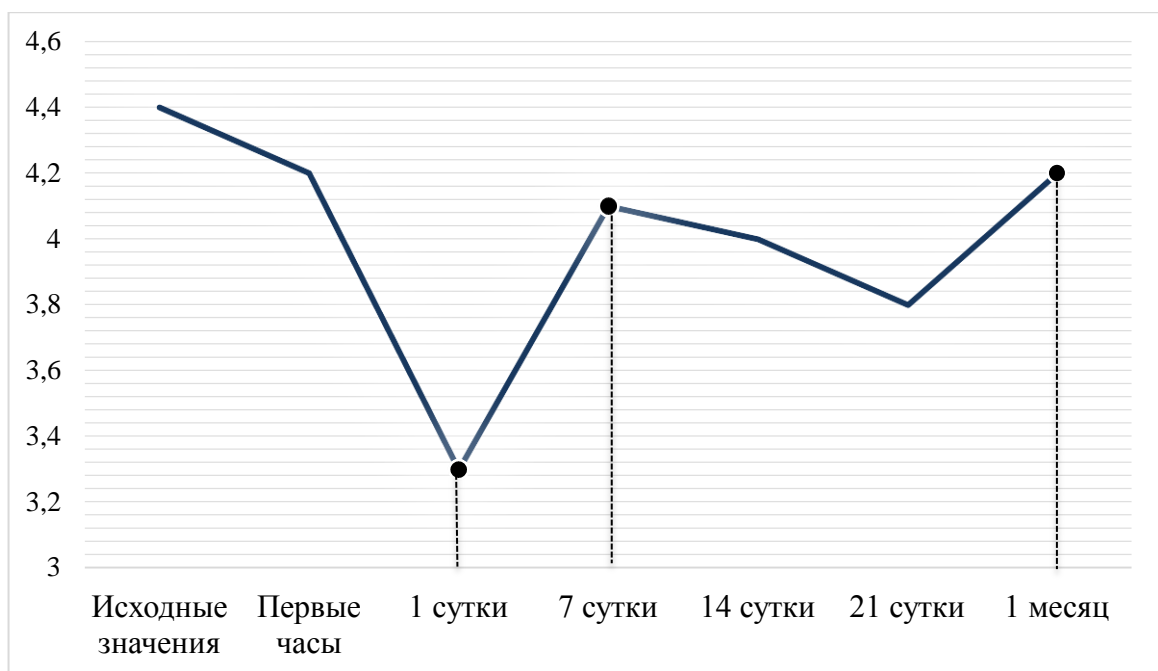


Рисунок 40 - Динамика изменения маркера Вcl-2 у пациентов группы Е в послеоперационном периоде

Через сутки после операции, было установлено значимое снижение маркера Вcl-2 ($p < 0,01$) и NO ($p < 0,01$), при повышении количества Вах ($p < 0,01$) по сравнению со значениями этих маркеров в первые часы (Рисунок 41). Проведенный впоследствии корреляционный анализ подтвердил наличие

обратной связи между проапоптотическим маркером Вах и маркером дисфункции эндотелия NO ($r=-0,64$, $p=0,003$).

Проведя межгрупповые сравнения на первые сутки, было выяснено, что у пациентов группы В значения маркера Вах ($p=0,01$) были повышены при сниженных значениях Vcl-2 ($p=0,02$) и NO ($p=0,01$) относительно группы Е (Таблица 26).

Благодаря применению комбинированной антиоксидантной терапии в указанные дизайном исследования сроки, нам удалось добиться изменения течения маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия в различные сроки послеоперационного периода.

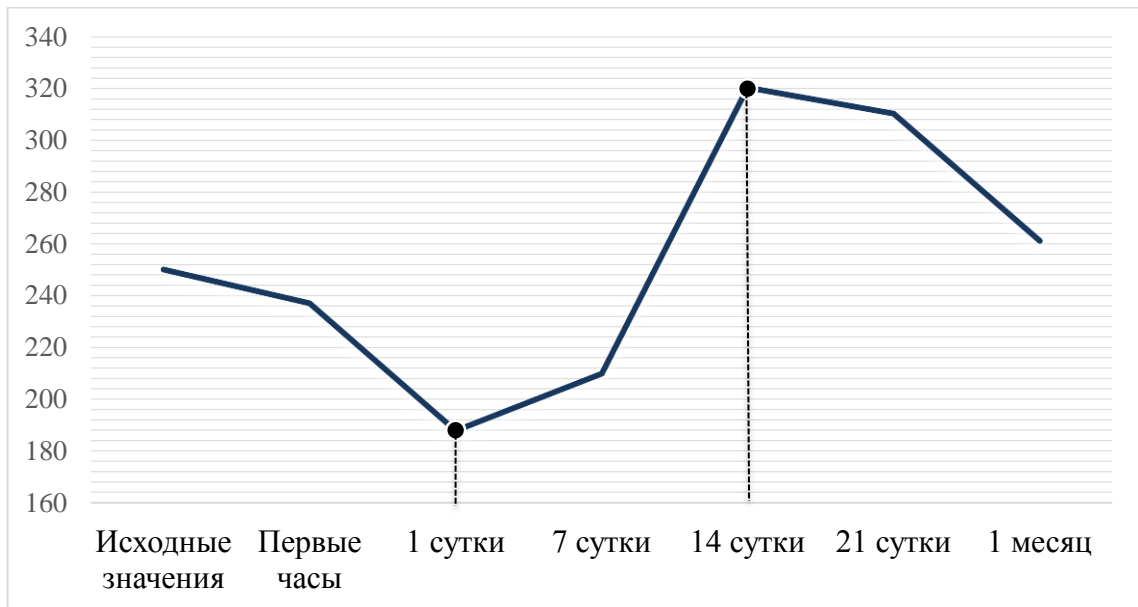


Рисунок 41 - Динамика изменения метаболитов оксида азота у пациентов группы Е на фоне антиоксидантной терапии

Так, у пациентов группы Е произошли изменения в следующем: во-первых, под влиянием антиоксидантной терапии, интенсивность протекания первой волны апоптоза, выражающаяся в количестве биомаркеров Вах и Vcl-2, значительно снизилась. Во-вторых, пик первой волны апоптоза сместился с первых часов на первые сутки. Назначение витамина Е за неделю до операции привело к уменьшению интенсивности выработки маркеров апоптоза и пролиферации клеток на фоне улучшения функционального состояния эндотелия с

повышением синтеза NO. Витамин E считается сильным антиоксидантом, так как благодаря своей липофильной активности он достигает различных клеток организма, защищая их от оксидативного стресса [14]. Поэтому эффект от применения витамина E в снижении значений маркеров апоптоза митохондриального пути можно связать с непосредственной защитой мембран митохондрий различных типов клеток сосудистой стенки, в которых преимущественно локализуются белки Вах и Bcl-2. Кроме того, эффект связан со своеобразной защитой и подготовкой мембраны клеток сосудистой стенки к предстоящей травме во время проведения оперативных вмешательств. Однако, следует отметить, что данные изменения непосредственно к моменту проведения операций были статистически незначимыми. Полученный результат дополнительно сподвиг нас к выбору применения комбинированной антиоксидантной терапии за счет добавления парантерального введения препарата «Актовегин»®. Другим стимулом применения данного препарата являлась непосредственно травма сосудистой стенки в результате предстоящего вмешательства, приводящая к снижению естественных антиоксидантов, усиленному синтезу АФК, развитию воспалительных реакций и, следовательно, к запуску системы апоптоза.

Эффект от применения комбинированной терапии заключался в меньшем снижении значений NO у пациентов группы E в сравнении с его значениями у пациентов группы B. В основе данного эффекта, на наш взгляд, лежит следующее наблюдение: снижение объема гибнущих клеток сосудистой стенки ведет к повышению количества вырабатываемых ими медиаторов, в частности NO. Помимо непосредственного влияния апоптоза на дисфункцию эндотелия, также следует учитывать возможность косвенного воздействия самой терапии на выработку NO. Данное умозаключение находит поддержку и в работах других исследователей. Так, к примеру, в ряде работ отмечен вклад витамина E и «Актовегина»® в защиту эндотелиальной выстилки и в уменьшении эндотелиальной дисфункции. Это связано с повышением биодоступности и

снижением инактивации NO как за счет активации эндотелиальной синтазы, так и за счет уменьшения продукции АФК [60, 81].

Через неделю после операции, пиковых значений достиг маркер пролиферации PDGF BB ($p < 0,01$), VEGF A165 ($p = 0,001$), при менее стремительном росте маркера Vcl-2 ($p < 0,01$). В эти же сроки наблюдалось значимое снижение значения белка Вах ($p < 0,01$). Подсчитанные коэффициенты корреляции подтверждают выдвинутую гипотезу о взаимосвязи между NO и Vcl-2 ($r = +0,656$, $p = 0,01$) сроком на 7 сутки (Рисунок 42).

В результате сравнения двух групп, отмечено, что у пациентов группы В более выражен рост показателя пролиферации клеток сосудистой стенки PDGF BB ($p < 0,01$) при более низких значениях маркера дисфункции эндотелия NO ($p = 0,001$) и VEGF A165 ($p = 0,02$) в сравнении с маркерами у пациентов группы Е (Таблица 26).

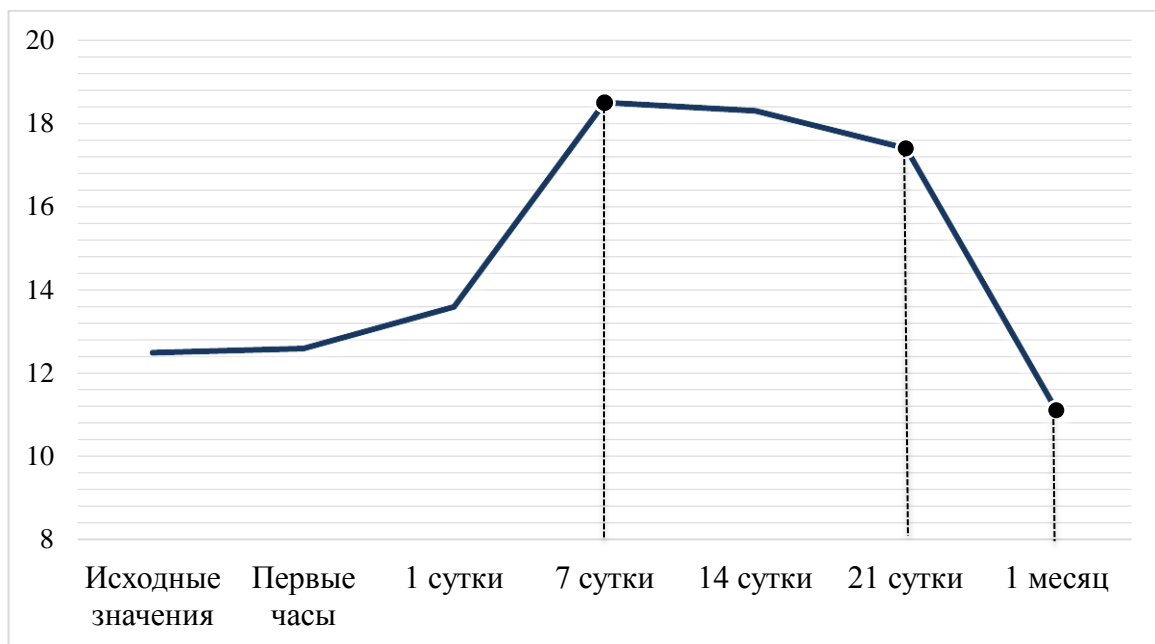


Рисунок 42 - Динамика изменения маркера PDGF BB у пациентов группы Е в послеоперационном периоде

С нашей точки зрения, директивное воздействие антиоксидантных препаратов на активацию первой волны апоптоза привело к уменьшению ответной пролиферации и миграции ГМК из меди в интиму. Подтверждение данного заключения находится в полученных различиях в значениях показателя

PDGF BB на 7 и 14 сутки у пациентов в группах В и Е. Не менее важным эффектом от применения вышеуказанной терапии явилось повышение значений маркера VEGF A165 в указанный промежуток времени у пациентов группы Е. Данный биомаркер выступает в качестве индуктора повторной эндотелиализации, способствуя восстановлению поврежденного эндотелия путем повышения количества антиапоптотического маркера Bcl-2. Дополнительно обратившись к мировой литературе, нами было обнаружено, что само применение Токоферола в экспериментальных работах приводило к уменьшению пролиферации и миграции ГМК из меди и интима после моделирования травмы стенки сосуда. А механизм, лежащий в основе данного процесса, был подавление активности протеинкиназы С, которая непосредственно регулирует рост, дифференцировку, миграцию и пролиферацию ГМК [101, 159].

На 14-е сутки произошло статистически значимое снижение маркера sFas ($p=0,03$), при том, что показатель NO ($p<0,01$) достиг пикового значения за весь период исследования. В дальнейшем была обнаружена обратная связь между значениями sFas и NO ($r=-0,52$, $p<0,01$) в вышеуказанный период времени.

В результате проведенных межгрупповых сравнений отмечались более высокие значения показателя пролиферации PDGF BB ($p<0,01$) в группе В по сравнению с группой Е (Таблица 26).

На 21-е сутки наблюдалась дальнейшая тенденция к снижению значений sFas ($p<0,01$), что, как следствие, стало причиной уменьшения количества маркера пролиферации PDGF BB ($p=0,04$). Коэффициент ранговой корреляции на 21-е сутки подтвердил наличие связи между PDGF BB и sFas ($r=+0,82$, $p<0,01$) (Рисунок 43).

В результате межгруппового сопоставления маркеров групп В и Е, выявлены пониженные значения sFas ($p<0,01$) у пациентов группы В по сравнению с группой Е (Таблица 26).

Различие в значениях sFas на 21-е сутки между группами В и Е можно связать с тем, что система апоптоза, представляет собой запрограммированный и четко регулируемый механизм. В связи с чем, можно допустить, что снижение

интенсивности протекания первой волны апоптоза привело к менее выраженной дисфункции эндотелия, и, как следствие, к менее сильному пролиферативному ответу.

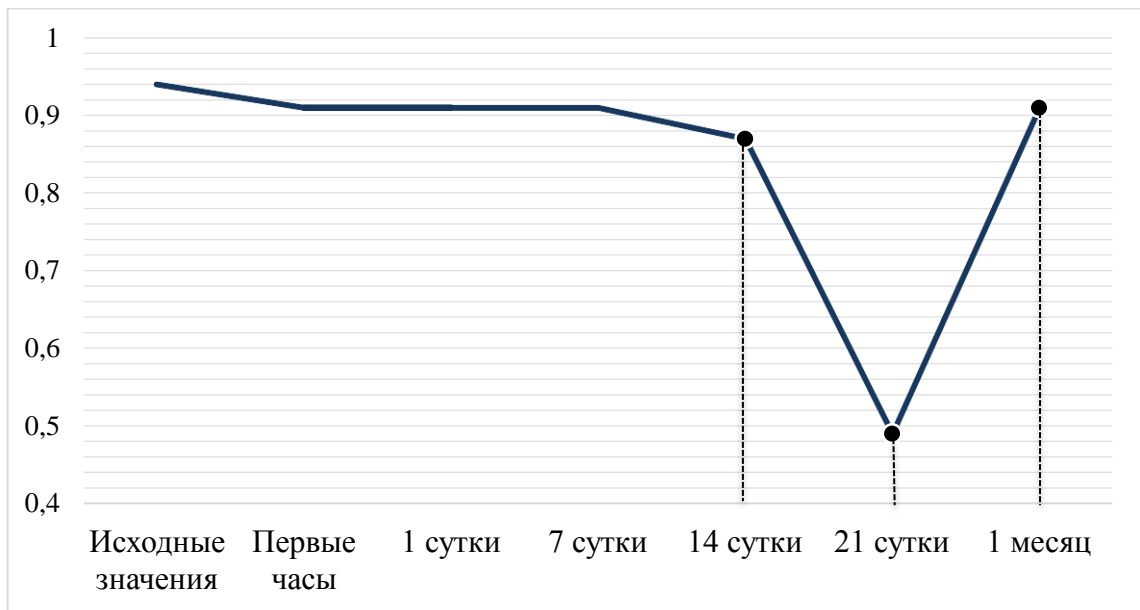


Рисунок 43 - Динамика изменения маркера sFas у пациентов группы E в послеоперационном периоде

Вторая волна апоптоза, выступающая в роли ограничителя пролиферативного ответа на сдержанный с помощью терапии апоптотический всплеск первой волны, также была менее выражена.

Снижение силы второй волны апоптоза выразилось в количестве маркера sFas на 21-е сутки. Мы предполагаем, что меньший пролиферативный ответ клеток на 7-е и 14-е сутки приводит к менее выраженной активации второй волны апоптоза. К концу первого месяца отмечался значимый рост значений Bcl-2 ($p=0,001$) и sFas ($p<0,01$) при дальнейшем снижении значений PDGF BB ($p<0,01$) по сравнению с 21-ми сутками.

При межгрупповом сравнении к концу 1 месяца, значения NO ($p<0,01$) были ниже, а PDGF BB ($p<0,01$) выше у пациентов группы B в отличие от группы E (Таблица 26).

Опираясь на ранее предоставленные факторы риска развития рестеноза зоны вмешательства, представляющие собой исследуемые маркеры в

определенный временной период у пациентов группы В, можно провести оценку эффективности действия комбинированной антиоксидантной терапии.

Таблица 26 - Сравнение исследуемых показателей апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов групп В и Е

Показатели (Ме [Q1-Q3]) / временной интервал	Группа В	Группа Е
Значения Вах в первые часы, нг/мл	30,4 [29,7; 34,3]	23,9 [23,7; 24,9]
Значения Vcl-2 в первые часы, нг/мл	2,7 [2,1; 3,2]	4,2 [4,0; 4,5]
Значения VEGF A 165 в первые часы, пг/мл	221 [229; 410]	317 [275; 353]
Значения Вах в первые сутки, нг/мл	29,1 [27,2; 30,3]	26,7 [26,3; 29,1]
Значения Vcl-2 в первые сутки, нг/мл	2,8 [2,4; 3,0]	3,3 [2,8; 3,6]
Значения NO на первые сутки, ммоль/л	170 [110; 180]	188 [173; 192]
Значения PDGF BB на 7 сутки, нг/мл	25,6 [19,4; 29,6]	18,5 [18,3; 23]
Значения NO на 7 сутки, ммоль/л	181 [148; 198]	210 [198; 233]
Значения VEGF A 165 в 7 сутки, пг/мл	405 [320; 507]	468 [402; 546]
Значения PDGF BB на 14 сутки, нг/мл	23,8 [20,8; 25,9]	18,3 [17,9; 20]
Значения sFas на 21 сутки, нг/мл	0,39 [0,35; 0,42]	0,49 [0,48; 0,63]
Значения PDGF BB 1 месяц, нг/мл	14,6 [11,9; 16,8]	11,1 [10,4; 12,5]
Значения NO 1 месяц, ммоль/л	220 [189; 268]	261 [247; 270]

Важно отметить, что в данном случае пороговые значения маркеров рассматриваются как возможные предикторы развития заболевания, как критические, сравнительные характеристики группы В, выше/ниже которых наблюдается рост вероятности развития рестеноза у отдельно взятого пациента из группы Е.

Отклонение значения Вах в первые часы после операции для группы Е от порогового значения составило 27% в меньшую сторону (Таблица 27). Помимо Вах в первые часы после операции у пациентов с рестенозом реконструкции в группе В, как дополнительный предиктор был выявлен уровень Vcl-2 и VEGF A165, пороговые значения которых составили: 2,05 нг/мл и 208 пг/мл, соответственно.

Однако, в группе Е медианное значение для Vcl-2 составило 4,3 нг/мл, что практически в 2,1 раза отклоняется от cut-off точки группы В. Касательно маркера VEGF A165 значение медианы составило 320 пг/мл, что на 54% отклоняется от точки риска.

Таблица 27 - Сравнение значений исследуемых маркеров у пациентов группы Е с точками cut-off в группе В с рестенозом зоны реконструкции

Пороговые значения	Группа Е	Δ	%
Вах в первые часы			
≥ 32,9 нг/мл	24	8,9	27
Vcl-2 в первые часы			
≤ 2,05 нг/мл	4,3	2,25	2,1 раза
VEGF A 165 в первые часы			
≤ 208 пг/мл	320	112	54
NO в 1 сутки			
≤ 125 ммоль/л	189	64	51
PDGF BB на 7 сутки			
≥ 29,5 нг/мл	18,4	11,1	38
VEGF A 165 в 7 сутки			
≤ 307,5 пг/мл	463	155,5	50
NO на 7 сутки			
≤ 159 ммоль/л	230	71	45
NO на 14 сутки			
≤ 272 ммоль/л	326	54	20
VEGF A 165 в 14 сутки			
≤ 345,5 пг/мл	423	77,5	22,4
sFas на 21 сутки			
≥ 0,515 нг/мл	0,46	0,05	11
PDGF BB на 1 месяц			
≥ 15,4 нг/мл	10,8	4,6	30
VEGF A 165 на 1 месяц			
≤ 355 пг/мл	370	15	4

Значение NO на первые сутки в группе Е составило 189 ммоль/л, при том, что в группе В развитие рестеноза прогнозировалось ниже значения 125 ммоль/л. Разница между значениями составила 51% в большую сторону.

На 7-е сутки в группе В были обнаружены дополнительные предикторы развития рестеноза в виде маркеров PDGF BB и NO, пороговые значения которых составили соответственно 29,5 нг/мл и 159 ммоль/л. В группе Е значения данных маркеров отклонялись от пороговых на 38% и 45%, соответственно.

В отношении биомаркера VEGF A165 у пациентов группы E наблюдалось отклонение его значений от порогового на 50% в большую сторону. Такие большие отклонения в группе указывают на влияние комбинированной антиоксидантной терапии на уменьшение, как дисфункции эндотелия, так и ответной пролиферативной реакции сосудистой стенки.

На 14-е сутки, в группе B, отмечено, что при значениях NO ниже 272 ммоль/л и VEGF A165 ниже 345,5 пг/мл, наблюдалась более высокая вероятность выявления рестеноза у пациентов в отдаленном послеоперационном периоде. В результате применения комбинированной антиоксидантной терапии в группе E удалось отклонить значения маркеров NO и VEGF на 20% и 22,4% от порогового значения.

Последними предикторами развития рестеноза явились значения маркеров PDGF BB и VEGF A165 на 1 месяц. Значения пациентов группы E отличались от пороговых значений маркера PDGF BB на 30%, VEGF A165 на 4% соответственно.

Проведя сопоставление медиан исследуемых показателей в группе E с пороговыми значениями маркеров, ассоциированных с повышенным риском развития рестеноза зоны реконструкции в группе B в отдаленном послеоперационном периоде показало, что большая часть всех сравниваемых значений отклонялась от пороговых в сторону отсутствия осложнения, что может дополнительно свидетельствовать о наличии фармакологического эффекта применяемой терапии.

Последующим пунктом описания группы E является приведение частной характеристики пациентов с рестенозом зоны реконструкции и последующей оперативной практики применительно к данным пациентам.

Таким образом, по результатам двухлетнего наблюдения за пациентами группы E, первичная проходимость зоны оперативного вмешательства составила через 1 и 2 года 100% и 74%, соответственно.

Отдаленные исходы эндоваскулярных вмешательств на артериях нижних конечностей у пациентов группы E представлены в Таблице 28.

Таблица 28 - Отдаленные результаты эндоваскулярных вмешательств на артериях нижних конечностей у пациентов группы E

Вид исхода	Количество пациентов, n (%)	Срок возникновения, Ме [Q1; Q3]
Рестеноз зоны реконструкции	6 (15,3%)	16 [15; 18]
Прогрессирование атеросклероза	4 (10,3%)	22 [21; 23]
Прогрессирование атеросклероза в других сосудистых бассейнах	2 (5,2%)	22 [21; 23]
Тромбозы	-	-
Ампутации	-	-
Летальные исходы	2 (5,2%)	-

У 6 (15,3%) пациентов группы E было диагностировано развитие рестеноза зоны реконструкции. Количество пациентов с рестенозом в группе B превышало на 11,3% их количество в группе E ($p < 0,05$). Важно отметить, что срок возникновения данного осложнения приходился на 16 [15; 18] месяцев после проведенной операции и значительно отличался от пациентов группы B ($p < 0,01$).

У одного пациента по данным ангиографии артерий нижних конечностей были обнаружены тандемные стенозы в НПА, достигающие до 60% после ранее выполненной ангиопластики. У пяти пациентов после выполнения ЧТБА ПБА и ПкА были выявлены стенозы ПБА либо ПкА до 55-60%, в связи с чем им был назначен курс консервативной терапии. На повторном осмотре пациентов через 6 месяцев дистанция безболевого ходьбы увеличилась и составила 200-300 метров. По данным повторного ДС артерий нижних конечностей, процент стеноза в ПкА/ПБА/НПА оставался прежним. В связи с чем, было продолжено динамическое наблюдение за пациентами с выполнением ДС-контроля артерий нижних конечностей.

Важным этапом исследования является предоставление абсолютной и относительной разницы в показателях маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия, произошедшей под влиянием антиоксидантной терапии у пациентов с рестенозом зоны реконструкции в группе E по сравнению с группой B.

Исходно до операции и вплоть до первых часов после, статистически значимого различия между исследуемыми маркерами в двух группах не наблюдалось. В первые часы после операции значения маркера VEGF A165, у пациентов группы Е превышали в 2 раза значения соответствующего маркера пациентов группы В. Также был зафиксирован всплеск значения Вах в группе В, превышающий значения в группе Е на 31%. В этот же период времени отмечался более значимый рост уровня Vcl-2 в группе Е относительно группы В, составляющий 51% (Рисунок 44).

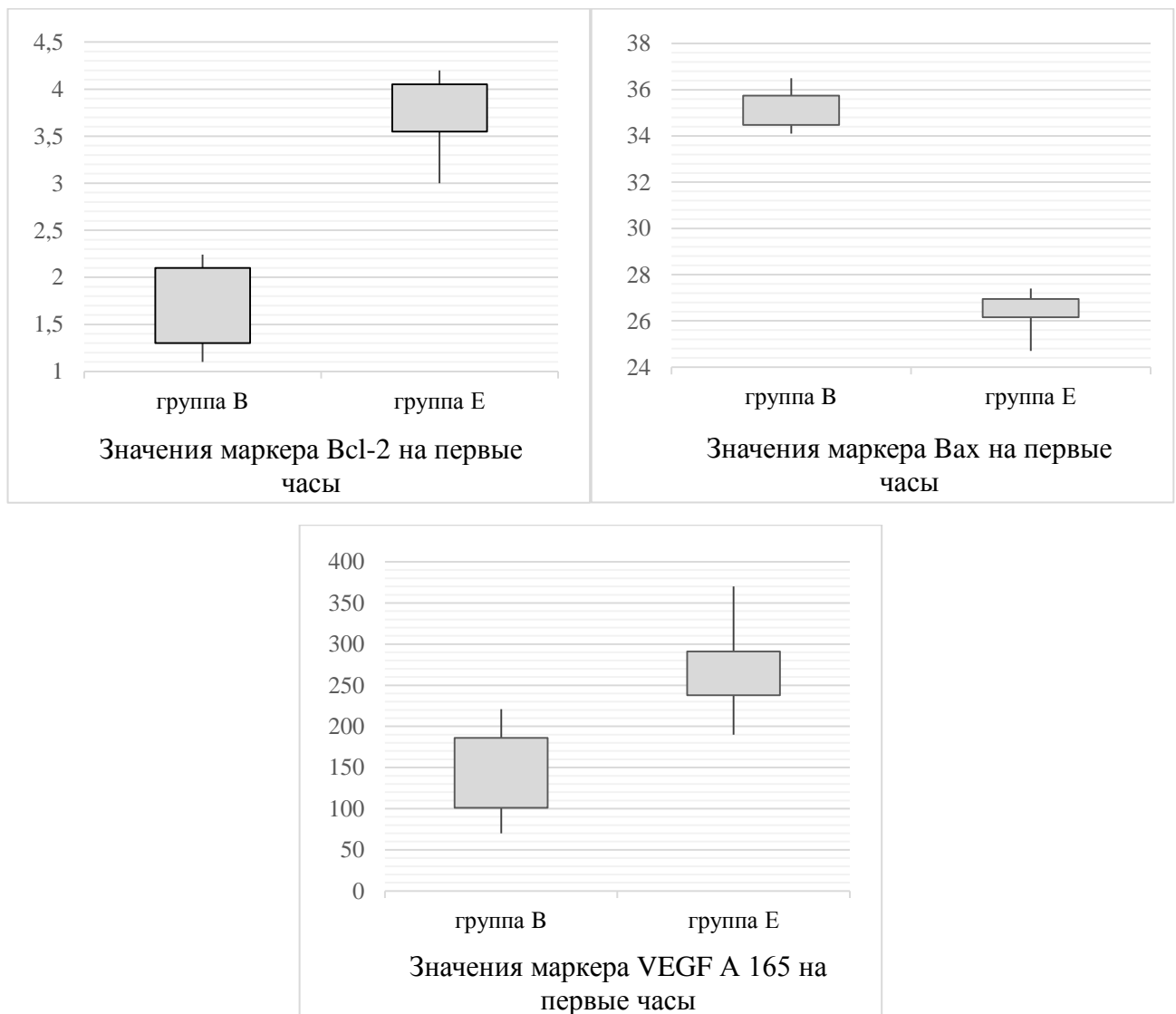


Рисунок 44 - Сравнение маркеров Вах, Vcl-2, VEGF A165 у пациентов с рестенозом зоны реконструкции между группами В и Е в первые часы после операции

На 1-е сутки количество NO у пациентов группы E с рестенозом зоны вмешательства было повышено на 55,4% по сравнению со значениями пациентов с тем же осложнением группы B (Рисунок 45).

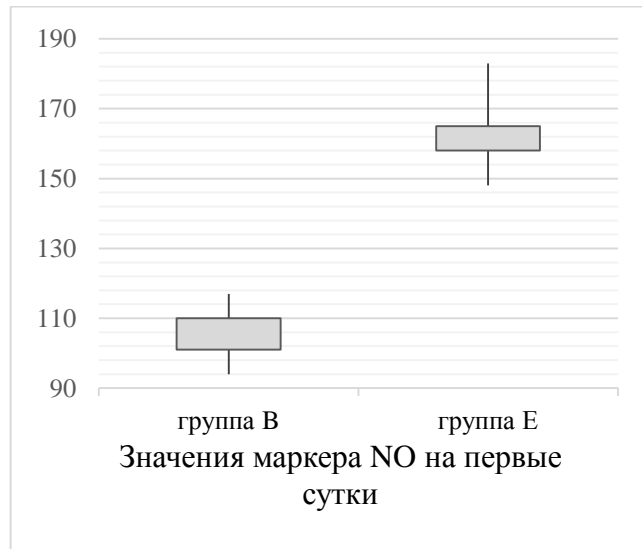


Рисунок 45 - Сравнение метаболитов оксида азота у пациентов с рестенозом зоны реконструкции между группами B и E на первые сутки после операции

Последующее расхождение в показателях проявилось на 7 сутки. Так, в группе B было отмечено, что количество маркера PDGF BB увеличилось на 16,2%, а маркера VEGF A165 снижено на 46,0 % относительно группы E. (Рисунок 46).

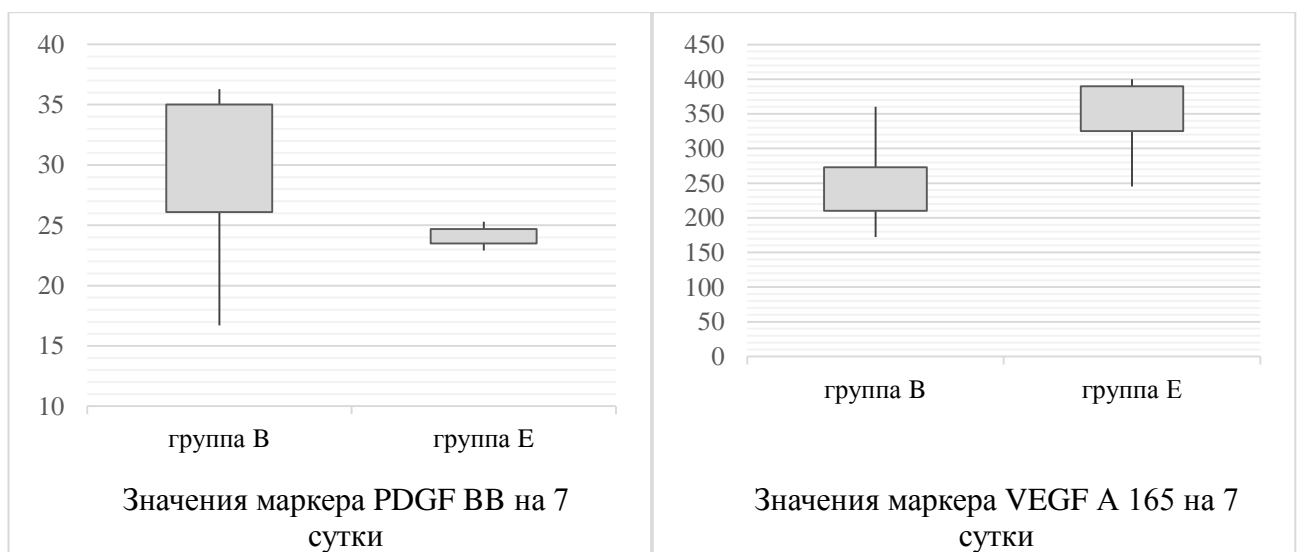


Рисунок 46 - Сравнение маркеров PDGF BB, VEGF A165 у пациентов с рестенозом зоны реконструкции между группами B и E на 7 сутки после операции

Более того, статистически значимо отличались значения NO (на 24%) в группе В от группы Е (Рисунок 47).

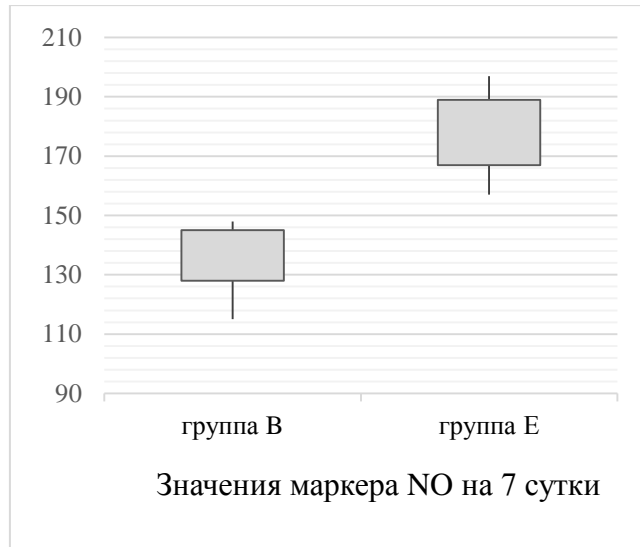


Рисунок 47 - Сравнение маркеров метаболитов оксида азота у пациентов с рестенозом зоны реконструкции между группами В и Е на 7 сутки после операции

Через месяц после вмешательства, как в группе Е, так и в группе В отмечалось снижение значений NO, при этом в группе Е его количество было на 35,3% выше, чем в группе В (Рисунок 48). Все полученные значения являются статистически значимыми, и удовлетворяют принятому уровню значимости $p < 0,05$.

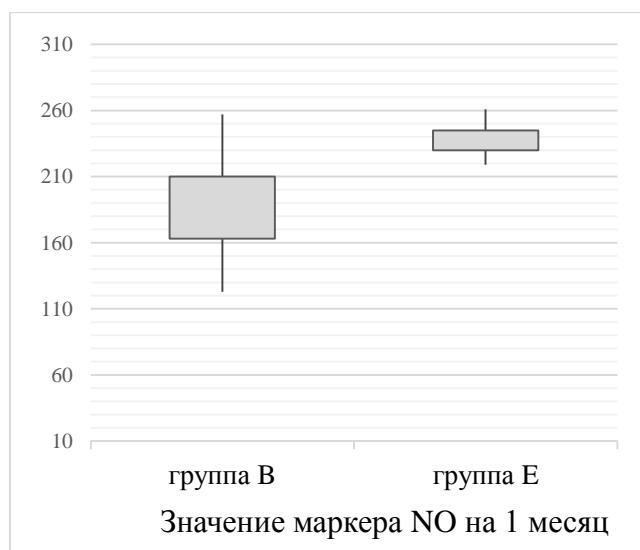


Рисунок 48 - Сравнение метаболитов оксида азота у пациентов с рестенозом зоны реконструкции между группами В и Е через 1 месяц после операции

В результате коррелирования маркеров апоптоза/пролиферации и дисфункции эндотелия у пациентов с рестенозом зоны реконструкции в группе Е, была получена количественная характеристика силы связи между следующими показателями: Вах и NO ($r=-0,88$, $p=0,008$) на 1 сутки, sFas и PDGF BB ($r=+0,892$, $p=0,01$) на 21 сутки.

Все вышеперечисленные различия в уровне маркеров апоптоза (первые часы), пролиферации клеток (7-е сутки) и дисфункции эндотелия (1-е, 7-е сутки, 1 месяц) у пациентов групп В и Е с рестенозом зоны реконструкции с нашей точки зрения обусловлены применением комбинированной антиоксидантной терапии как до, так и в течение первой недели после операции. Выявленные в количестве и динамике исследуемых маркеров изменения у пациентов с рестенозом зоны реконструкции группы Е, повлекли за собой, во-первых, снижение процента стеноза в области выполненного оперативного вмешательства, во-вторых, снижение выраженности клинического проявления данного осложнения (преобладание у данных пациентов ПБ стадии заболевания), в-третьих, изменения в сроке возникновения рестеноза зоны реконструкции на более поздний период; в-четвертых, снижение процента пациентов группы Е с данным послеоперационным осложнением.

Далее представим характеристику подгруппы пациентов с прогрессирующим атеросклерозом с точки зрения проводимых вмешательств.

В течение 22 [21; 23] месяцев после хирургического вмешательства, у 4 (10,3%) пациентов группы Е было диагностировано прогрессирующее атеросклеротическое поражение, подтвержденное данными ДС артерий нижних конечностей.

У двух пациентов отмечено появление болевого синдрома в покое, но уже в контралатеральной конечности с развитием III стадии заболевания. После госпитализации в стационар и последующего дообследования, у первого пациента были обнаружены гемодинамически значимые стенозы в нижней и средней трети ОПА до 80%, у второго - окклюзия ПБА в средней трети бедра, протяженностью 5 см. После соответствующей подготовки данным пациентам было выполнено

оперативное вмешательство в виде – ЧТБА и стентирование ОПА (в первом случае) и ЧТБА ПБА (во втором случае).

У одного пациента при выполнении ДС-контроля артерий оперируемой конечности при проведении очередного визита, процент стеноза в ПКА увеличился с 40% до 60%, в ЗББА с 30% до 50% в приустьевом сегменте. По артериям подвздошно-бедренного сегмента и стенту в ПБА определялся магистральный кровоток. Изначально данным пациентам была выполнена реканализация, ЧТБА и стентирование ПБА. В другом случае прогрессирование атеросклероза выражалось в увеличении процента стеноза с 30-40% до 50-60% в НПА и с 30% до 60% в устье ПББА. Исходно данному пациенту была выполнена реканализация, ангиопластика ПБА и ПКА. У данных пациентов была диагностирована IIБ стадия заболевания. После проведения консервативной терапии пациенты отметили увеличение дистанции безболевого ходьбы до 200 метров. В связи с положительным клиническим эффектом, от выполнения повторного эндоваскулярного вмешательства было решено воздержаться и продолжить динамическое наблюдение за пациентами.

Сравнение значений исследуемых показателей между пациентами групп В и Е с прогрессированием атеросклероза не проводилось из-за малого количества пациентов с данным осложнением в группе Е.

В дальнейшем при выполнении ДС артерий нижних конечностей на контрольных осмотрах пациентов, мы провели оценку роста толщины неоинтимы в различные сроки послеоперационного периода.

По данным УЗДГ, через 2 года, ЛПИ составил 0,92 [0,9; 1]. Стоит отметить, что динамика увеличения толщины неоинтимы увеличивается от периода к периоду, однако статистически незначимо ($p > 0,05$). К концу 1 года ее толщина составила 0,65 [0,6; 0,8] мм, на 1,5 года – 0,7 [0,6; 0,8] мм, на 2 год – 0,75 [0,7; 0,9] мм.

При сравнении толщины неоинтимы у пациентов групп В и Е с нормальным послеоперационным течением, под влиянием комбинированной антиоксидантной терапии наблюдалось сокращение толщины неоинтимы у пациентов группы Е по

сравнению с группой В через 1, 1,5 и 2 года ($p < 0,01$). При этом значения ЛПИ были выше у пациентов группы Е в сравнении с его значениями у пациентов группы В ($p < 0,01$) через два года. При сравнении исследуемых маркеров между пациентами групп В и Е с неоинтимой в зонах эндоваскулярных вмешательств были получены следующие различия, представленные в Таблице 29.

Таблица 29 - Сравнение исследуемых биомаркеров между пациентами групп В и Е с неоинтимой зоной реконструкции

Показатели/ Группы		Первые часы	1 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	1 месяц
Вах (нГ/мл)	В	29,8 [27; 31]	28,6 [26; 30]	23,2 [18; 26]	25,9 [13; 29]	28,9 [15; 32]	24,7 [17; 27]
	Е	23,8* [23; 24]	26,5* [26; 26,9]	22,6 [22; 22,9]	23,2 [22,6; 23,8]	23,9 [23,5; 24]	24 [23,6; 24,1]
Vcl-2 (нГ/мл)	В	3,1 [2,4; 3,7]	2,9 [2,7; 3,1]	3,9 [3,4; 4,9]	3,9 [3,6; 4,2]	3,7 [3,2; 3,9]	4 [3,9; 4,3]
	Е	4,3* [4,1; 4,6]	3,4* [3,3; 3,6]	4,2 [4; 4,5]	4 [3,9; 4,1]	3,8 [3,7; 3,9]	4,2 [4; 4,3]
VEGF A165 (пГ/мл)	В	277 [216; 313]	280 [234; 300]	450 [393; 579]	420 [368; 489]	380 [337; 440]	371 [312; 430]
	Е	327* [308; 389]	341 [300; 378]	510 [437; 589]	438 [396; 501]	408 [300; 472]	387 [317; 448]
NO (ммоль/л)	В	250 [220; 260]	179 [174; 183]	196 [189; 201]	341 [313; 368]	339 [295; 359]	267 [222; 289]
	Е	240 [195; 249]	190* [169; 255]	235* [200; 242]	328 [208; 335]	316 [206; 321]	266 [228; 272]
PDGF BB (нГ/мл)	В	12,9 [7,2; 15,1]	15,5 [10,2; 16]	22,8 [10,7; 26]	21,8 [16,3; 24]	18,9 [15,2; 19]	12,3 [9,8; 15]
	Е	12,6 [12,3; 12,8]	13,6 [12,6; 15]	18,4 [18; 18,7]	18* [17,8; 19]	17,2 [16,8; 17]	10,6* [10,3; 12]
sFas (нГ/мл)	В	0,9 [0,8; 0,93]	0,84 [0,8; 0,97]	0,91 [0,8; 1]	0,59 [0,5; 0,67]	0,39 [0,3; 0,4]	0,88 [0,8; 0,97]
	Е	0,91 [0,5; 0,93]	0,91 [0,82; 0,9]	0,91 [0,62; 0,96]	0,87 [0,76; 0,9]	0,47* [0,2; 0,5]	0,9 [0,8; 0,92]

*-достоверно значимое отличие, $p < 0,01$

Исходя из вышеизложенного можно сказать, что еще одним эффектом от применения комбинированной антиоксидантной терапии явилось уменьшение толщины неоинтимы в зоне проведенных реконструкций, что обусловлено воздействием применяемых препаратов на маркеры апоптоза (Вах и Vcl-2) в

первую волну. И как следствие, реципроктное снижение пролиферативного ответа на 7 и 14 сутки с менее выраженной последующей активацией второй волны апоптоза.

Летальные исходы составили 2 (5,2%) случая, причиной которых явилась новая коронавирусная инфекция Covid-19.

3.7. Динамика изменения маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы F и их влияние на отдаленные результаты оперативного лечения

Рассмотрение группы F начнем с представления расчета минимального количества пациентов, которое составляет 30. Проведя сравнения исходных значений маркеров у всех пациентов группы F и этих же значений, но уже у здоровых добровольцев, было отмечено различие между группами по всему спектру исследуемых маркеров. Так, уровни PDGF BB, VEGF A165 и Вах у пациентов группы F были повышены при более сниженных значениях sFas, Bcl-2 и NO при значимости различий $p < 0,01$ (Таблица 30).

Таблица 30 - Сравнение исходных значений исследуемых маркеров у пациентов групп С и F со значениями здоровых добровольцев

Показатели, Ме [Q1-Q3]	Вах (нг/мл)	Bcl-2 (нг/мл)	sFas (нг/мл)	PDGF BB (нг/мл)	NO (ммоль/л)	VEGF A 165 (пг/мл)
Здоровые добровольцы	15,1 [13,9; 15,8]	5,3 [4; 5,8]	1,1 [0,97; 1,2]	8,9 [8,1; 9,5]	340,4 [306; 377]	86 [66; 107]
Исходные значения пациентов группы С	23,9 [21,9; 25,4]	4,4 [4,0; 4,8]	0,93 [0,8; 0,97]	13,1 [12,7; 13,6]	241 [210; 262]	373 [332; 402]
Исходные значения пациентов группы F	23,8 [22,6; 23,9]	4,6 [4,5; 4,8]	0,89 [0,87; 0,9]	13,5 [12,7; 13,7]	240 [238; 256]	351 [289; 400]

Отметим, что в результате проведенного сравнения показателей маркеров на этот же срок между группами С и F, статистически значимого различия обнаружено не было ($p > 0,05$).

Применение витамина Е в дозе 400 МЕ/сутки у пациентов группы F в течение 7 дней до проведения гибридного оперативного вмешательства не

привело к достоверно значимым изменениям значений биомаркеров апоптоза (Вах, Bcl-2, sFas), пролиферации клеток (PDGF BB, VEGF A165), дисфункции клеток (NO), $p > 0,05$.

При дальнейшем внутригрупповом сравнении показателей апоптоза/пролиферации и дисфункции эндотелия, значимых различий в первые часы после операции получено не было ($p > 0,05$). Исключением явился маркер VEGF A165, значения которого снизились по сравнению с его количеством непосредственно до операции ($p = 0,03$) (Рисунок 49).

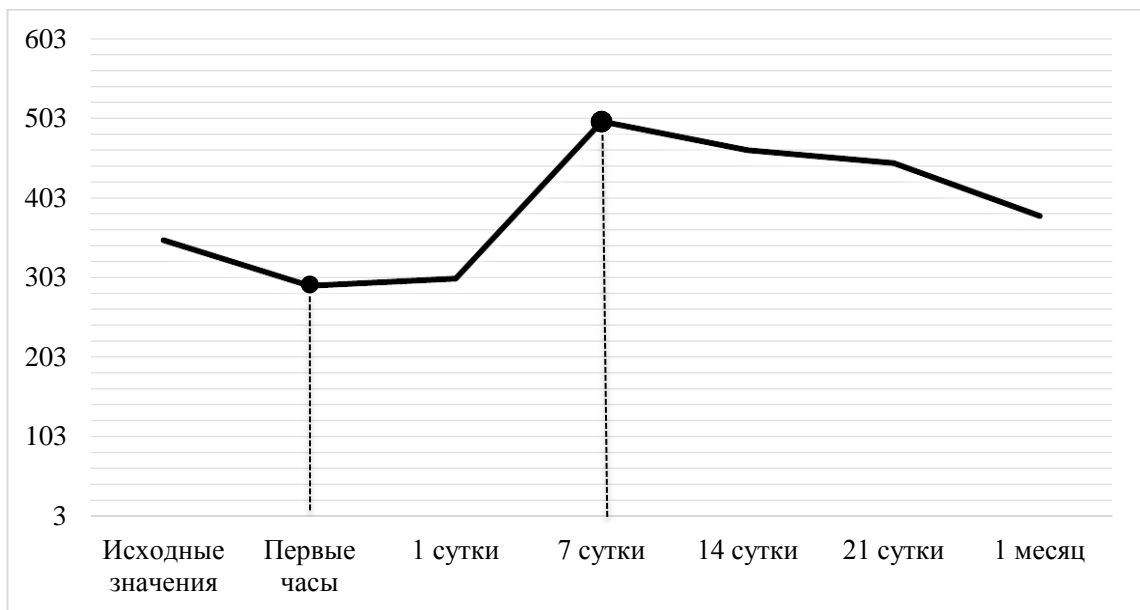


Рисунок 49 - Изменения динамики маркера VEGF A165 в послеоперационном периоде у пациентов группы F

Однако в результате сопоставлений групп С и F было обнаружено, что значение проапоптотического маркера Вах ($p < 0,01$) было значительно выше у пациентов группы С на фоне более низких значений антиапоптотического белка Bcl-2 и биомаркера VEGF A165 ($p < 0,001$) (Таблица 31).

Через сутки после хирургического вмешательства было установлено снижение значений Bcl-2 ($p = 0,02$) и NO ($p = 0,04$) по сравнению с уровнями маркеров на первые часы после операции (Рисунки 50, 51). Также отмечался рост значений белка Вах ($p < 0,01$). Так как, соотношение маркеров Bcl-2/Вах значительно изменяется, то логично предположить наличие зависимости

вышеупомянутых маркеров и NO. Проведя парный анализ зависимости по методу Спирмена, мы получили подтверждение нашей гипотезы, а именно, коэффициенты корреляции отразили связь между: Vcl-2 и NO ($r=+0,52$, $p<0,01$), NO и Вах ($r=-0,578$, $p=0,01$), уровнем лейкоцитов с Вах ($r=+0,927$, $p<0,01$), уровнем лейкоцитов с Vcl-2 ($r=-0,551$, $p=0,01$), уровнем лейкоцитов с NO ($r=-0,768$, $p=0,01$) на 1 сутки после операции.

При дальнейшем межгрупповом сравнении было отмечено, что в группе С значения маркера Вах ($p=0,02$) оставались на том же повышенном относительно группы F уровне. На этом фоне можно было наблюдать более низкие значения белков Vcl-2 ($p=0,01$) и NO ($p=0,01$) у пациентов группы С по сравнению с группой F (Таблица 31).

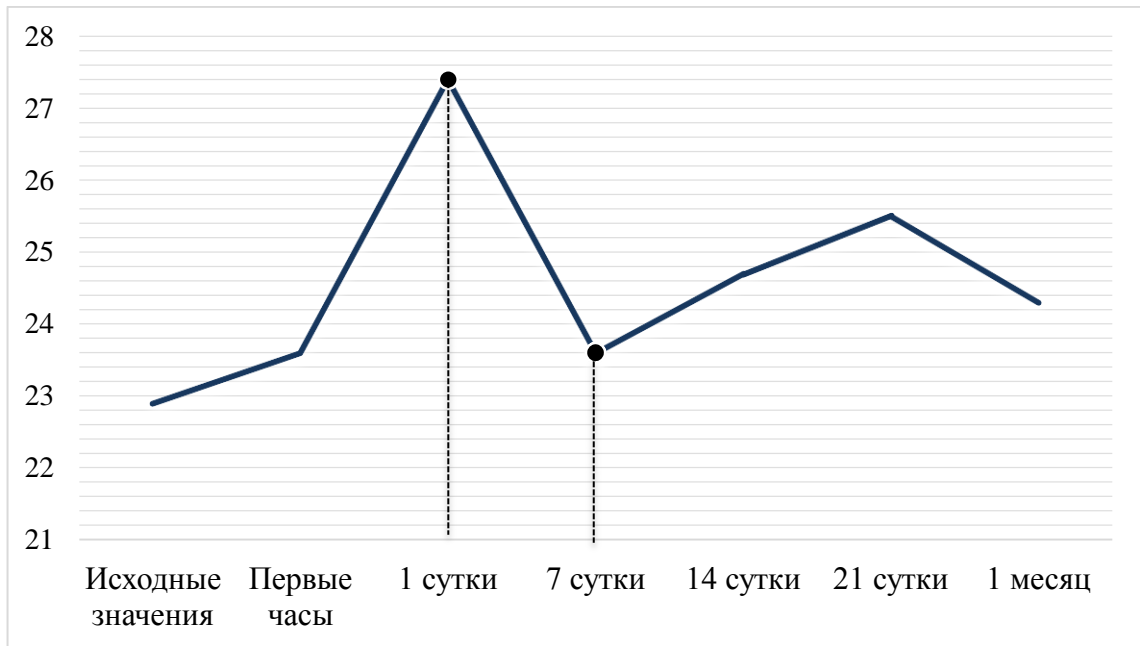


Рисунок 50 - Изменения динамики маркера Вах в послеоперационном периоде у пациентов группы F

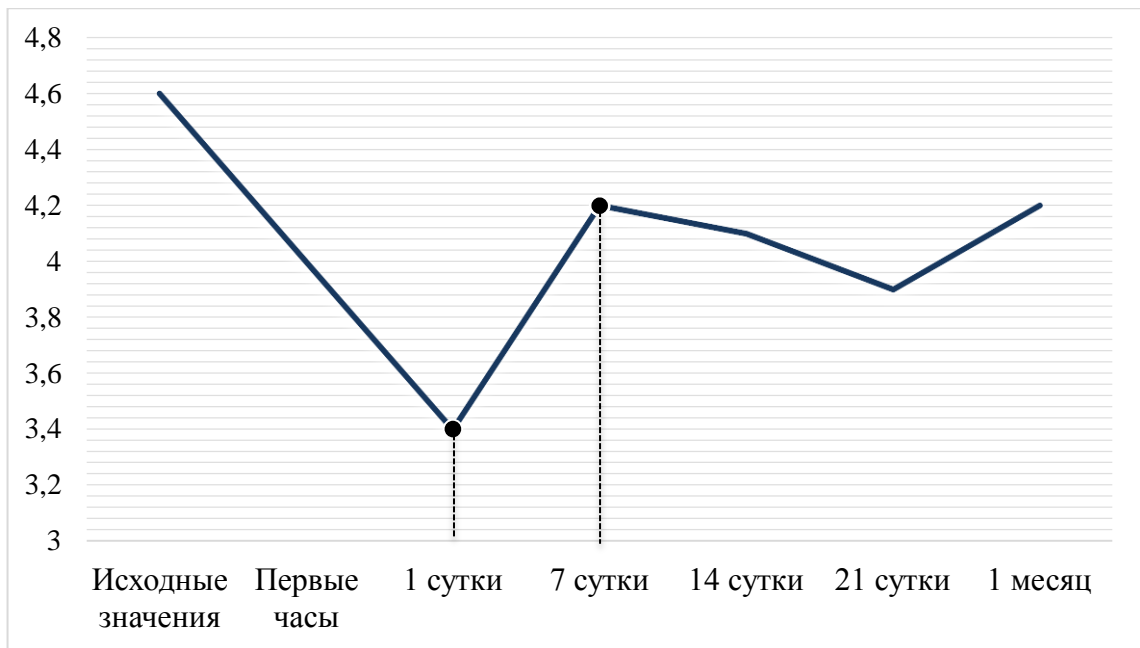


Рисунок 51 - Изменения динамики маркера Vcl-2 в послеоперационном периоде у пациентов группы F

Уже через неделю после хирургического вмешательства, можно было наблюдать статистически значимое изменение почти всех маркеров. Так маркеры VEGF A165 и PDGF BB ($p < 0,01$) достигли пиковых значений за весь период исследования (Рисунок 52). Более того, маркеры Vcl-2 ($p < 0,01$) и NO ($p = 0,03$) также имели рост относительно прошлого периода. Что касается маркера Вах ($p < 0,01$), то его значения были снижены по сравнению с первыми сутками.

В результате сравнения исследуемых маркеров между группами С и F, было выявлено, что группа С имела более выраженный рост показателей PDGF BB ($p < 0,01$), при том, что значения VEGF A165 ($p = 0,01$) были ниже по сравнению с маркерами у пациентов группы F (Таблица 31).

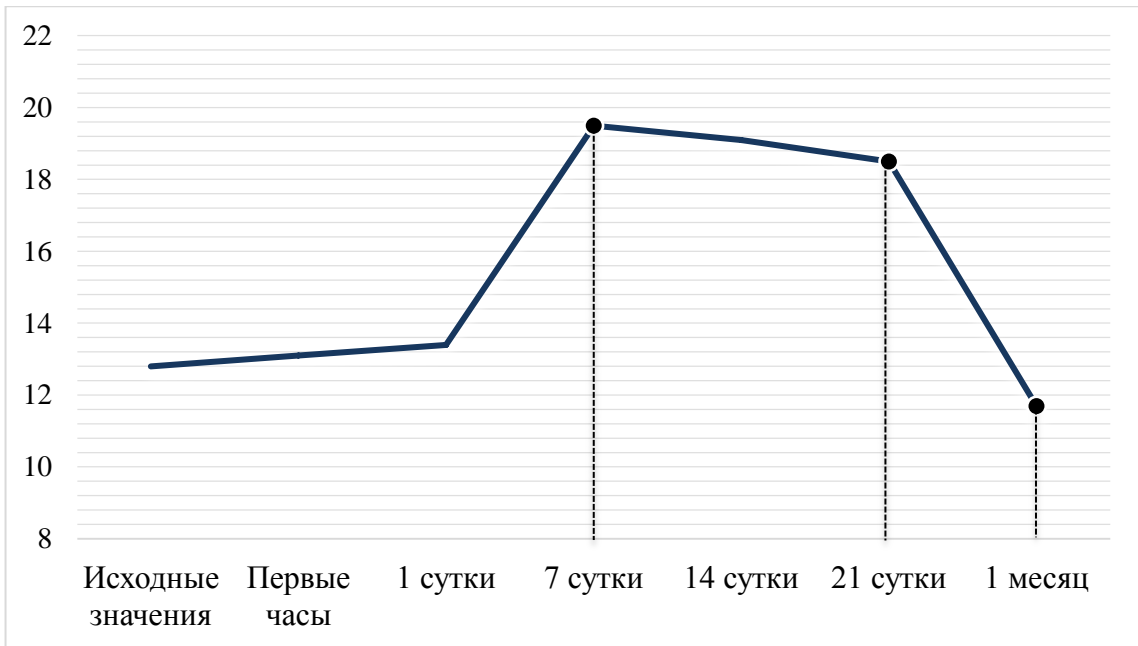


Рисунок 52 - Изменения динамики маркера PDGF BB в послеоперационном периоде у пациентов группы F

Через две недели у пациентов группы F наблюдался статистически значимый рост значений маркера дисфункции эндотелия NO ($p < 0,01$). Более того, данный маркер принял пиковое значение за весь период исследования (Рисунок 53).

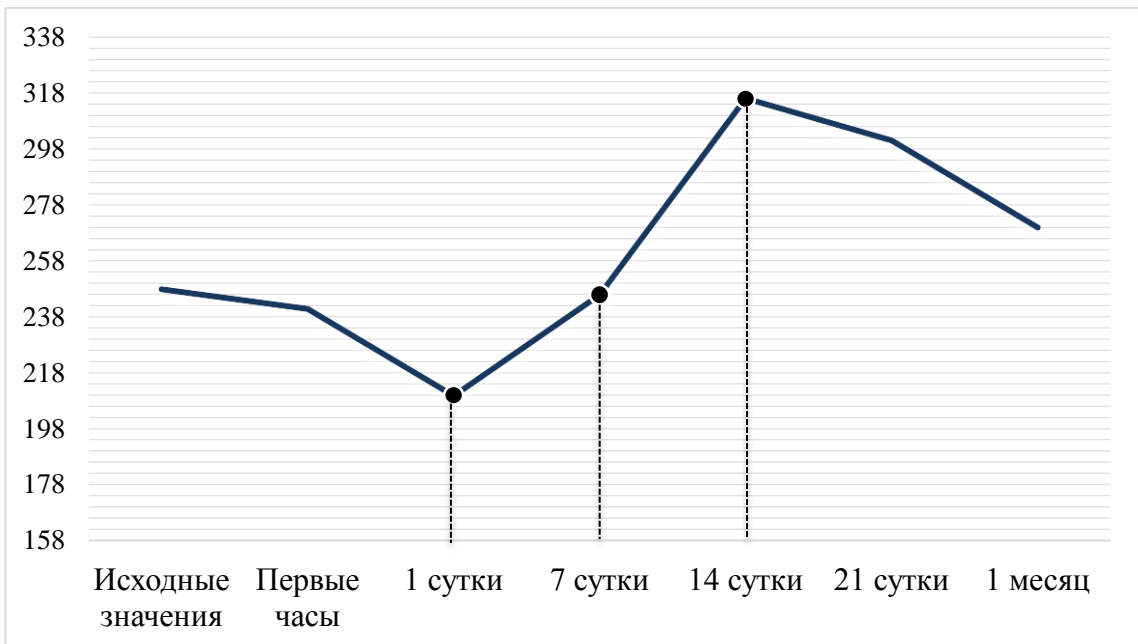


Рисунок 53 - Изменения динамики значений метаболитов оксида азота в послеоперационном периоде у пациентов группы F

Также на данный период был проведен корреляционный анализ, выявивший обратные связи между sFas и NO ($r=-0,56$, $p<0,01$).

При дальнейшем сопоставлении маркеров между группами С и F, у пациентов первой группы, в указанный промежуток времени, показатель пролиферации и миграции PDGF BB ($p<0,01$) был выше чем в группе F с антиоксидантной терапией (Таблица 31).

На 21-е сутки после выполнения оперативных вмешательств было обнаружено значительное снижение уровня белка sFas ($p<0,01$), что привело к соответствующему снижению уровня PDGF BB ($p=0,02$) (Рисунок 54). Для данной пары маркеров, был обнаружен коэффициент корреляции, что подтверждает наличие взаимосвязи в исследуемый период времени ($r=+0,7$, $p<0,01$).

Как и ранее, нами было проведено сравнение всех маркеров в группе С и F на данные сутки. В результате было выявлено, что снижение значение sFas ($p<0,01$) более выражено у пациентов группы С по сравнению с пациентами группы F (Таблица 31).

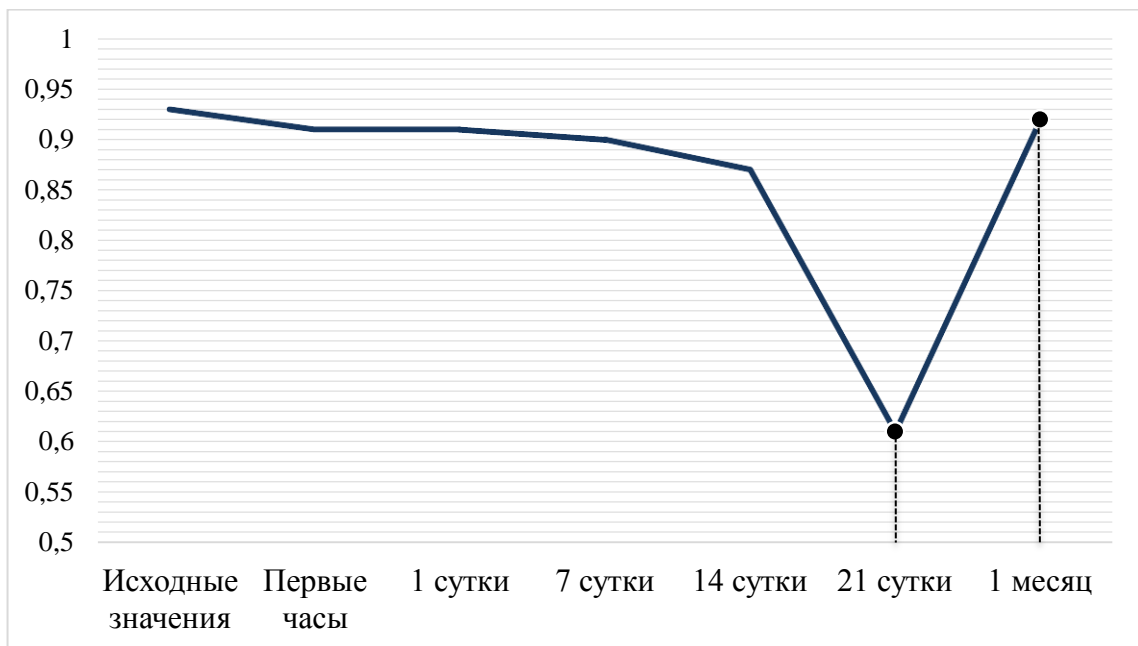


Рисунок 54 - Изменения динамики маркера sFas в послеоперационном периоде у пациентов группы F

Сроком на первый месяц после операции наблюдалось значительное снижение значений PDGF BB ($p < 0,01$) на фоне повышения значений sFas ($p < 0,01$) по сравнению с 21-ми сутками.

Отметим, что значения, полученные через месяц, никак значимо не отличались, от исходных для следующих маркеров: PDGF BB ($p = 0,34$), VEGF A165 ($p = 0,122$), sFas ($p = 0,58$), Вах ($p = 0,27$) у пациентов группы F.

При проведении межгрупповых сравнений маркеров на 1 месяц было отмечено, что значения NO ($p < 0,01$) снижены у пациентов группы С при повышенном количестве маркера PDGF BB ($p = 0,01$) по сравнению с группой F (Таблица 31).

Таблица 31 - Сравнение исследуемых показателей апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов групп С и F

Показатели (Me [Q1-Q3]) / временной интервал	Группа С	Группа F
Значения Вах в первые часы, нг/мл	32,3 [27,6; 38,9]	23,5 [22,9; 26,3]
Значения Vcl-2 в первые часы, нг/мл	2,8 [2,4; 2,9]	4 [3,2; 4,8]
Значения VEGF A 165 в первые часы, пг/мл	212 [176; 289]	294 [256; 337]
Значения Вах в первые сутки, нг/мл	29,8 [27,4; 36]	27,4 [26,5; 29,9]
Значения Vcl-2 в первые сутки, нг/мл	2,8 [2,6; 3,0]	3,4 [3; 3,6]
Значения NO на первые сутки, ммоль/л	161 [100; 190]	212 [175; 231]
Значения PDGF BB на 7 сутки, нг/мл	25,8 [24,2; 29,6]	19,4 [18,4; 21]
Значения VEGF A 165 на 7 сутки, пг/мл	419 [373; 550]	499 [449; 575]
Значения PDGF BB на 14 сутки, нг/мл	24,7 [20,7; 27,4]	19,1 [18,5; 20]
Значения sFas на 21 сутки, нг/мл	0,41 [0,33; 0,48]	0,53 [0,48; 0,6]
Значения PDGF BB 1 месяц, нг/мл	13,9 [12,2; 18,9]	11,6 [10,5; 12,7]
Значения NO 1 месяц, ммоль/л	210 [200; 250]	272 [250; 287]

Сопоставим медианные значения исследуемых показателей у пациентов группы F с нормальным течением и рестенозом зоны вмешательства в отдаленном послеоперационном периоде с пороговыми значениями (точка cut-off) биомаркеров, ассоциированных с риском развития рестеноза у пациентов в группе С.

На первые часы в группе С было выявлено два пороговых значения, принадлежащих маркерам Вах и Vcl-2. Опираясь на маркер Вах, делается вывод,

что развитие рестеноза наблюдается выше значения 36,5 нг/мл, в то время как в группе F значение медианы составляет – 23,5 нг/мл, что на 36% ниже порогового значения. Vcl-2 как предиктор имеет пороговое значение в 2,44 нг/мл. Другими словами, любой пациент с уровнем Vcl-2 на первые часы ниже вышеуказанного значения, имеет риск развития рестеноза в отдаленном послеоперационном периоде. Однако, в группе F, благодаря применению комбинированной антиоксидантной терапии, уровень данного маркера возрос до 4 нг/мл, что отклоняется от порога на 64% в сторону снижения риска рестеноза зоны реконструкции. Еще одним значимым показателем в указанный промежуток времени являлся маркер VEGF A165, при этом значения пациентов группы F были выше его порогового значения на 65%.

На 1-е сутки также было выявлено два основных прогностических маркера – NO и Вах. Первый имеет пороговое значение ≤ 113 ммоль/л, второй $\geq 31,6$ нг/мл. Значения в группе F составляют соответственно 213 ммоль/л и 27,4 нг/мл, что на 88% и 13% отклоняются от точки cut-off.

На 7-е сутки, точно также, как и на первые, предикторами рестеноза рассматривается пара маркеров VEGF A165 и PDGF BB. Пороговые значения составляют ≤ 383 и ≥ 28 нг/мл, соответственно. Относительно группы F, значения предикторов отклоняются от медианных значений на 34% и 31%, соответственно.

На 14-е сутки снова наиболее эффективным предиктором является NO с пороговым значением ≤ 231 ммоль/л. В группе F, медианное значение составляет 320 ммоль/л, что на 38% отклоняется от порогового значения в сторону снижения риска развития рестеноза. Другим, не менее важным предиктором развития вышеуказанного осложнения, являлся маркер VEGF A165, при этом значения пациентов группы F превышали его пороговое значение на 17%.

К концу третьей недели имеются два маркера, пороговые значения которых выступают в качестве факторов риска развития рестеноза – sFas и PDGF BB. Пороговые значения sFas $\geq 0,55$ нг/мл, PDGF BB $\geq 22,8$ нг/мл. В группе F значения этих же маркеров равняются 0,53 нг/мл и 18,5 нг/мл, соответственно.

К концу первого месяца в качестве предикторов развития рестеноза выступили маркеры PDGF BB и VEGF A165, средний процент отклонения значений которых у пациентов на антиоксидантной терапии от точек cut-off составил 31 и 12%, соответственно (Таблица 32).

Таблица 32 - Сравнение пороговых значений маркеров - предикторов риска развития рестеноза у пациентов группы С и значений данных маркеров у пациентов группы F

Пороговые значения	Группа F	Δ	%
Вах в первые часы			
$\geq 36,5$ нг/мл	23,5	13	36
Всl-2 в первые часы			
$\leq 2,44$ нг/мл	4	1,56	64
VEGF A 165 в первые часы			
$\leq 182,5$ пг/мл	302	119,5	65
NO в 1 сутки			
≤ 113 ммоль/л	213	100	88
Вах в 1 сутки			
$\geq 31,6$ нг/мл	27,4	4,2	13
PDGF BB на 7 сутки			
≥ 28 нг/мл	19,4	8,6	31
VEGF A165 на 7 сутки			
≤ 383 пг/мл	512	129	34
NO на 14 сутки			
≤ 231 ммоль/л	320	89	38
VEGF A 165 на 14 сутки			
≤ 404 пг/мл	471	67	17
sFas на 21 сутки			
$\geq 0,55$ нг/мл	0,53	0,02	4
PDGF BB на 21 сутки			
$\geq 22,8$ нг/мл	18,5	4,3	19
VEGF A 165 на 1 месяц			
≤ 335 пг/мл	376	41	12
PDGF BB на 1 месяц			
$\geq 16,4$ нг/мл	11,3	5,1	31

Помимо этого, следует отметить, что у пациентов с рестенозом группы F, к концу первого месяца, значения V_{ps} составили 113 [108; 115] см/с и были выше,

чем у пациентов данной группы с нормальным послеоперационным течением – 91 [79; 94] ($p < 0,05$).

В последующем, мы провели сравнение пороговых значений биомаркеров у пациентов группы С, ассоциированных с прогрессированием атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде, с суммарными значениями биомаркеров у пациентов с прогрессированием атеросклероза и без него у пациентов группы F после гибридных вмешательств.

В ходе проведения Roc-анализа были получены критические значения биомаркеров Вах и sFas, которые были выявлены именно в предоперационном периоде. Что касается первого, то прогрессирование атеросклероза для пациентов прогнозируется, начиная со значения 26,4 нг/мл и выше, при том, что в группе F медианное значение равно 22,8 нг/мл, что на 14% ниже порогового уровня. Точка риска второго маркера – 0,915 нг/мл. Пациенты, у которых уровень sFas исходно ниже данного значения, имеют риск прогрессирования атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде. Так в группе F медианное значение составляет 0,93 нг/мл.

В первые часы наиболее эффективными предикторами проявили себя маркеры Вах и sFas, пороговые значения, которых были $\geq 34,4$ нг/мл и $\leq 0,67$ нг/мл, соответственно. В группе F их значения равны 23,5 нг/мл и 0,9 нг/мл.

На 1-е сутки наблюдается только один предиктор – NO с точкой cut-off ≤ 116 ммоль/л. В группе F значение данного маркера в этот же период равняется 215 ммоль/л, что на 85% отклоняется от точки риска.

На 7-е и 14-е сутки предиктор – PDGF BB с практически одинаковыми значениями 28,2 нг/мл и 28,5 нг/мл. В группе F значения составили соответственно 19,2 нг/мл и 19 нг/мл. К концу первого месяца предикторами выступили маркеры PDGF BB и NO. При этом значения пациентов группы F отклонялись от пороговых на 27% и 29%, соответственно (Таблица 33).

Таблица 33 - Сравнение пороговых значений маркеров - предикторов риска прогрессирования атеросклероза у пациентов группы С и значений данных маркеров у пациентов группы F

Пороговые значения	Группа F	Δ	%
Вах исходные значения			
≥ 26,4 нг/мл	22,8	3,6	14
sFas исходные значения			
≤ 0,915 нг/мл	0,93	0,02	2
Вах в первые часы			
≥ 34,4 нг/мл	23,5	10,9	32
sFas в первые часы			
≤ 0,67 нг/мл	0,9	0,23	37
NO в 1 сутки			
≤ 116 ммоль/л	215	99	85
PDGF BB на 7 сутки			
≥ 28,2 нг/мл	19,2	9	32
PDGF BB на 14 сутки			
≥ 28,5 нг/мл	19	9,5	33
PDGF BB на 1 месяц			
≥ 15,7 нг/мл	11,4	4,3	27
NO на 1 месяц			
≤ 215 ммоль/л	277	62	29

Следует отметить, что к концу первого месяца, значения показателя RI у пациентов группы F с прогрессированием атеросклероза составили 1,2 [1,2; 1,3] и были выше в сравнении со значениями у пациентов без прогрессирования заболевания и составил 1,06 [1,05; 1,1] ($p < 0,01$). Аналогичная тенденция по RI у пациентов с прогрессированием атеросклероза наблюдалась и у пациентов группы E.

Первичная проходимость через двухлетний период наблюдения после проведенных гибридных вмешательств на магистральных артериях нижних конечностей у пациентов группы F через 1 и 2 года составила 100% и 76%, соответственно.

Отдаленные результаты гибридного лечения пациентов группы F представлены в Таблице 34.

Таблица 34 - Отдаленные результаты гибридных оперативных вмешательств пациентов групп F

Вид исхода	Количество пациентов, n (%)	Срок возникновения, Ме [Q1; Q3]
Рестеноз зоны реконструкции	4 (10,3%)	17 [15; 18]
Прогрессирование атеросклероза	5 (12,8%)	20 [20; 23]
Прогрессирование в других сосудистых бассейнах	-	-
Тромбозы	-	-
Ампутации	-	-
Летальные исходы	3 (7,7 %)	-

Для более детальной характеристики группы F исследована подгруппа пациентов с прогрессированием атеросклероза и представлена тактика их дальнейшего ведения.

В течение 20 [20; 23] месяцев после проведения гибридного оперативного вмешательства на артериях нижних конечностей, у 5 (12,8%) пациентов группы F было выявлено прогрессирование атеросклеротического поражения.

У двух из пяти пациентов после выполнения стентирования ОПА и БПШ выше щели коленного сустава с использованием синтетического протеза были обнаружены атеросклеротические бляшки со стенозом до 50-55% в ПкА. При этом никаких нарушений проходимости БПШ не было обнаружено. Зона стента в ОПА была проходима. Данным пациентам был проведен курс консервативной терапии, дистанция безболевого ходьбы составила 200 метров.

У третьего пациента после выполнения стентирования ОПА и аутовенозного БПШ выше щели коленного сустава произошло прогрессирование атеросклеротического поражения на контралатеральной нижней конечности с развитием III стадии заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна. При проведении ангиографии были выявлены тандемные стенозы в НПА и ОБА более 80%. В плановом порядке была выполнена попытка гибридного оперативного вмешательства, однако из-за технических трудностей данному пациенту было выполнено общеподвздошно-профундальное протезирование.

Через 2 года у двух пациентов после выполнения эндартерэктомией из бедренных артерий с аутовенозной пластикой с последующим стентированием ОПА и ЧТБА НПА были выявлены по данным ДС: стенозы в ПБА в нижней трети до 55-60% у одного пациента; стеноз в ПКА до 55% у другого пациента. Болевой синдром в покое в нижних конечностях не беспокоил, дистанция безболевой ходьбы составляла около 150 метров, принято было решение о дальнейшем наблюдении за пациентами с выполнением ДС-контролей артерий нижних конечностей.

На наш взгляд, важным моментом исследования явилось предоставление сравнительной характеристики значений исследуемых маркеров апоптоза/пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов с прогрессированием атеросклеротического поражения в послеоперационном периоде на фоне комбинированной антиоксидантной терапии и без нее (группы С и F). Отметим, что эффект антиоксидантной терапии повлиял на проапоптотический статус маркеров двух путей апоптоза у пациентов с ОААНК конечностей в первые часы после вмешательства. Так, нами отмечалось, что маркер sFas в группе С был снижен сильнее на 33,6% ($p=0,03$), при том, что маркер Вах ($p<0,01$) был выше на 52,4%, чем в группе F. И, следствием этого, явилась разница в значениях маркера VEGF A165 между сравниваемыми группами на 26%.

В дальнейшем, в течение следующих суток после операции, активация системы апоптоза привела к снижению NO на 74,8% - сильнее в группе С, чем в группе F. Отметим, что все сравнения удовлетворяли предварительно установленному уровню значимости $p<0,01$. Через неделю после вмешательства, уровень маркера, отвечающего за пролиферацию и миграцию клеток сосудистой стенки - PDGF BB ($p<0,01$) в группе С был выше на 18%, чем в группе F.

В итоге совместное применение комбинированной антиоксидантной терапии у пациентов с прогрессированием атеросклероза привела к тому, что к концу первого месяца уровень пролиферации PDGF BB ($p<0,01$) был на 18% ниже у пациентов группы F на фоне повышенных значений NO на 20% (Рисунок 55).

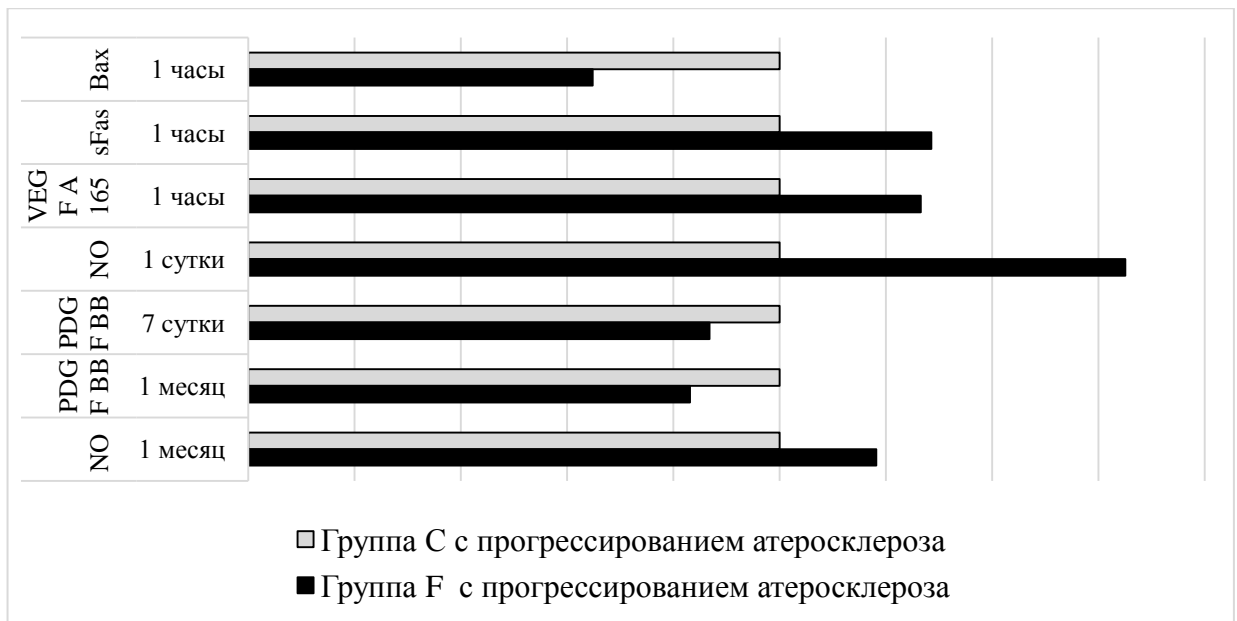


Рисунок 55 - Сравнение значений исследуемых маркеров между группами С и F у пациентов с прогрессированием атеросклероза в различные сроки послеоперационного периода

Для доказательства наличия взаимосвязей между маркерами у пациентов группы F с прогрессированием атеросклероза использовался ранговый корреляционный анализ. В результате анализа было выявлено наличие следующих взаимосвязей в группе F: sFas и NO ($r=+0,92$, $p<0,01$), Вах и NO ($r=-0,9$, $p=0,037$) на 1 сутки; sFas и PDGF BB ($r=-0,811$, $p<0,01$) на 14 сутки; sFas и PDGF BB ($r=+0,812$, $p<0,01$) на 21 сутки.

На фоне применения комбинированной антиоксидантной терапии пациенты с прогрессированием атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде в группе F отличалась от группы С в сторону преобладания ПБ стадии заболевания и более поздним сроком проявления данного осложнения ($p<0,001$). При этом наблюдались различия в маркерах двух путей апоптоза в первые часы (Вах, sFas), 1 сутки (NO), что отразилось на значениях маркера на 7 сутки (PDGF BB), и показателях PDGF BB и NO к концу первого месяца. У всех пациентов с прогрессированием атеросклероза группы С в отдаленном послеоперационном периоде возникла необходимость в выполнении повторных артериальных реконструкций. У трети пациентов они были неэффективны, что потребовало

выполнения ампутации нижних конечностей. Однако, у пациентов группы F с прогрессирующим атеросклеротическим поражением процент стеноза не превышал 55-60%, в связи с чем была проведена только консервативная терапия с положительным эффектом.

В последующем были рассмотрены пациенты группы F с рестенозом зоны реконструкции и представлена дальнейшая тактика их ведения.

У четырех пациентов (10,2%) группы F через 17 [15; 18] месяцев после проведения гибридных вмешательств произошло развитие рестеноза зоны реконструкций. У одного пациента на контрольном визите сроком через 16 месяцев после операции был обнаружен стеноз в средней трети в ОПА до 65-70% на правой нижней конечности. Изначально пациенту было проведено гибридное оперативное вмешательство - эндартерэктомией из бедренных артерий с аутовенозной пластикой + ЧТБА ОПА и НПА по методике "kissing". После последующей госпитализации в отделение сосудистой хирургии ему была выполнена повторная реканализация, ЧТБА ОПА на правой нижней конечности. В другом случае после выполнения эндартерэктомии из ОБА с ангиопластикой ПБА и ПКА через 15 месяцев была обнаружена атеросклеротическая бляшка с эффектом стеноза в ПКА до 60% с сегментарным кровотоком по берцовым артериям. Клиническая стадия заболевания представлена ПБ, проведен курс консервативной терапии.

Через 16-18 месяцев после выполнения стентирования НПА справа, с последующим выполнением ПББШ справа налево, у двух пациентов во время прохождения ДС - контроля был обнаружен стеноз до 55% в области дистального анастомоза ПББШ на левой нижней конечности. На момент осмотра пациентов, жалобы не предъявлялись, дистанция безболевого ходьбы составляла 150-200 метров, в связи с чем, был проведен курс консервативной терапии и продолжено динамическое наблюдение. На контрольном осмотре через 3 и 6 месяцев, после проведения дуплексного сканирования, ДС-картина осталась без изменений.

При сопоставлении групп С и F было выявлено, что количество пациентов с рестенозом зоны реконструкции было на 10% меньше в группе F в сравнении с

группой В при более отдаленном сроке возникновения данного осложнения ($p < 0,01$). Сравнение же исследуемых показателей у пациентов с прогрессирующим атеросклерозом в группах С и F не проводилось из-за малого количества пациентов с данным осложнением в группе F.

В последующем, при выполнении ДС артерий нижних конечностей у 30 (76%) пациентов группы F с нормальным течением послеоперационного периода, толщина неоинтимы через год составила 0,7 [0,6; 0,8] мм. Через 1,5 года наблюдалось незначимое увеличение ее толщины до 0,8 [0,6; 0,8] мм ($p > 0,05$). Через 2 года толщина неоинтимы никак не отличалась относительно ее значений на 1,5 года ($p > 0,05$) и составила 0,83 [0,7; 0,9] мм.

По данным УЗДГ через 2 года значения ЛПИ составили 0,94 [0,7; 0,99]. Из приведенных выше результатов можно сделать вывод, что толщина неоинтимы в общем случае увеличивается в указанные промежутки времени, но значимый прирост ее толщины был на второй год исследования относительно первого года ($p = 0,03$).

При сравнении толщины неоинтимы у пациентов групп С и F с нормальным послеоперационным течением, под влиянием комбинированной антиоксидантной терапии наблюдалась меньшая толщина неоинтимы у пациентов группы F по сравнению с группой С через 1, 1,5 и 2 года ($p < 0,05$).

При этом ЛПИ был выше у пациентов группы F в сравнении с его значениями у пациентов группы С ($p = 0,02$). При сравнении исследуемых маркеров между пациентами групп С и F с неоинтимой в зонах гибридных вмешательств были получены следующие различия, представленные в Таблице 35.

Из представленных данных можно сделать вывод, что полученные результаты совпадают с результатами сравнения значений исследуемых маркеров групп В и Е с неоинтимой зоны реконструкции. А именно, повышенные значения проапоптотического маркера Вах в первую волну апоптоза с последующими более сниженными значениями VEGF А 165 в первые часы и NO на 1-е сутки после операции и усиленным пролиферативным ответом в виде повышенных значений маркера PDGF ВВ как на 7-е сутки, так и к концу первого месяца.

Таблица 35 - Сравнение исследуемых биомаркеров между пациентами с неопитимой зоной реконструкции в группах С и F

Показатели/ Подгруппы		Первые часы	1 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	1 месяц
Вах (нг/мл)	C	28,2 [26; 32]	27,7 [26; 29]	23,9 [23,4; 24,6]	23,5 [21; 28]	27,3 [23,6; 30]	26,9 [24; 28]
	F	23,4* [22,8; 25,8]	26,9 [26; 27,6]	23,5 [22,4; 23,8]	24,6 [23,6; 25]	25,8 [24; 26,7]	24,4 [24; 25]
Vcl-2 (нг/мл)	C	2,9 [2,7; 3,1]	2,9 [2,6; 3,1]	4,1 [4; 4,2]	4 [3,8; 4,3]	3,9 [3,5; 4,1]	4 [3,9; 4,3]
	F	4* [3,4; 4,8]	3,4* [3,2; 3,6]	4,2 [4; 4,5]	4,1 [3,8; 4,2]	3,8 [3,6; 4,1]	4,2 [3,9; 4,4]
VEGF (пг/мл)	C	277 [206; 304]	276 [238; 300]	506 [406; 567]	433 [386; 479]	423 [384; 501]	382 [348; 415]
	F	322* [276; 345]	323* [301; 346]	534 [469; 582]	489 [389; 578]	478 [367; 546]	393 [327; 489]
NO (ммоль/л)	C	239 [211; 269]	189 [173; 200]	200 [189; 233]	345 [324; 370]	297 [289; 307]	237 [215; 273]
	F	242 [208; 251]	229* [205; 235]	248* [236; 265]	326 [311; 352]	304 [296; 319]	279* [296; 293]
PDGF (нг/мл)	C	14,1 [12,6; 14,8]	16,5 [13,9; 18]	24,3 [22,9; 25]	23,9 [19,9; 26]	18,7 [17; 20]	12,4 [12; 13]
	F	13,1 [12,8; 13,7]	13,3* [12,9; 13,9]	19* [18,7; 20,1]	18,9* [18; 19,5]	18,4 [17; 18,9]	11* [10; 11,8]
sFas (нг/мл)	C	0,87 [0,75; 0,94]	0,84 [0,7; 0,9]	0,84 [0,78; 0,9]	0,78 [0,6; 0,9]	0,38 [0,2; 0,4]	0,91 [0,8; 1]
	F	0,9 [0,87; 0,92]	0,91 [0,8; 0,93]	0,9 [0,83; 0,91]	0,87 [0,82; 0,92]	0,54* [0,48; 0,6]	0,92 [0,9; 0,94]

*-статистически значимое различие

Летальные исходы составили 3 (7,7%) случая; причиной одной из смертей стало злокачественное новообразование, причиной двух других новая коронавирусная инфекция Covid-19.

3.8. Динамика изменения маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов группы G и их влияние на отдаленные результаты оперативного лечения

Предварительно проведенные расчеты минимального количества пациентов в группе G для нахождения статистически значимых различий в динамике исследуемых маркеров, помогли определить оптимальное количество пациентов, которое составило 31 человек.

Как и в предыдущих группах, проведено сопоставление исходных значений маркеров с показателями, полученными от здоровых добровольцев. У пациентов группы G определялся высокий уровень маркеров PDGF BB, VEGF A165 и Вах при низких значениях sFas, Bcl-2 и NO по сравнению со значениями здоровых добровольцев ($p < 0,01$) (Таблица 36).

Таблица 36 - Сравнение исходных значений исследуемых маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия групп G, D и здоровых добровольцев

Показатели, Me [Q1-Q3]	Вах (нг/мл)	Bcl-2 (нг/мл)	sFas (нг/мл)	PDGF BB (нг/мл)	NO (ммоль/л)	VEGF A165 (пг/мл)
Здоровые добровольцы	15,1 [13,9; 15,7]	5,3 [4,9; 5,7]	1,1 [0,97; 1,2]	8,9 [8,3; 9,5]	340 [308; 377]	86 [66; 107]
Исходные значения пациентов группы D	24,4 [23,6; 25,4]	4,6 [4,1; 4,9]	0,93 [0,8; 0,96]	13,4 [12,9; 14]	243 [236; 250]	367 [305; 402]
Исходные значения пациентов группы G	24,7 [24,1; 25,6]	4,5 [4,1; 4,6]	0,89 [0,85; 0,9]	13,8 [13,5; 14]	237 [225; 241]	356 [295; 389]
*-статистически значимое отличие значений пациентов с ОААНК от значений здоровых добровольцев						

У пациентов с ишемической болезнью сердца, исходные значения биомаркера sFas были ниже в сравнении с пациентами без данной сопутствующей патологии ($p < 0,01$). Также, как и в группе F, было отмечено влияние стадии заболевания на исходные значения биомаркера Вах. У пациентов с III стадией заболевания значения данного маркера были повышены в сравнении с его значениями у пациентов со IIВ стадией заболевания ($p = 0,02$).

В результате сопоставления исходных показателей маркеров между группами D и G, статистически значимых различий не наблюдалось ($p > 0,05$) (Таблица 37).

Применение витамина E в дозе 400 МЕ/сутки у пациентов группы G в течение 7 дней до проведения открытых оперативных вмешательств не привело к достоверно значимым изменениям значений биомаркеров апоптоза (Вах, Bcl-2,

sFas), пролиферации клеток (PDGF BB, VEGF A165), эндотелиальной дисфункции клеток (NO), $p>0,05$.

В первые часы после операции, какое-либо значимое изменение маркеров ($p>0,05$) от значений, полученных непосредственно до оперативных мер в группе G, не наблюдалось. Единственный маркер, который снизил свои значения в указанный промежуток времени был VEGF A165 ($p=0,02$) (Рисунок 56).

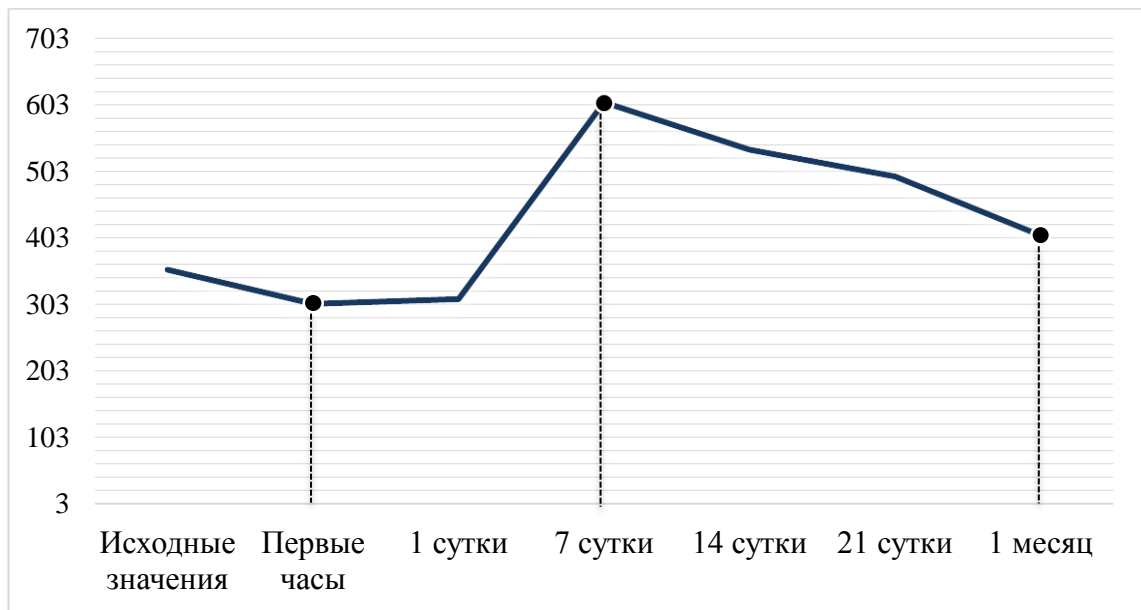


Рисунок 56 - Динамика изменения маркера VEGF A165 у пациентов группы G в послеоперационном периоде

Последующее межгрупповое сравнение маркеров на данный период выявило, что значение Вах ($p<0,01$) было выше у пациентов группы D, при более низком уровне белков VEGF A165 и Bcl-2 ($p<0,01$), чем в сопоставимой группе G (Таблица 36).

У пациентов группы G через сутки после операции, было отмечено, как регулятор апоптоза Bcl-2 ($p<0,01$) и маркер дисфункции эндотелия NO ($p=0,01$) резко снизили свои значения (Рисунок 57). Совместно со снижением, в этот же период наблюдался рост уровня Вах ($p<0,01$) по сравнению с первыми часами (Рисунок 58).

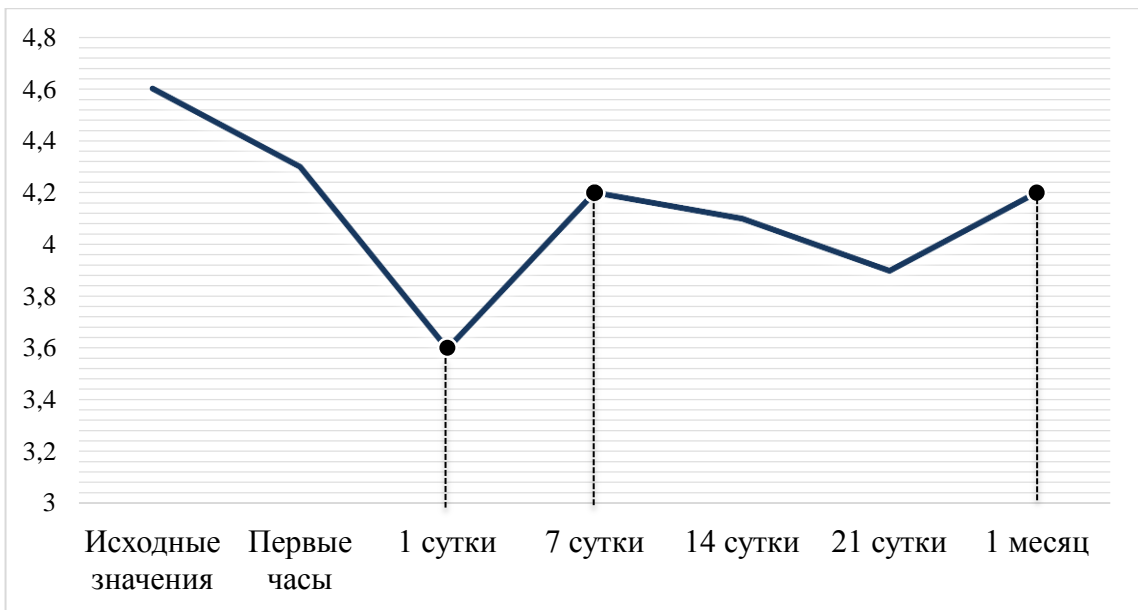


Рисунок 57 - Динамика изменения маркера Vcl-2 у пациентов группы G в послеоперационном периоде

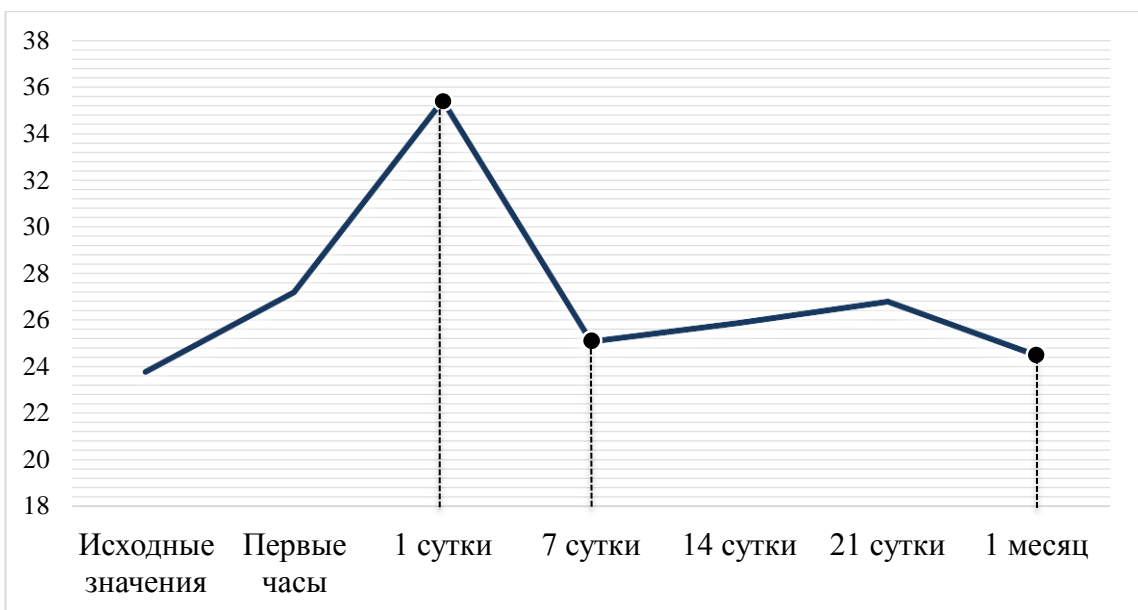


Рисунок 58 - Динамика изменения маркера Vax у пациентов группы G в послеоперационном периоде

Последующие найденные коэффициенты корреляции подтвердили наличие связи между Vcl-2 и NO ($r=+0,52$, $p<0,01$) в указанный промежуток времени. Также была выявлена обратная взаимосвязь между повышенным количеством лейкоцитов в сыворотке крови и значениями NO в указанный промежуток времени ($r=-0,837$, $p=0,01$). Нужно отметить, что у пациентов, которые перенесли

многоуровневые артериальные реконструкции, наблюдалось более выраженное снижение значений NO на 1 сутки по сравнению с пациентами с одноуровневыми оперативными вмешательствами ($p=0,01$).

При последующем сравнении значений маркеров между группами D и G на 1-е сутки, было найдено, что в группе D значения маркеров Bcl-2 ($p < 0,01$) и NO ($p=0,01$) были ниже, чем их количество у пациентов группы G (Таблица 37).

При следующем обследовании пациентов на 7 сутки, можно было наблюдать достижение пикового значения маркеров PDGF BB и VEGF A165 ($p < 0,01$) за весь период исследования (Рисунок 59).

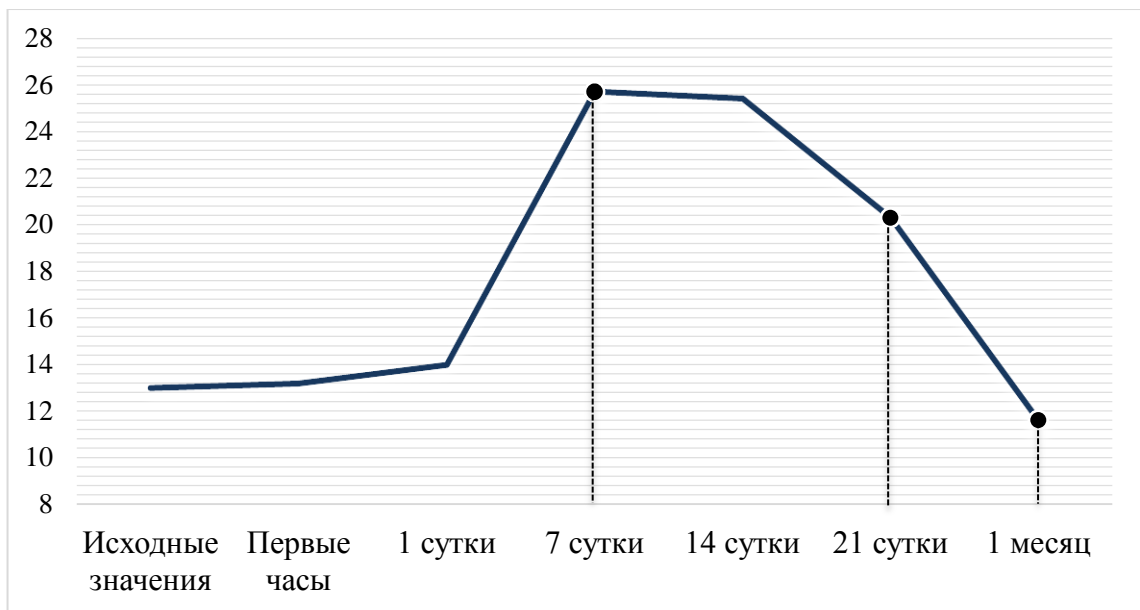


Рисунок 59 - Динамика изменений маркера PDGF BB в послеоперационном периоде у пациентов группы G

Помимо изменений PDGF BB также отмечался значимый рост белков Bcl-2 ($p < 0,01$) и NO ($p=0,01$) и снижение значений белка Вах ($p < 0,01$).

При сопоставлении групп D и G, фиксировалось, что уровень белка PDGF BB ($p < 0,01$) был выше в группе D при более низких значениях NO ($p < 0,01$) относительно группы G. В указанный период сохранилась та же разница по маркеру VEGF A165 между сопоставимыми группами ($p < 0,001$) (Таблица 37).

Через две недели после операции, маркер дисфункции эндотелия NO ($p=0,03$) достиг своих максимальных значений в группе G (Рисунок 60).

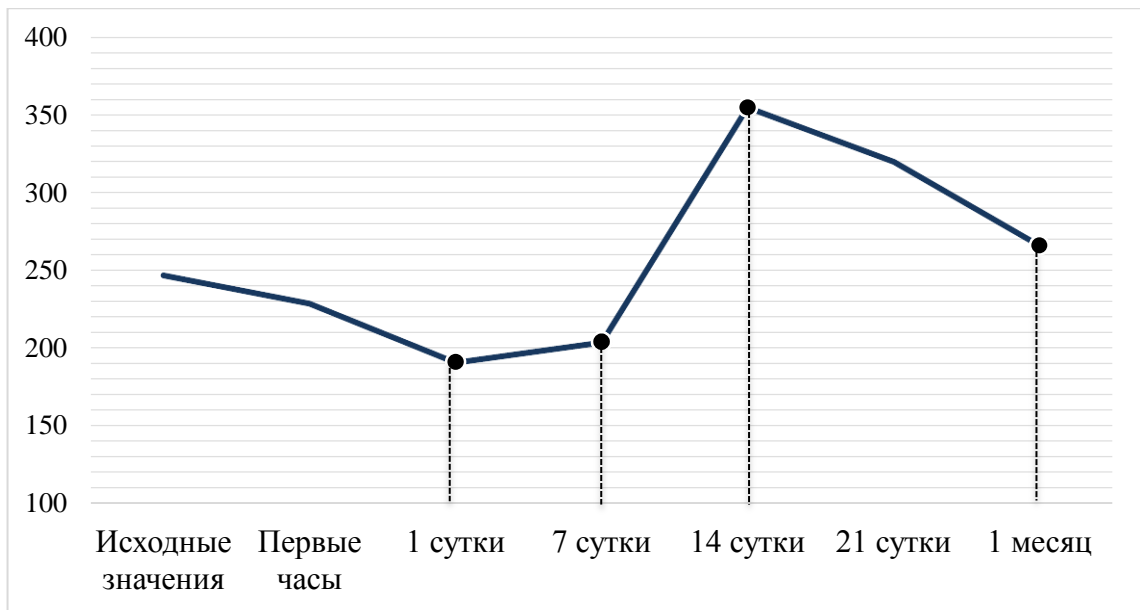


Рисунок 60 - Динамика изменений метаболитов оксида азота в послеоперационном периоде у пациентов группы G

В результате дальнейшего сравнения маркеров в группах D и G на 14 сутки, было выявлено, что у пациентов группы D, показатель пролиферации и миграции VEGF A165 ($p < 0,01$) был снижен в сравнении с его значением у пациентов группы G (Таблица 37).

На 21-е сутки наблюдалось достижение маркером sFas ($p < 0,01$) нижнего предела, что в свою очередь вызвало снижение уровня PDGF BB ($p = 0,02$) (Рисунок 61). При последующем применении корреляционного анализа, нам удалось обнаружить прямую связь между PDGF BB и sFas ($r = +0,637$, $p < 0,01$).

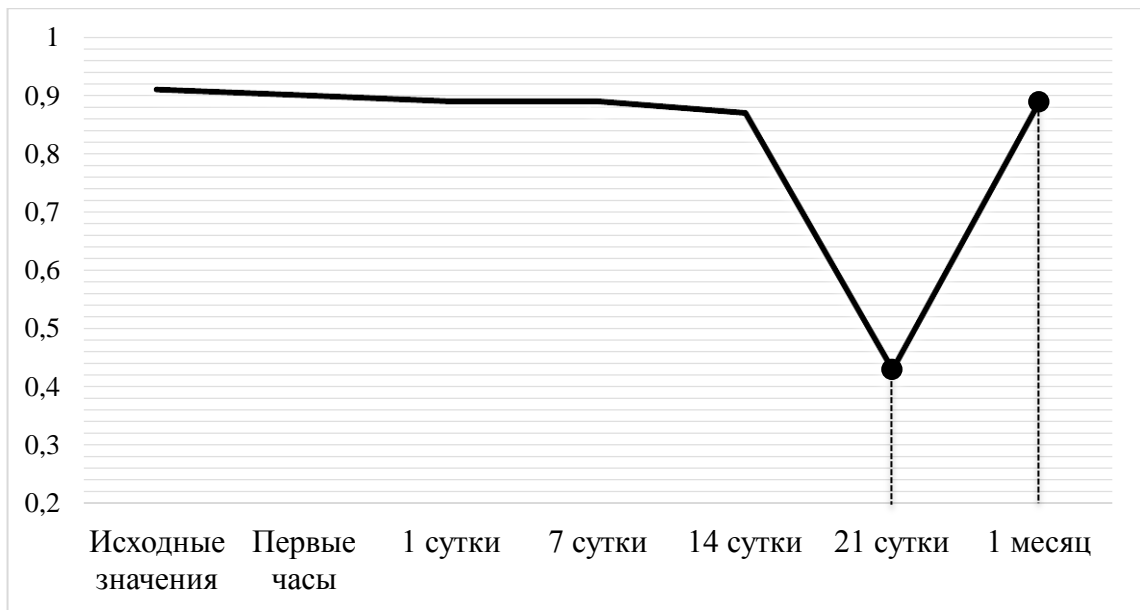


Рисунок 61 - Динамика изменения маркера sFas в послеоперационном периоде у пациентов группы G

При проведении межгруппового сравнения обнаружено достоверно значимое различие по маркеру рецепторного пути апоптоза sFas ($p < 0,01$) (Таблица 37).

Через месяц после оперативного вмешательства, уровень маркеров Bcl-2 ($p < 0,01$) и sFas ($p < 0,01$) был повышен на фоне сниженных значений PDGF BB ($p < 0,01$), NO ($p = 0,04$), Вах ($p < 0,01$), VEGF A165 ($p < 0,01$) относительно прошлого периода. Следует отметить, что все исследуемые маркеры к концу первого месяца вернулись к своим исходным значениям PDGF BB ($p = 0,56$), VEGF A165 ($p = 0,835$), sFas ($p = 0,06$), Вах ($p = 0,73$), Bcl-2 ($p = 0,3$), NO ($p = 0,9$).

В дальнейшем при сравнении значений маркеров между группами D и G к концу первого месяца, фиксировались более низкие значения маркера NO ($p < 0,01$) у пациентов группы D при том что уровень белков PDGF BB ($p < 0,01$) был выше по сравнению с группой G (Таблица 37).

Достаточно важным является сопоставление значений маркеров апоптоза/пролиферации и дисфункции эндотелия в группе G и индикативных пороговых значений маркеров для пациентов с прогрессированием атеросклероза в группе D.

Таблица 37 - Сравнение исследуемые показатели апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов групп D и G

Показатели (Me [Q1-Q3]) / временной интервал	Группа D	Группа G
Значения Вах в первые часы, нг/мл	41,2 [32,3; 53,5]	26,4 [21,9; 30]
Значения Vcl-2 в первые часы, нг/мл	2,3 [1,9; 2,9]	4,3 [3,7; 4,6]
Значения VEGF A 165 в первые часы, пг/мл	190 [163; 214]	305 [262; 364]
Значения Vcl-2 в первые сутки, нг/мл	2,5 [2; 2,9]	3,6 [3,3; 3,8]
Значения NO на первые сутки, ммоль/л	148,2 [92,3; 158]	188 [160; 206]
Значения PDGF BB на 7 сутки, нг/мл	32,4 [27,3; 39,5]	25,6 [24,8; 28,7]
Значения NO на 7 сутки, ммоль/л	174 [114; 202]	247 [192; 300]
Значения VEGF A 165 на 7 сутки, пг/мл	510 [410; 604]	606 [507; 668]
Значения VEGF A 165 на 14 сутки, пг/мл	448 [383; 504]	535 [486; 624]
Значения sFas на 21 сутки, нг/мл	0,27 [0,23; 0,31]	0,44 [0,39; 0,52]
Значения PDGF BB 1 месяц, нг/мл	14,3 [12,6; 18,8]	11,5 [10,4; 17,2]
Значения NO 1 месяц, ммоль/л	233 [187; 271]	263,5 [250; 283]

Исходно точки cut-off были получены для маркеров Вах и sFas и составляли, соответственно $\geq 25,4$ нг/мл и $\leq 0,89$ нг/мл. Другими словами, риск развития прогрессирования растет, как только вышеупомянутые значения маркеров становятся выше пороговых значений для Вах и ниже для sFas. В группе G данные маркеры отклоняются на 3% и 5%, соответственно.

В первые часы пороговые значения были получены для группы маркеров Вах и sFas ≥ 50 нг/мл и $\leq 0,7$ нг/мл, соответственно. В данном случае отклонения от точек предиктора более существенны. В группе G значения маркеров на первые часы составили 26,4 нг/мл и 0,91 нг/мл. Для маркера VEGF A165 отклонение от порогового значения составляло 56% в большую сторону.

При дальнейшем поиске факторов риска прогрессирования атеросклероза в группе D был получен предиктор в виде маркера NO на 1 сутки. Его пороговое значение составило 118 ммоль/л и ниже, при том что, значение в группе G составило 188 ммоль/л, что на 59% отклоняется от точки cut-off в сторону снижения риска развития прогрессирования атеросклероза на оперированной либо на контралатеральной конечности.

Как через семь, так и четырнадцать суток после операции маркер PDGF BB явился наиболее надежным предиктором развития заболевания с пороговым значением в 36,5 нг/мл и 35,7 нг/мл, соответственно. В группе G значения составили соответственно 25,6 нг/мл и 25,5 нг/мл. Таким образом, общее среднее отклонение от пороговых значений составило 30%.

К концу первого месяца в качестве предикторов развития прогрессирования атеросклероза выступили маркеры PDGF BB и NO, при этом значения пациентов группы G отличались от пороговых значений на 17 и 28%, соответственно (Таблица 38).

Таблица 38 - Сравнение пороговых значений маркеров - предикторов риска развития прогрессирования атеросклероза у пациентов групп D и значений данных маркеров у пациентов группы G

Пороговые значения	Группа G	Δ	%
Вах исходные значения			
$\geq 25,4$ нг/мл	24,7	0,7	3
sFas исходные значения			
$\leq 0,89$ нг/мл	0,93	0,04	5
Вах в первые часы			
≥ 50 нг/мл	26,4	23,6	47
sFas в первые часы			
$\leq 0,7$ нг/мл	0,9	0,2	29
VEGF A 165 в первые часы			
≤ 202 пг/мл	316	114	56
NO в 1 сутки			
≤ 118 ммоль/л	188	70	59
PDGF BB на 7 сутки			
$\geq 36,5$ нг/мл	25,6	10,9	30
PDGF BB на 14 сутки			
$\geq 35,7$ нг/мл	25,5	10,2	29
PDGF BB на 1 месяц			
$\geq 13,4$ нг/мл	11,1	2,3	17
NO на 1 месяц			
≤ 213 ммоль/л	272	59	28

Через два года, первичная проходимость после выполнения открытых оперативных реконструкций у пациентов группы G составила 76%. Отдаленные результаты открытых оперативных вмешательств у пациентов группы G представленные в Таблице 39.

Таблица 39 - Клинические исходы открытых оперативных вмешательств у пациентов группы G

Вид исхода	Количество пациентов, n (%)	Срок возникновения, Ме [Q1; Q3]
Прогрессирование атеросклероза	5 (12,8 %)	24 [20; 24]
Прогрессирование атеросклероза в других сосудистых бассейнах	1 (2,6%)	24
Рестеноз зоны реконструкции	5 (12,8%)	18 [17; 19]
Тромбозы	1 (2,6%)	-
Ампутация конечности	1 (2,6%)	20
Летальные исходы	2 (5,1%)	-

Далее рассмотрим пациентов группы G, у которых в отдаленном послеоперационном периоде произошло либо прогрессирование атеросклероза на оперированной или контралатеральной конечности, либо развитие рестеноза зоны оперативных реконструкций.

Через 24 [20; 24] месяца с момента проведения открытого оперативного вмешательства, у 5 (12,8%) пациентов группы G произошло прогрессирование атеросклеротического поражения либо на оперируемой (выше/ниже первичной зоны реконструкции), либо на контралатеральной конечности. Первый пациент данной подгруппы был повторно госпитализирован в отделение гнойной хирургии с диагнозом: Атеросклероз. Посттромботическая окклюзия аутовенозного бедренно-подколенного шунта. IV стадия заболевания. С учетом отсутствия периферического русла по данным аортоартериографии нижних конечностей и прогрессирование некротического процесса было принято решение о выполнении ампутации бедра. У трех пациентов данной подгруппы после выполнения БАБШ при проведении ДС артерий нижних конечностей был выявлен стеноз в устье ГАБ до 70% на правой нижней конечности в первом случае, у двух других пациентов увеличение атеросклеротической бляшки в ПКА

до 50-60%. У последнего пациента данной подгруппы после выполнения аутовенозного БПШ выше щели коленного сустава был выявлен стеноз в ПкА до 55%. Проходимое безболевого расстояние у вышеуказанных пациентов составило около 200 метров, в связи с чем, было принято решение воздержаться от повторных реконструкций и продолжить наблюдение за пациентами с выполнением ДС контроля артерий нижних конечностей.

Для проведения оценки влияния применения витамина Е совместно с «Актовегином»® представляется интересным сравнение двух групп D и G по исследуемым маркерам у пациентов с прогрессированием атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде.

Исходно, ни один из показателей не отличался между группами ($p > 0,05$). Концептуальные различия стали проявляться, начиная с первых часов после операции. Так, уровень Вах в группе G составил 29 нг/мл против 53,9 нг/мл в группе D. Вторым значимым маркером в указанный период времени был VEGF A165, значения которого в группе D составили 164 пг/мл, в группе G - 276 пг/мл. В этот же период значимое различие замечено у sFas, 0,62 нг/мл и 0,9 нг/мл, соответственно в группе D и G.

Уже через день после операции, помимо сохраняющейся значимой разницы между PDGF BB в группе D и G (24 нг/мл и 17,8 нг/мл, соответственно), также фиксировалось расхождение по показателю NO (группа D – 91 ммоль/л, группа G – 151 ммоль/л, соответственно).

Через неделю после операции значения NO составляли 114 ммоль/л в группе D и 190 ммоль/л в группе G.

На 14-е сутки наблюдалось различие между маркерами PDGF BB и NO. Касательно первого, то в группе D его значение составило 40 нг/мл при том, что в группе G - 31,3 нг/мл. Значение маркера NO в группе D составило 243 ммоль/л, а в группе G – 340 ммоль/л.

21 сутки ознаменовались более сильным снижением значений sFas в группе D – 0,24 нг/мл на фоне группы G – 0,4 нг/мл.

Сроком на 1 месяц, значимое различие между группами достигнуто по маркеру NO (в группе D – 184 ммоль/л, в то время как в G – 246 ммоль/л.). Статистическая значимость гарантируется для всех вышеупомянутых различий при $p < 0,05$.

Относительная разница количества пациентов с прогрессированием атеросклероза в группах D и G в отдаленном послеоперационном периоде составила 15% ($p = 0,03$). Данная разница, с нашей точки зрения, объясняется сильным антиапоптотическим эффектом антиоксидантной терапии в первую волну с последующим снижением интенсивности протекания дисфункции эндотелия на 1 сутки и ответной пролиферативной реакцией клеток сосудистой стенки с 1 по 14 сутки. Данный эффект в группе G, позволил отодвинуть срок развития прогрессирования атеросклероза с меньшим ростом процента стеноза атеросклеротического поражения *de novo* по сравнению с пациентами группы G ($p < 0,05$).

Не менее важным моментом исследования является предоставление характеристики пациентов с рестенозом зоны реконструкции группы G в плане проводимых оперативных мер.

У 5 (12,8%) пациентов группы G через 18 [17; 19] месяцев после операции было обнаружено развитие рестеноза зоны реконструкции на оперированной конечности. В одном случае произошло развитие гемодинамически значимого стеноза дистального анастомоза синтетического БПШ выше щели коленного сустава. После получения нагрузочной дозы антиагрегантов, была успешно выполнена ангиопластика дистального анастомоза БПШ с компенсацией кровообращения. У двух пациентов при проведении ДС артерий нижних конечностей через 18 месяцев был выявлен стеноз в области дистального анастомоза до 60% после выполнения аутовенозного БПШ ниже щели коленного сустава. У 2-х пациентов на очередном контрольном осмотре были выявлены стенозы до 50-55% в области дистальных анастомозов после выполнения БАБШ.

Не менее важным моментом исследования является проведение сравнительной характеристики маркеров апоптоза, пролиферации клеток и

дисфункции эндотелия у пациентов с рестенозом зоны реконструкции в группах D и G. Непосредственно до операции, межгрупповых различий по маркерам пациентов с рестенозом выявлено не было.

Однако уже в течение первых часов после оперативных мер были зафиксированы различия в маркерах Vcl-2 (группа D – 1,7 нг/мл; группа G – 4,6 нг/мл или 2,7 раза), Вах (группа D – 53 нг/мл; группа G – 30,4 нг/мл или 74%), VEGF A165 (группа D - 95 пг/мл; G – 204 пг/мл или в 2,1 раза) между группами D и G (Рисунок 62).

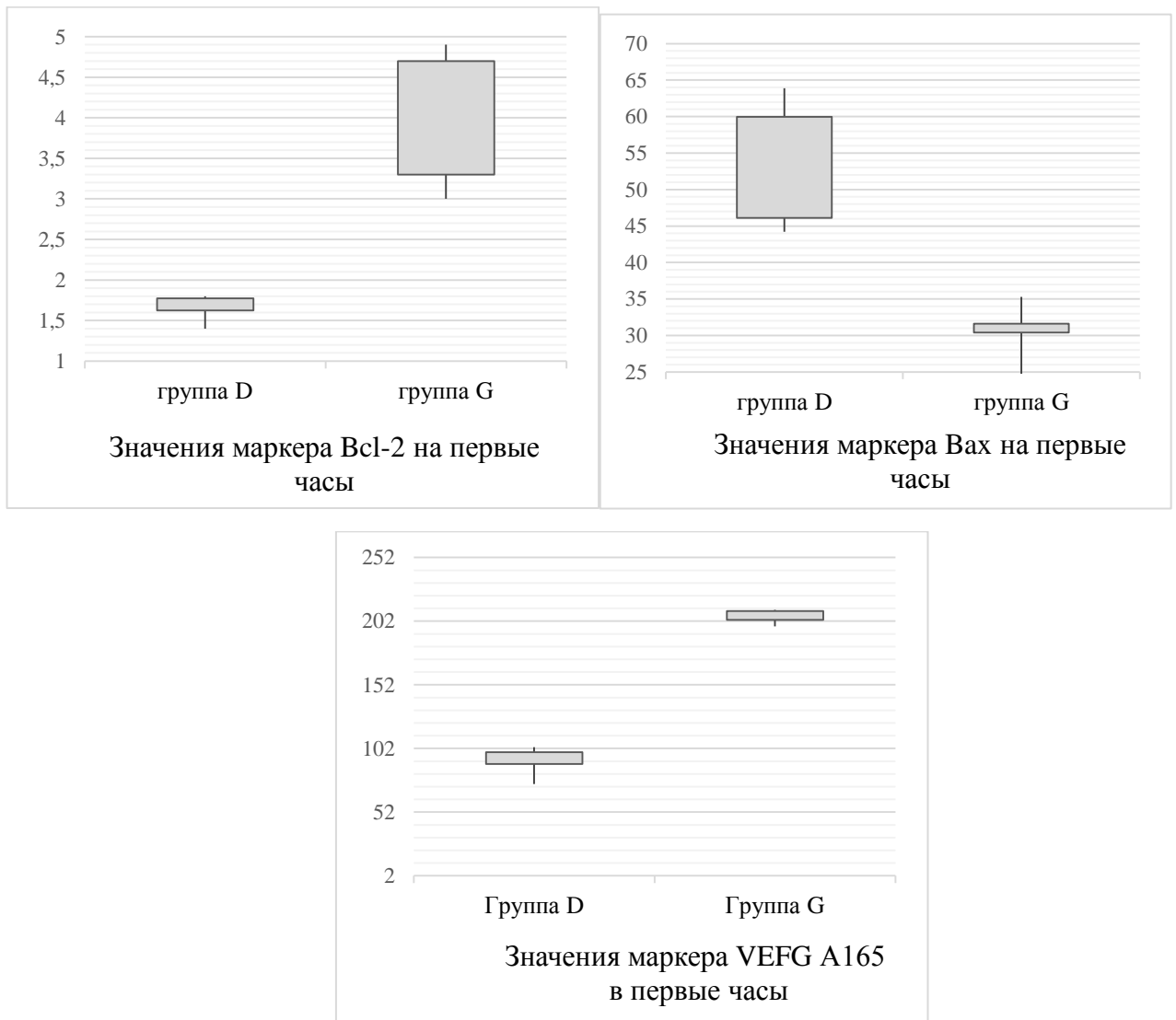


Рисунок 62 - Сравнение значений маркеров Вах, Vcl-2 и VEGF A165 у пациентов с рестенозом зоны вмешательства групп D и G в первые часы

На 1 сутки имелось различие по маркеру NO (группа D – 91,5 ммоль/л, группа G – 140 ммоль/л, или 53%) (Рисунок 63).

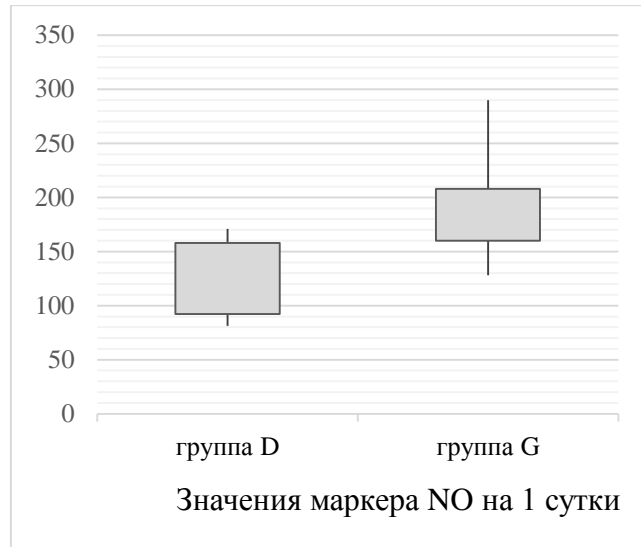


Рисунок 63 - Сравнение значений метаболитов оксида азота у пациентов с рестенозом зоны вмешательства групп D и G на 1 сутки

Дальнейшее существенное различие между маркерами PDGF BB и VEGF A165 в группах D и G наблюдалось на 7 сутки. Так, маркер пролиферации PDGF BB в группе D равнялся 40 нг/мл при том, что в группе G его значение составляло 28,9 нг/мл. Значения маркера VEGF A 165 в группе G составляли 476 пг/мл, в группе D – 294,5 пг/мл (Рисунок 64).

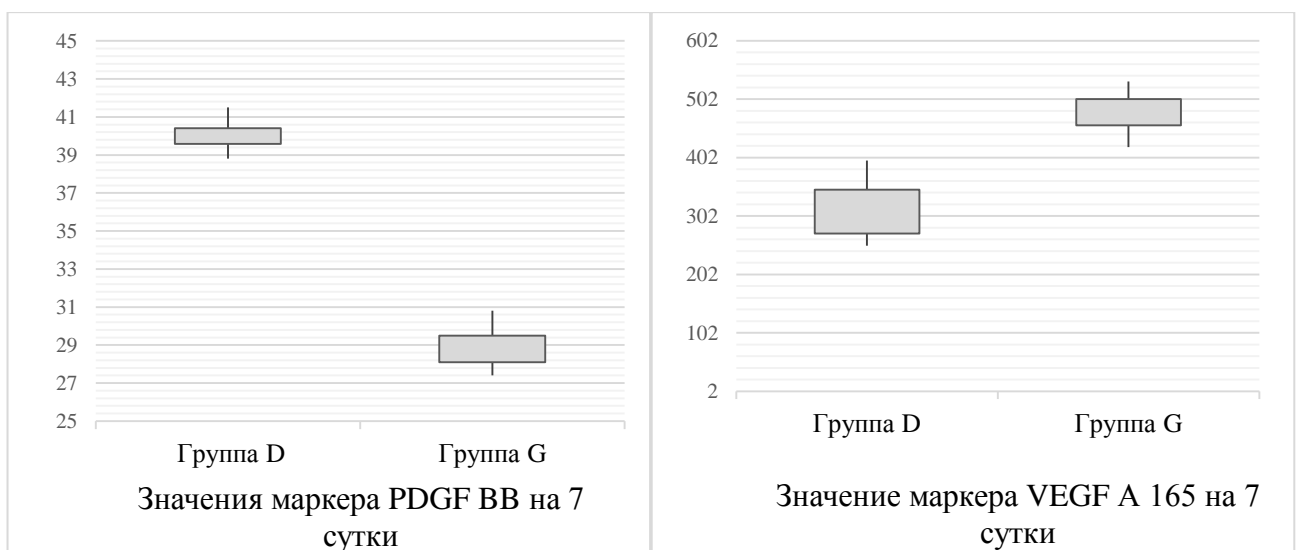


Рисунок 64 - Сравнение значений маркеров PDGF BB и VEGF A165 у пациентов с рестенозом зоны вмешательства групп D и G на 7 сутки

Отдельно стоит отметить маркеры sFas и NO. Что касается первого, то значимых различий на протяжении всего периода исследования между группами D и G не наблюдалось.

С другой стороны, значения NO, начиная с первых суток и вплоть до первого месяца после операции, показали сильные различия между группами. Пикового межгруппового расхождения маркер достиг на 14 сутки (группа D – 203 ммоль/л; группа G – 300 ммоль/л, или 49%). Для всех вышеперечисленных различий уровень значимости U критерия Манна-Уитни составил менее 5%.

У 29 (74%) пациентов с нормальным течением послеоперационного периода по данным ДС артерий нижних конечностей, толщина неоинтимы через год составила 1 [0,8; 1,1] мм.

Через 1,5 года наблюдалось незначимое увеличение ее толщины до 1,1 [0,8; 1,1] мм ($p>0,05$). Через 2 года наблюдалось увеличение толщины неоинтимы до 1,15 [0,9; 1,2] мм, однако значимо никак не отличалась относительно значений на 1,5 года ($p>0,05$).

По данным УЗДГ через 2 года значения ЛПИ составили 0,9 [0,85; 0,95]. Стоит отметить, что динамика толщины неоинтимы за год, в общем, увеличивается от периода к периоду, однако, остается статистически незначимой ($p>0,05$).

При сравнении толщины неоинтимы у пациентов групп D и G с нормальным послеоперационным течением, под влиянием комбинированной антиоксидантной терапии наблюдалась меньшая ее толщина у пациентов группы G по сравнению с группой D через 1, 1,5 и 2 года ($p<0,05$).

При этом значения ЛПИ был выше у пациентов группы G в сравнении с его значениями у пациентов группы D ($p=0,04$).

Сравнение исследуемых маркеров между пациентами групп D и G с неоинтимой в зонах открытых вмешательств представлены в Таблице 40.

Нужно отметить, что полученные результаты в группах B-D соотносились с таковыми в группах E-G.

Таблица 40 - Сравнение исследуемых биомаркеров между пациентами групп D и G с неоитимой зоны реконструкции

Показатели/ Подгруппы		Первые часы	1 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	1 месяц
Вах (нг/мл)	D	34,9 [30; 39,2]	34,7 [30; 37]	24,7 [21; 27]	25,5 [24,4; 29]	27,4 [26,9; 29]	25,3 [24; 27]
	G	22,1* [21; 28,2]	32 [29; 36]	24,7 [23,6; 25,7]	25,9 [25; 27]	26,8 [25,4; 28]	24,6 [23,8; 25,3]
Bcl-2 (нг/мл)	D	2,8 [2; 3]	2,7 [2,4; 3]	4,1 [4; 4,2]	4,1 [3,8; 4,2]	3,8 [3,6; 4,1]	4,1 [3,8; 4,2]
	G	4,4* [3,8; 4,6]	3,6* [3,4; 4]	4,3 [4; 4,6]	4,1 [4; 4,2]	3,9 [3,7; 4,2]	4,2 [4; 4,5]
VEGF (пг/мл)	D	210 [201; 220]	239 [214; 258]	566 [494; 669]	500 [404; 517]	470 [382; 536]	390 [347; 422]
	G	321* [297; 374]	312* [302; 325]	629 [545; 700]	562 [501; 663]	501 [467; 543]	413 [355; 480]
NO (ммоль/ л)	D	240 [224; 250]	155 [149; 162]	199 [176; 208]	374 [307; 384]	338 [301; 367]	257 [244; 298]
	G	229 [184; 248]	203* [173; 230]	264* [244; 321]	378 [341; 392]	339 [312; 367]	278 [261; 289]
PDGF (нг/мл)	D	13,7 [13; 15]	15,5 [14; 18]	28,6 [26; 32]	27,8 [26; 29]	19,7 [18; 21]	12,7 [12; 14]
	G	13,2 [12,8; 15]	13,9 [13; 14,7]	25,2* [24,6; 26,7]	25,1 [23,6; 25,6]	20,1 [19; 20,9]	10,9* [9,8; 12]
sFas (нг/мл)	D	0,88 [0,81; 0,99]	0,9 [0,73; 0,98]	0,85 [0,7; 0,99]	0,85 [0,78; 0,93]	0,27 [0,23; 0,31]	0,86 [0,83; 0,89]
	G	0,91 [0,81; 0,93]	0,9 [0,87; 0,92]	0,89 [0,86; 0,9]	0,86 [0,81; 0,93]	0,42* [0,38; 0,47]	0,89 [0,86; 0,93]

* - статистически значимое различие между сравниваемыми группами (p<0,05)

Предложенная комбинированная терапия в указанные сроки повлияла на уменьшение количества проапоптических маркеров в первую волну апоптоза, что привело к менее выраженной ответной пролиферации и миграции клеток сосудистой стенки, и как следствие, к формированию меньшей толщины неоинтимы в зоне вмешательства, чем у пациентов без дополнительной терапии.

Летальные исходы составили 2 (5,1%) случая причиной которых стала новая коронавирусная инфекция Covid-19.

3.9. Алгоритм профилактики развития рестеноза зоны реконструкции и прогрессирования атеросклероза после оперативных вмешательств у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей

На основании полученных в ходе исследования результатов нами был сформулирован алгоритм профилактики развития рестеноза зоны реконструкции и прогрессирования атеросклероза после выполнения различных оперативных вмешательств у пациентов с ОААНК (Рисунок 65). Согласно данному алгоритму при поступлении в стационар пациентов с ОААНК рекомендуется проводить определение исходных значений маркеров апоптоза в сыворотке крови методом ИФА. В случае, повышенных значений данных маркеров рекомендуется дополнительное применение к базисной терапии Витамина Е в дозе 400 МЕ 1 раз в сутки в предоперационном периоде.

После выполнения различных видов оперативных вмешательств на магистральных артериях нижних конечностей требуется оценка динамики маркеров апоптоза в раннем послеоперационном периоде, а при выполнении открытых и гибридных вмешательств еще и интраоперационный забор сосудистой стенки с атеросклеротическим поражением с дальнейшей оценкой количества маркеров апоптоза.

Определение количества маркеров апоптоза в сыворотке крови и сосудистой стенке позволяет прогнозировать развитие послеоперационных осложнений, таких как рестеноз зоны реконструкции после выполнения эндоваскулярных операций, а также прогрессирование атеросклероза после проведения открытых и гибридных вмешательств.

После выполнения эндоваскулярных вмешательств развитие рестеноза зоны реконструкции в отдаленном послеоперационном периоде прогнозируется на основе анализа уровня маркера Вах. Значения Вах 34,8 [27,1; 42,5] нг/мл в первый час и 32,2 [27; 37,4] нг/мл на первые сутки ассоциированы с риском развития вышеуказанного осложнения.

При выполнении гибридных оперативных вмешательств для прогнозирования прогрессирования атеросклеротического поражения на артериях

нижних конечностей у пациентов ОААНК может быть использована разработанная нами и приведенная в 3 главе формула определения вероятности прогрессирования атеросклероза с учетом исходных значений маркера Вах (3).

При выполнении открытых операций для прогнозирования прогрессирования атеросклеротического поражения на артериях нижних конечностей у пациентов ОААНК может быть использована разработанная нами и приведенная в 3 главе формула определения вероятности прогрессирования атеросклероза с учетом значений маркеров sFas и Вах на первые часы (4).

Прогрессирование атеросклероза после открытых и гибридных вмешательств также ассоциируется со значениями маркеров $sFas \leq 0,14$ нг/мг белка и $Вах \geq 7,15$ нг/мг белка в образцах сосудистой стенки у пациентов с ОААНК.

При прогнозировании вышеуказанных осложнений целесообразно применение дополнительно к базисной терапии сочетания витамина Е в дозе 400 МЕ 1 раз в сутки совместно с препаратом «Актовегин»® в дозе 1200 мг 1 раз в день внутривенно капельно в течение 7 дней после операции, начиная с интраоперационного введения препарата, а также выполнять ДС артерий нижних конечностей каждые 3 месяца с целью улучшения результатов оперативного лечения.

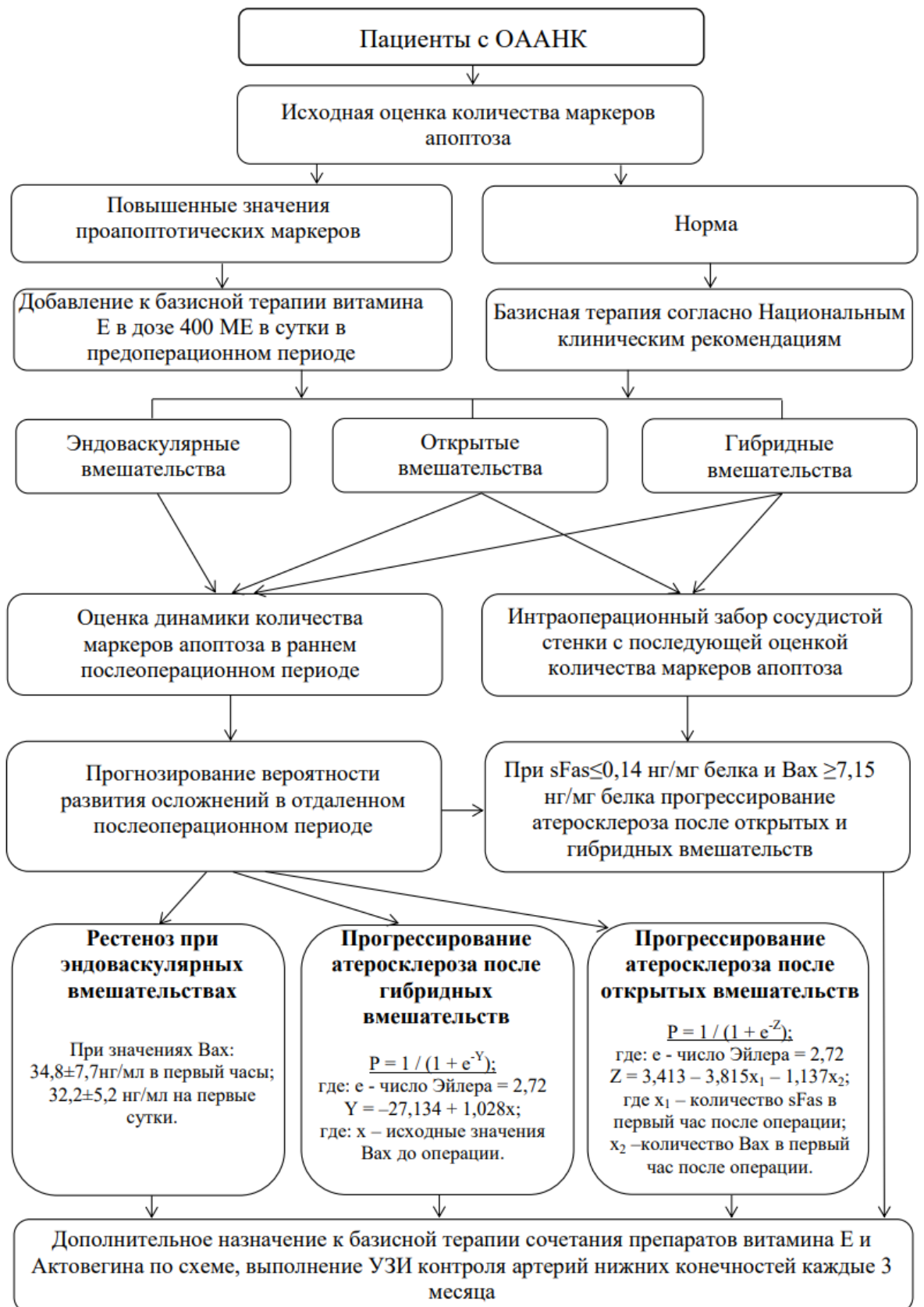


Рисунок 65 - Алгоритм профилактики развития рестеноза зоны реконструкции и прогрессирования атеросклероза после выполнения различных оперативных вмешательств у пациентов с ОААНК

Конкретизируем исследование и рассмотрим ряд примеров, свидетельствующих о достоверности вышеприведенных выводов.

3.10. Клинические примеры

Клинический пример № 1

Пациент П., 73 года поступил в отделение сосудистой хирургии с диагнозом: Атеросклероз артерий нижних конечностей. Бедренно-подколенная окклюзия справа, III стадия заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна. Сопутствующие заболевания: ИБС. Постинфарктный кардиосклероз, неизвестной давности. ХСН IIА, ФК II. При поступлении пациент предъявлял жалобы на боли в правой нижней конечности в состоянии покоя.

Аортоартериография нижних конечностей: брюшной отдел аорты, ОПА и НПА, без гемодинамически значимых стенозов с обеих сторон. Справа: ОБА, ГБА с неровностью контуров, ПБА окклюзирована от устья, ПКА и артерии голени с неровностью контуров (Рисунки 66, 67).

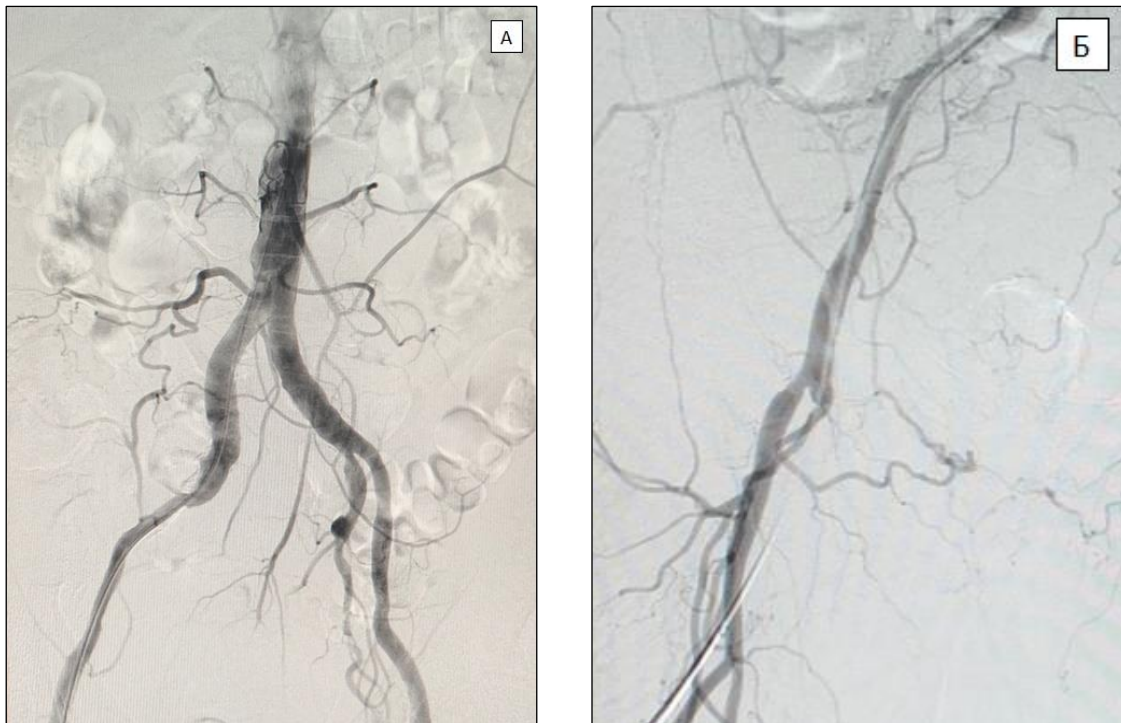


Рисунок 66 – Аортоартериография нижних конечностей пациента П.

А) Область бифуркации аорты; Б) Окклюзия правой поверхностной бедренной артерии от устья;



Рисунок 67 – Аортоартериография нижних конечностей пациента П.

В) Контрастирование подколенной артерии в области жоберовой ямки; Г) контрастирование артерий голени правой нижней конечности

ДС дуги аорты. Заключение: Эхо признаки атеросклероза дуги аорты. Стеноз правой ВСА 50-55%, стеноз левой ВСА артерии до 30%.

В плановом порядке данному пациенту было выполнено оперативное вмешательство - БПШ выше щели коленного сустава синтетическим протезом РТФЕ 8 мм на правой нижней конечности. Во время выполнения оперативного вмешательства был взят участок стенки ПБА вместе с атеросклеротической бляшкой.

Сравнение маркера p53 между изъятым образцом (0,29 ед/мг белка) и контрольной группой (0,19 [0,17; 0,2] ед/мг белка) показало его увеличение в участке артериальной стенки с атеросклеротической бляшкой у пациента П. на 52,6%. Более того, у обследуемого пациента также был повышен уровень биомаркера Вах (7,1 нг/мг белка / контрольные образцы - 4,8 [3,8; 6,3] нг/мг) на 48%. Уровень ингибитора рецепторного пути апоптоза sFas (0,1 нг/мл белка

/контрольные образцы - 0,3 [0,24; 0,39] нг/мг белка) у пациента П. был в 3 раза ниже значений в нормальной артериальной стенке. Количество маркера PDGF BB (0,14 нг/мг белка / контрольные образцы - 0,09 [0,07; 0,12] нг/мг белка) было повышено на 56% относительно его значений в контрольных образцах.

Через 16 месяцев пациент П. был повторно госпитализирован в отделение сосудистой хирургии с диагнозом Атеросклероз. Посттромботическая окклюзия бедренно-подколенного шунта. IV стадия заболевания. При проведении ДС артерий нижних конечностей, по артериям аорто-подвздошного сегмента определялся магистральный кровоток, БПШ был закрыт, в ПкА определялась гемодинамически значимая атеросклеротическая бляшка с эффектом стеноза 80%, а по артериям голени - коллатеральный кровоток. Во время пребывания в стационаре, у пациента П. произошла транзиторная ишемическая атака в правом каротидном бассейне. Очаговая неврологическая симптоматика регрессировала в течение 24-х часов. По данным КТ и МРТ, признаков ишемического инфаркта головного мозга не было выявлено. По данным ДС артерий дуги аорты был выявлен гемодинамически значимый стеноз ВСА до 75-80% справа.

После стабилизации состояния пациента в плановом порядке была выполнена каротидная эндартерэктомия (КЭЭ) из ОСА и ВСА с аллопластикой справа. Послеоперационный период протекал без осложнений и очаговой неврологической симптоматики. На контрольном ДС - по правой ВСА определяется магистральный кровоток, без остаточных стенозов. При выполнении КЭЭ также был произведен забор участка ВСА с атеросклеротической бляшкой для последующего изучения исследуемых показателей. Далее пациенту П. была проведена эндартерэктомия из ПкА. Бедренно-подколенное решунтирование ниже щели коленного сустава на правой нижней конечности с использованием свежезаготовленного аллогraftа.

Во время выполнения ЭАЭ также был изъят участок стенки ПкА с атеросклеротической бляшкой (зона прогрессирования атеросклеротического поражения). Предоставим характеристику маркеров апоптоза и пролиферации

клеток, полученных непосредственно в сосудистой стенке с зоной прогрессирования атеросклероза.

Уровень белка p53 (зона с прогрессированием атеросклероза - 0,45 ед/мг белка / зона с исходным атеросклеротическим поражением - 0,29 ед/мг белка) в атеросклеротической бляшке при прогрессировании атеросклероза вырос на 55% относительно исходного уровня и в 2,4 раза относительно его значений в контрольных образцах.

Повысилось также количество проапоптотического маркера Вах (зона с прогрессированием атеросклероза - 8,9 нг/мг белка / зона с исходным атеросклеротическим поражением - 7,1 нг/мг белка), количество которого было на 25,3% выше. Значение sFas составило 0,03 нг/мг белка, что было ниже в 2,5 раза значений в области сосудистой стенки с изначальным атеросклеротическим поражением и в 8,6 раза ниже, чем в контрольных образцах.

Количество маркера ответственного за миграцию и пролиферацию клеток (PDGF BB) в зоне с прогрессированием атеросклероза составило 0,18 нг/мг белка, что на 28,5% больше, чем в образце с первичным атеросклеротическим поражением.

Анализ значений маркеров в образце с атеросклеротической бляшкой, полученном при выполнении КЭЭ из правой ВСА, также показал повышенные уровни проапоптотических маркеров (p53 - 0,41 ед/мг белка, Вах - 9,1 нг/мг белка) и пониженный уровень маркера рецепторного пути (sFas - 0,027 нг/мг белка) относительно их значений в контрольных образцах сосудистой стенки.

При контрольном осмотре через 6 месяцев пациент отмечает, что в течение последних двух месяцев дистанция безболевого ходьбы уменьшилась до 50 метров, появился болевой синдром в правой нижней конечности.

По данным ДС брахиоцефальных артерий отмечается стеноз в зоне реконструкции ВСА до 50% (Рисунок 68). Данные ДС брахиоцефальных артерий подтверждены КТ – ангиографией.

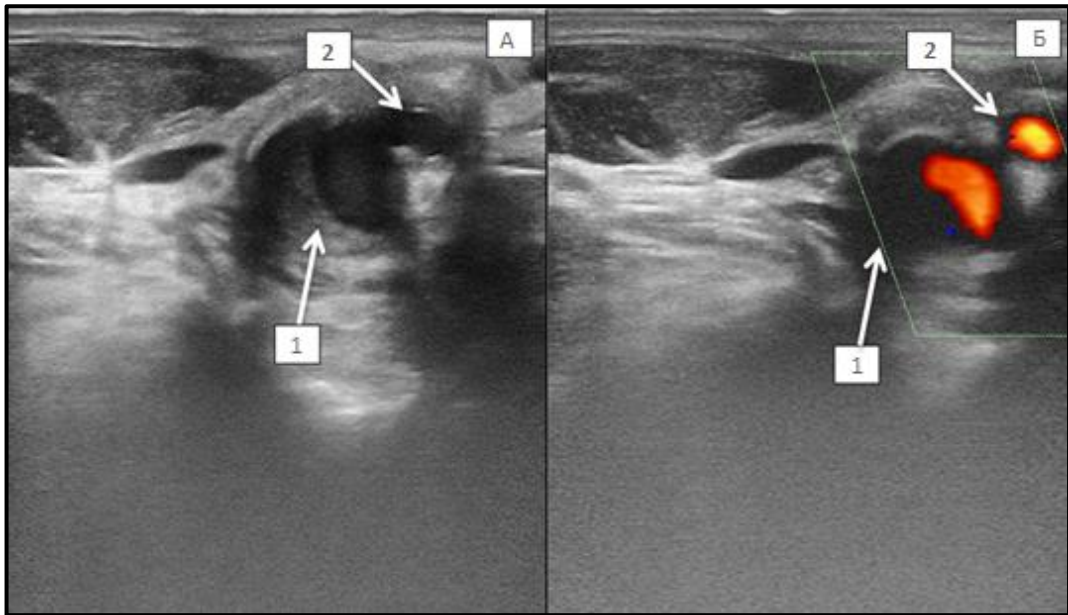


Рисунок 68 - Дуплексная сканограмма. Стеноз внутренней сонной артерии справа до 50%. 1. Внутренняя сонная артерия; 2. Наружняя сонная артерия. А) В-режим. Б) Режим цветового доплеровского картирования

По данным ДС артерий нижних конечностей: в ОБА определяется концентрическая атеросклеротическая бляшка с эффектом стеноза около 40%. При ЦДК и ДГ по аллогraftу кровотоков не определяется (Рисунок 69). ГАБ была проходима на всем протяжении (Рисунок 70). ПкА окклюзивно закрыта выше уровня щели коленного сустава, ниже – заполняется ретроградно через анастомозы с ГАБ. ЗББА проходима, кровотоков близкий к монофазному. ПББА окклюзивно закрыта.

От предложенного оперативного лечения пациент отказался, назначен курс консервативной терапии.

Таким образом, данный клинический пример демонстрирует, что при атеросклеротическом поражении артерий нижних конечностей повышено количество маркеров, ответственных как за апоптоз, так и за пролиферацию и миграцию клеток сосудистой стенки. Прогрессирование атеросклероза в двух сосудистых бассейнах связано с дальнейшим ростом значений проапоптотических маркеров на фоне сохранения повышенных значений PDGF BB.

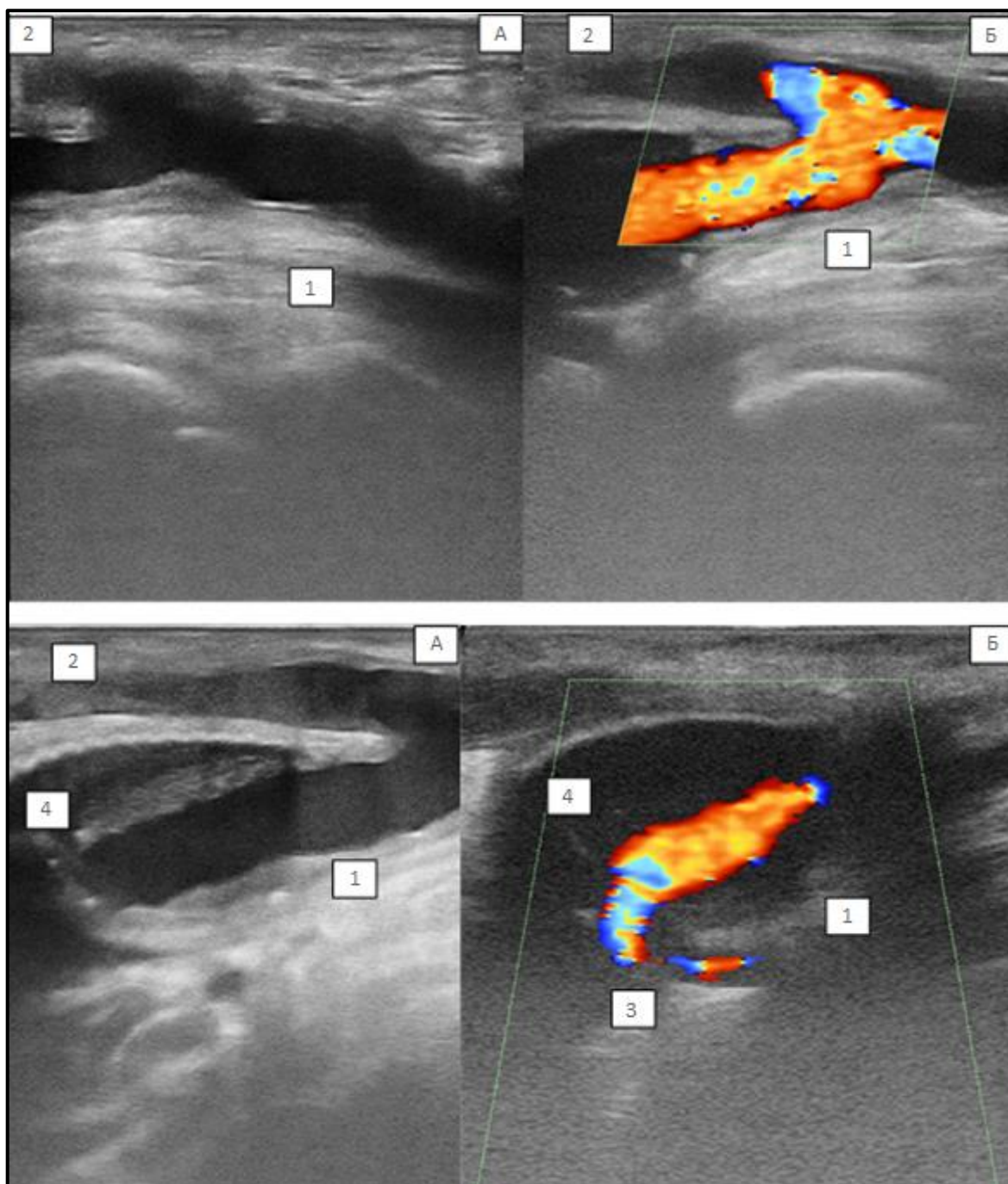


Рисунок 69 - Дуплексная сканограмма. Область общей бедренной артерии и проксимального анастомоза бедренно-подколенного шунта гомографтом. А) В – режим. Б) Режим цветового доплеровского картирования

1. Общая бедренная артерий; 2. Проксимальный анастомоз бедренно-подколенного шунта с использованием гомографта; 3. Глубокая артерия бедра; 4. Проксимальный анастомоз бедренно-подколенного шунта с использованием синтетического протеза

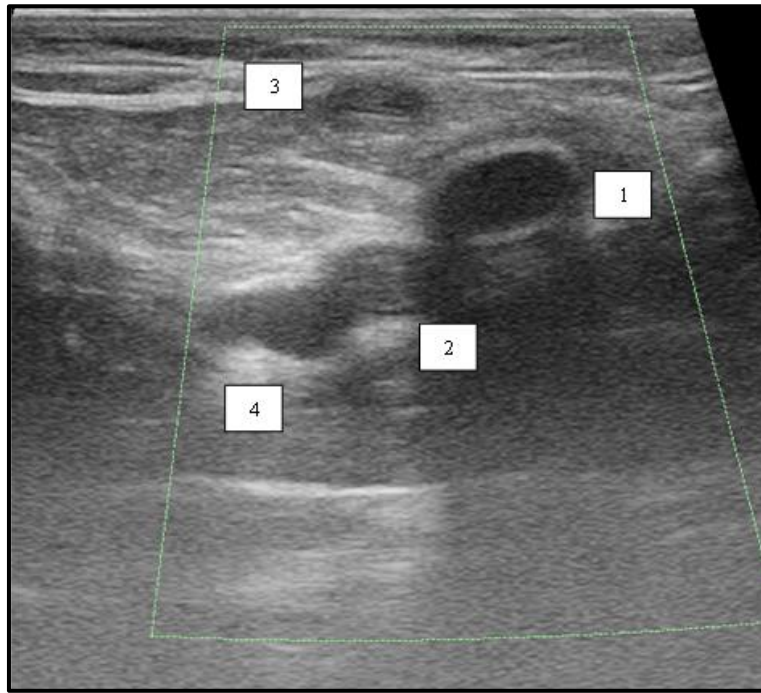


Рисунок 70 - Дуплексная сканограмма. Область средней трети бедра, поперечный срез, режим ЦДК. 1. Посттромботическая окклюзия синтетического протеза; 2. Окклюзированная поверхностная бедренная артерия; 3. Посттромботическая окклюзия гомографта; 4. Бедренная вена.

Клинический пример № 2

Пациент С. 65 лет поступил в отделение сосудистой хирургии с диагнозом: Атеросклероз артерий нижних конечностей. Бедренно-подколенная окклюзия слева, III стадия заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна.

При поступлении пациент предъявлял жалобы на боли в левой нижней конечности при ходьбе до 30 метров. По данным аортоартериографии нижних конечностей: брюшной отдел аорты, ОПА и НПА с неровностью контуров. Слева: стеноз в ОБА до 40%, ГБА с неровностью контуров, ПБА окклюзирована на протяжении 5 см в нижней трети, подколенная артерия и артерии голени с неровностью контуров (Рисунок 71).

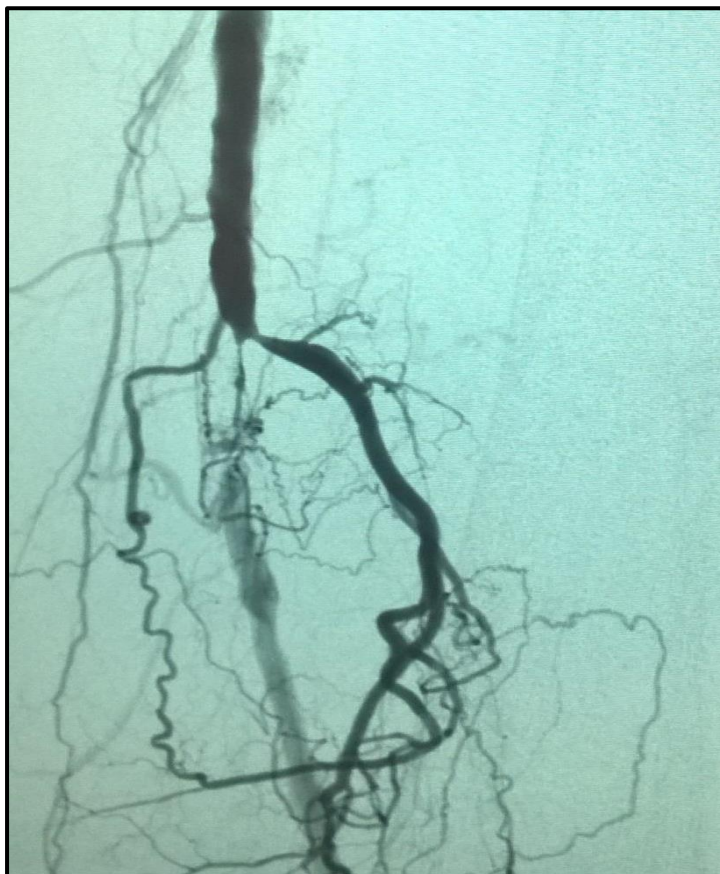


Рисунок 71 - Ангиография. Оклюзия поверхностной бедренной артерии в нижней трети левого бедра

В плановом порядке 28.04.2021 пациенту С была проведена реканализация и ЧТБА ПБА слева. Послеоперационный период протекал без осложнений. Кровообращение в нижних конечностях компенсировано.

Через 10 месяцев пациент С. начал отмечать уменьшение безболевого расстояния ходьбы до 100 метров. На ДС артерий нижних конечностей слева определялся гемодинамически значимый стеноз в нижней трети ПБА (Рисунок 72).

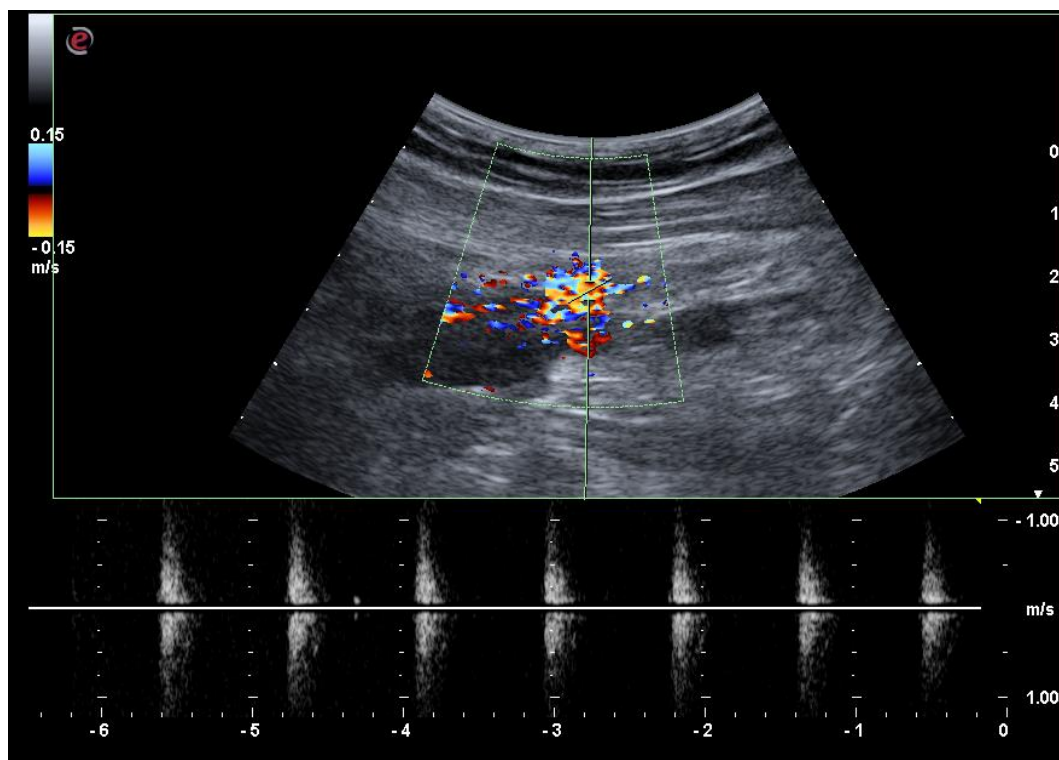


Рисунок 72 - Дуплексная сканограмма, режим спектральной доплерографии. Поверхностная бедренная артерия в нижней трети бедра, определяется гемодинамически значимый стеноз

У пациента С. исходные значения маркера Вах 24,5 (нг/мл) не отличались от значений пациентов группы А без рестеноза зоны реконструкции (23,6 нг/мл). Количество белка Вах в первый час после операции составило 36,2 нг/мл, на 1 сутки - 35,4 нг/мл, что превышало количество данных показателей у пациентов группы А без рестеноза зоны реконструкции на 21% и 24% соответственно. Количество sFas на 21 сутки составило 0,57 нг/мл, что превышало на 46% его значения у пациентов без рестеноза.

Таким образом, данный клинический пример показывает, что повышение значений проапоптотического маркера Вах в первые часы и на первые сутки на фоне повышенных значений ингибитора рецепторного пути апоптоза sFas на 21 сутки после выполнения эндоваскулярных вмешательств на артериях нижних конечностей приводит к развитию рестеноза зоны реконструкции в отдаленном послеоперационном периоде.

Клинический пример № 3

Пациентка Г. 1964 года поступила в отделение сосудистой хирургии с диагнозом: Атеросклероз. Стеноз ОПА справа 80%. Стенозы ОПА и НПА 60% слева. Бедренно-подколенная окклюзия с обеих сторон. III стадия заболевания справа. Сопутствующий диагноз: ИБС: стенокардия напряжения IIА ФК. ХСН IIА, ФК III. Гипертоническая болезнь 3 стадия, контролируемая.

По данным аортоартериографии: брюшной отдел аорты с неровностью контуров. Справа: стеноз в ОПА в средней трети до 80%. Слева: тандемные стенозы по ходу ОПА, НПА до 60%. С обеих сторон ОБА и ГБА с неровностью контуров, окклюзия ПБА от устья, ПКА и артерии голени с неровностью контуров. В плановом порядке пациентке Г. было выполнено гибридное оперативное вмешательство. Ангиопластика и стентирование ОПА. БПШ выше щели коленного сустава синтетическим протезом Intergard 8мм на правой нижней конечности. Послеоперационный период без осложнений. Кровообращение в правой нижней конечности компенсировано.

У пациентки Г. исходные значения Вах составили 28,6 нг/мл и были повышены по сравнению со значениями пациентов без прогрессирования атеросклероза, где значение маркера Вах составило 22,9 нг/мл.

Подставим значения пациентки Г в полученную формулу, прогнозирующую риск прогрессирования атеросклероза после гибридных оперативных вмешательств (3):

$$Y = -27,134 + 1,028 * 28,6 = 2,27.$$

Вероятность развития прогрессирования атеросклероза в послеоперационном периоде у пациентки Г: $P = \frac{1}{(1 + e^{-2,27})} = 0,9$ или 90%.

Пациентка Г. через 16 месяцев была повторно госпитализирована в отделение сосудистой хирургии в связи с появлением болевого синдрома в покое в левой нижней конечности. По данным ДС слева: окклюзия ОПА, стенозы по ходу НПА до 70%, стеноз в ОБА до 70%, ГАБ с неровностью контуров, ПБА окклюзирована от устья, ПКА и артерии голени с неровностью контуров. Справа: стент с ОПА и БПШ проходимы, ПКА и артерии голени с неровностью контуров.

В плановом порядке пациентке Г. Была выполнена ЭАЭ из бедренных артерий. Линейное аорто-бедренное шунтирование на левой нижней конечности (Рисунки 73-75).

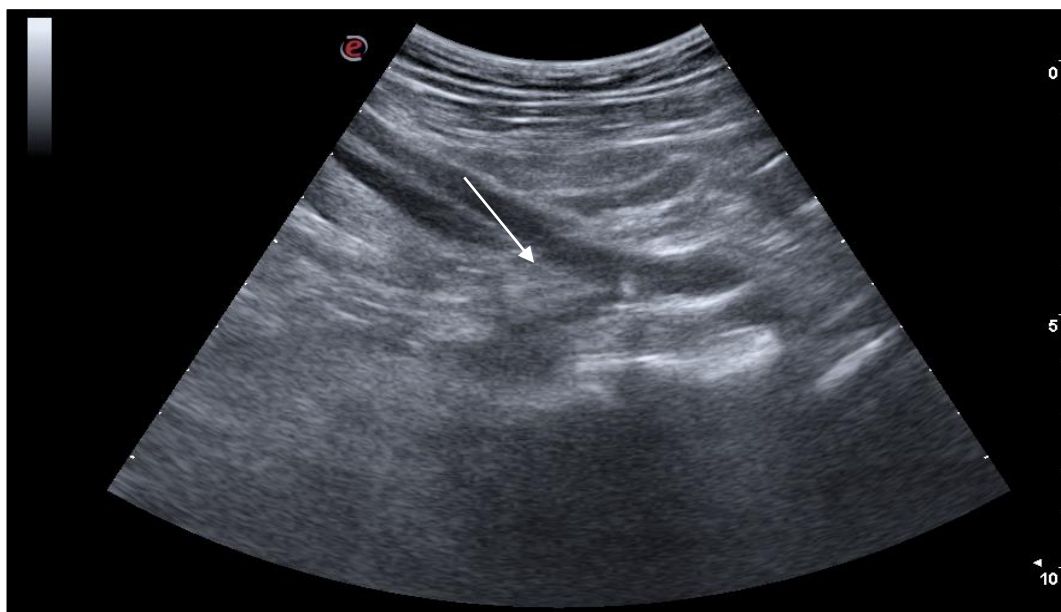


Рисунок 73 - Дуплексная сканограмма. Подвздошный сегмент, В-режим. Гемодинамически значимый стеноз в наружной подвздошной артерии слева указан стрелочкой

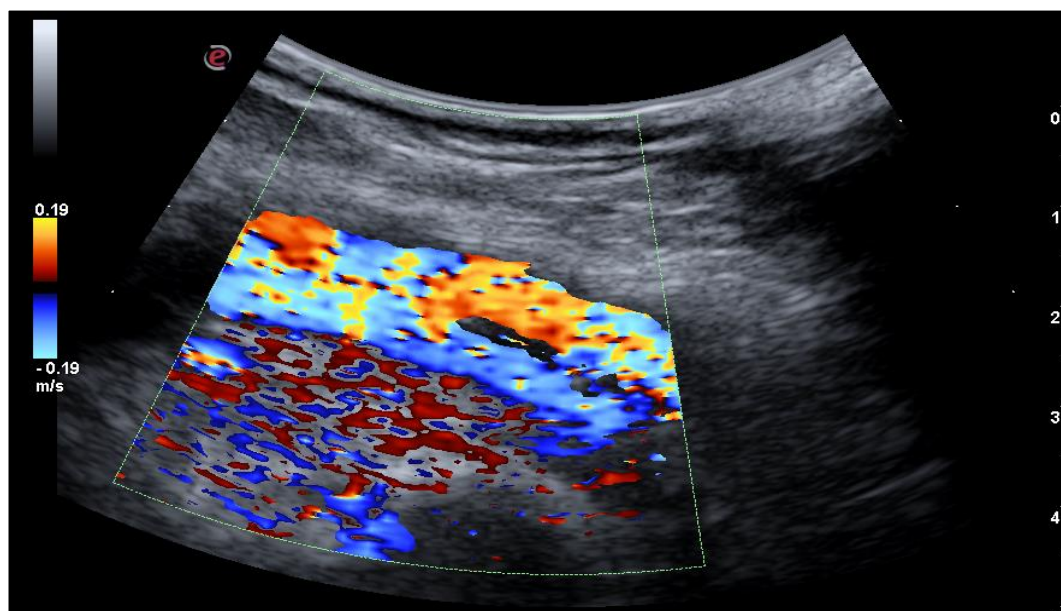


Рисунок 74 - Дуплексная сканограмма. Дистальный анастомоз аорто-бедренного шунта на левой нижней конечности. Режим цветового доплеровского картирования

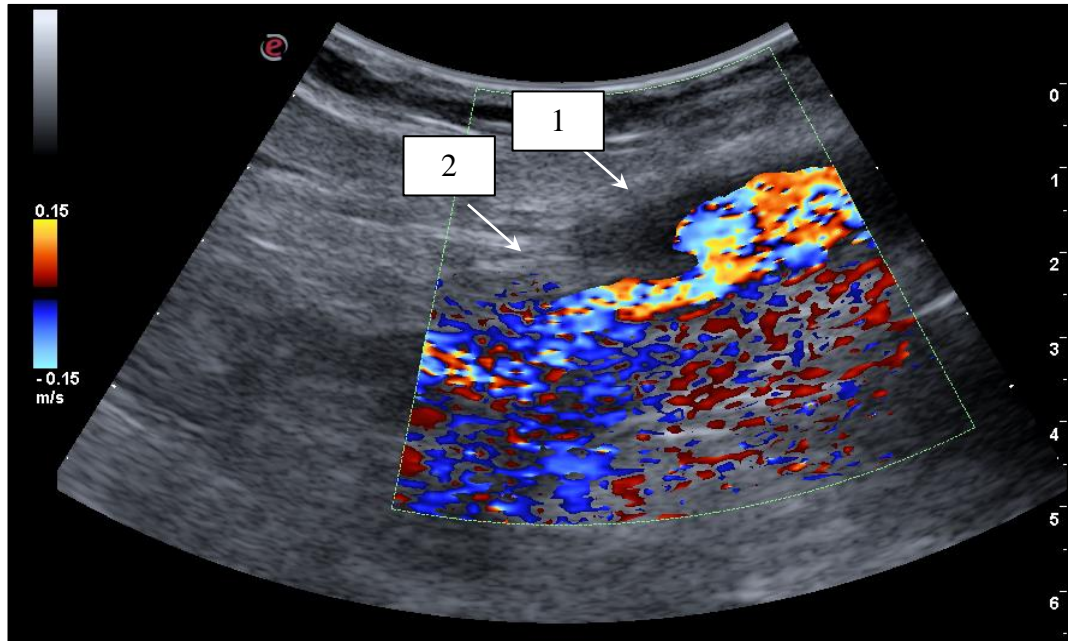


Рисунок 75 - Дуплексная сканограмма. Верхняя треть бедра, область дистального анастомоза. 1. Общая бедренная артерия. 2. Глубокая артерия бедра.

Режим цветового доплеровского картирования

Таким образом, определение исходных значений маркеров Вах у пациентов с ОААНК до выполнения гибридных оперативных вмешательств на магистральных артериях нижних конечностей позволяет прогнозировать прогрессирование атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде.

Клинический пример № 4

Пациентка Г. 1941 гр. из группы D поступила в отделение сосудистой хирургии с диагнозом: Атеросклероз артерий нижних конечностей. Бедренно-подколенная окклюзия справа, III стадия заболевания. По данным ДС артерий нижних конечностей справа: в ОБА концентрическая атеросклеротическая бляшка с эффектом стеноза 40-45% с переходом на устье ГАБ и ПБА. ПБА окклюзирована от устья. ПКА, артерии голени проходимы, кровоток коллатеральный. В плановом порядке пациентке Г. проведено БПШ выше щели коленного сустава синтетическим протезом «Intergard» 8мм на правой нижней конечности. Послеоперационный период протекал без осложнений. Пульс справа на ПБА, кровообращение в нижних конечностях компенсировано.

Через 12 месяцев на контрольном ДС справа: в БПШ определялась неоинтима с эффектом стеноза до 35% (Рисунок 76). БПШ проходим, ПкА, ЗББА и ПББА проходимы, при ЦДК и ДГ лоцировался магистральный тип кровотока (Рисунок 77).



Рисунок 76 - Дуплесная сканограмма бедренно-подколенного шунта с участками неоинтимы с эффектом стеноза до 35%

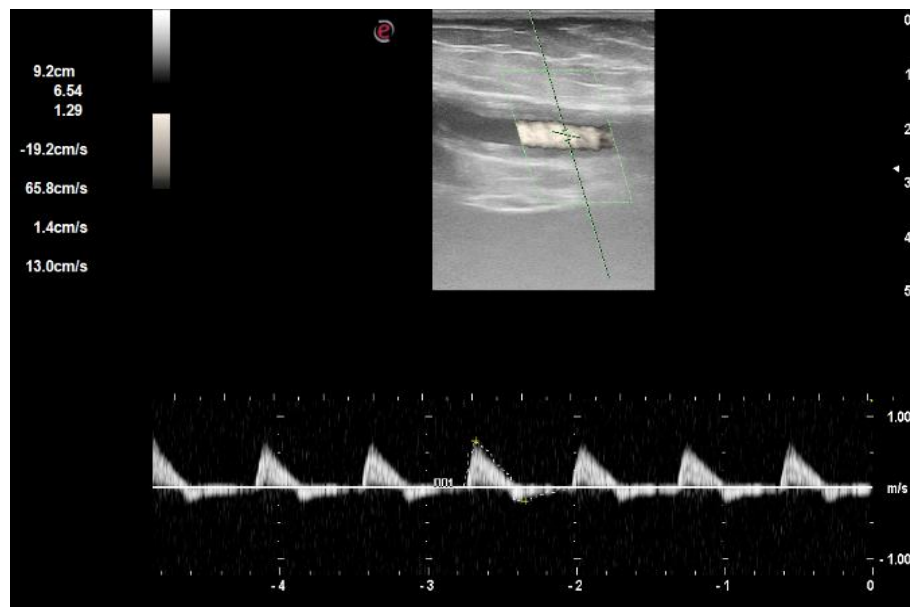


Рисунок 77 - Дуплесная сканограмма бедренно-подколенного шунта справа с магистральным типом кровотока

Через 2 года по данным ДС артерий нижних конечности справа: в БПШ определяются участки неоинтимы с эффектом стеноза 50% (Рисунок 78).



Рисунок 78 - Дуплексная сканограмма бедренно-подколенного шунта с участками неоинтимы с эффектом стеноза 50%

Пациент К. 1960 гр. из группы G поступил в отделение сосудистой хирургии с диагнозом: Атеросклероз артерий нижних конечностей. Бедренно – подколенная окклюзия слева, III стадия заболевания. По данным аортоартериографии справа: в ОБА, ГАБ проходимы, с неровностью контуров. ПБА окклюзирована на всем протяжении. ПкА, ЗББА, ПББА проходимы, с неровностью контуров. В плановом порядке проведено оперативное вмешательство – БПШ выше щели коленного сустава синтетическим протезом «Intergard 8мм». Послеоперационный период протекал без осложнений.

При контрольном ДС артерий нижних конечностей через 12 месяцев: в БПП определялась неоинтима толщиной до 0,48 мм (Рисунок 79).

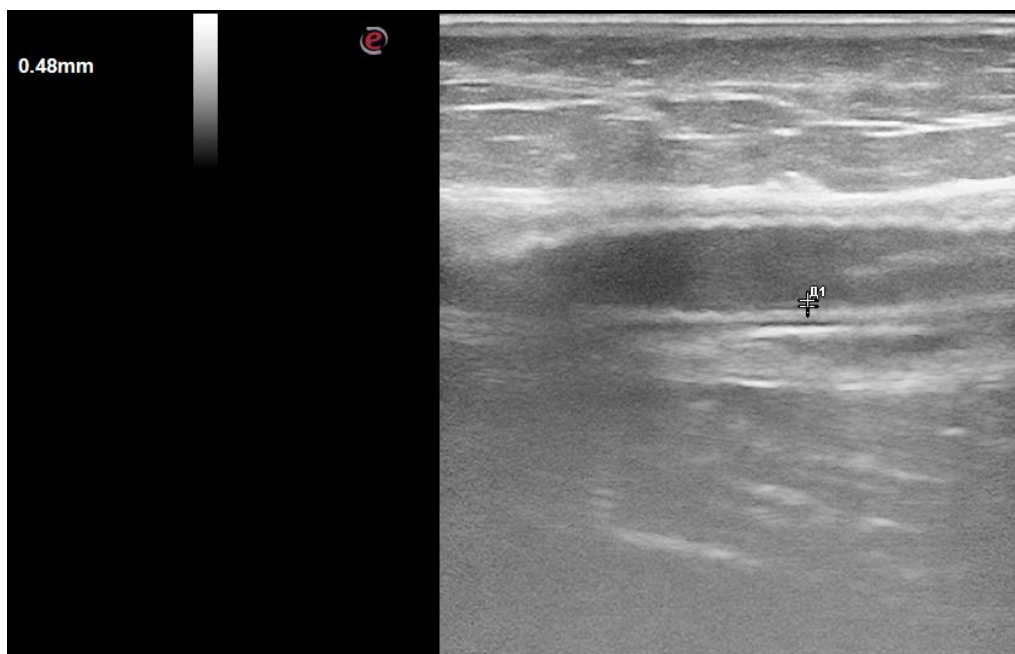


Рисунок 79 - Дуплесная сканограмма бедренно-подколенного протеза с участком неоинтимы толщиной 0,48 мм на левой нижней конечности

При контрольном ДС артерий левой нижней конечности через 2 года в БПП определялась неоинтима толщиной до 1,4 мм (Рисунок 80).



Рисунок 80 - Дуплесная сканограмма бедренно-подколенного протеза, где определяется участок неоинтимы толщиной до 1,4 мм через 2 года

При сопоставлении значений, исследуемых биомаркеров у пациентов Г. и К., наблюдались следующие результаты: апоптотический белок Вах и Vcl-2 в

первые часы после операции у пациентки Г. составил 34,9 нг/мг и 2,1 нг/мл, соответственно. При этом у пациента К, уровень этих же маркеров составил 28,2 нг/мл и 4,6 нг/мл, соответственно. Помимо этого, было выполнено определение количества маркера дисфункции эндотелия NO на 1 сутки, составляющие 158 ммоль/л у пациентки Г, при значениях пациента К. – 230 ммоль/л. Также представляло интерес сравнения маркеров sFas – 0,23 нг/мл на 21 сутки и PDGF ВВ – 12 нг/мл к концу 1 месяца. У пациента К. данные маркеры равнялись 0,38 нг/мл и 10,5 нг/мл, соответственно.

Таким образом, данный клинический пример показывает, что дополнительное применения сочетания препаратов «Актовегина»® и витамина Е повлияло на динамику маркеров апоптоза и пролиферации клеток, в сторону уменьшения их значений, что привело к уменьшению толщины неоинтимы в зоне оперативного вмешательства.

Клинический пример № 5

Пациентка Ф. 1962 гр. из группы G поступила в отделение сосудистой хирургии с диагнозом: Атеросклероз артерий нижних конечностей. Синдром Лериша, III стадия заболевания.

По данным аортоартериографии: подвздошный сегмент с обеих сторон окклюзирован, ОБА, ГАБ, ПБА, ПКА, ЗББА, ПББА проходимы, с неровностью контуров. Проведено оперативное лечение: БАБШ синтетическим протезом Intergard 18*9*9мм.

Послеоперационный период протекал без осложнений. Пульс периферический с обеих сторон, кровообращение в нижних конечностях компенсировано.

При контрольном ДС артерий нижних конечностей через 6 месяцев: проксимальные и дистальные анастомозы БАБШ шунта проходимы, без гемодинамически значимых стенозов. В ПКА – атеросклеротическая бляшка с эффектом стеноза 30% (Рисунок 81).

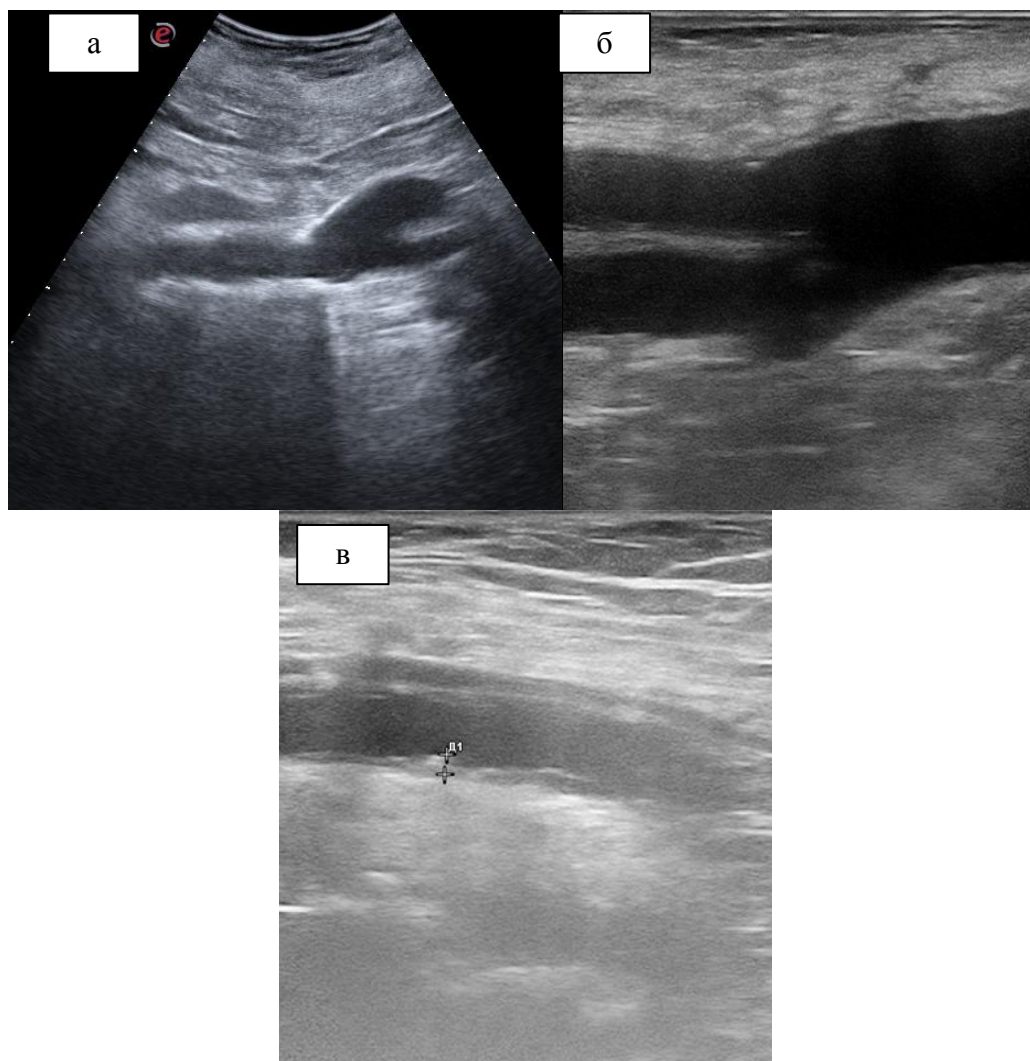


Рисунок 81 - Дуплексная сканограмма проксимального (а) и дистального анастомозов (б) аорто-бедренного шунта и ПкА (в)

При контрольном ДС через 1,5 года: проксимальные и дистальные анастомозы БАБШ проходимы, без гемодинамически значимых стенозов. В ПкА – атеросклеротическая бляшка с эффектом стеноза до 50% (Рисунок 82).

У пациента Ф. на первые часы количество маркера Вах составило 26 нг/мл, VEGF A165 - 297 пг/мл, sFas - 0,9 нг/мл. Уже через день после операции значение NO составило 136 ммоль/л. Через неделю после операции значения NO равнялось 181 ммоль/л, PDGF BB – 33,6 нг/мл. Сроком на 1 месяц количество маркера NO составляло 249 ммоль/л, PDGF BB – 18,2 нг/мл.

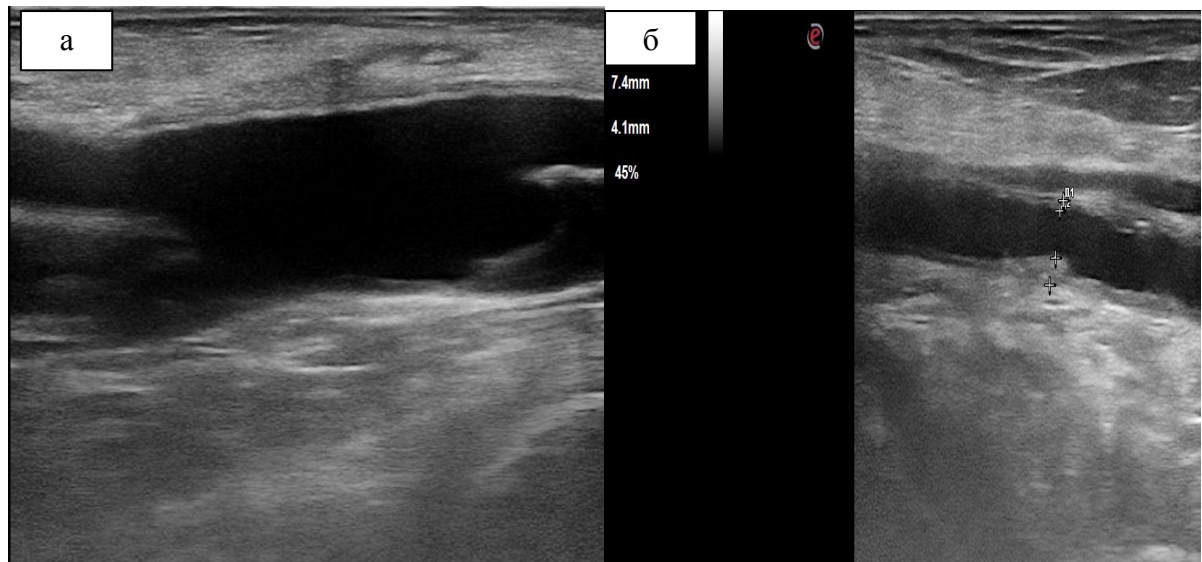


Рисунок 82 - Дуплексная сканограмма дистального анастомозов аорто-бедренного шунта (а) и ПкА (б)

Таким образом, вышеприведенный клинический пример показывает, что применение комбинированной антиоксидантной терапии позволяет уменьшить активацию проапоптотическим маркеров в первую волну апоптоза, развитие ответной пролиферации клеток и дисфункции эндотелия, что в свою очередь оказало воздействие на прогрессирование атеросклероза в послеоперационном периоде.

Клинический пример № 6

Пациент Т. 1962 гр. (группа Е) поступил в отделение сосудистой хирургии с диагнозом: Атеросклероз артерий нижних конечностей. Стеноз 70% НПА на правой нижней конечности. III стадия заболевания. При поступлении пациент предъявлял жалобы на боли в правой нижней конечности при ходьбе до 50 метров. По данным ДС артерий нижних конечностей: справа: в ОБА определяется концентрическая атеросклеротическая бляшка с эффектом стеноза до 30-40% и переходом на устье ГАБ и ПБА, ПБА, ПкА проходимы, кровоток коллатеральный. Артерии голени проходимы, кровоток коллатеральный. В НПА лоцируется гемодинамически значимый стеноз 70% в верхней трети (Рисунок 83).

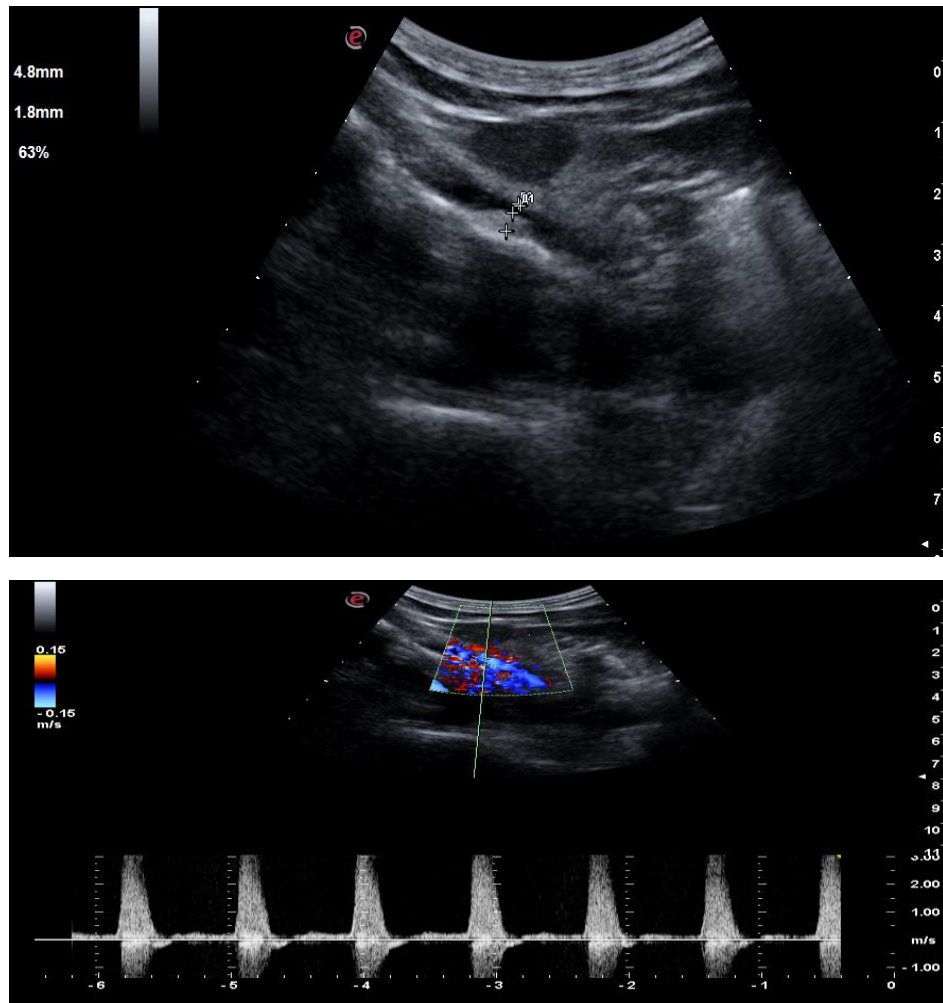


Рисунок 83 - Дуплексная сканограмма артерий правой нижней конечности. В наружной подвздошной артерии определяется атеросклеротическая бляшка с эффектом стеноза 70%. Режим цветового доплеровского картирования

27.02.2021 была проведена ЧТБА НПА на правой нижней конечности. На контрольной ангиографии остаточный стеноз менее 30%. Послеоперационный период протекал без осложнений. Пульс периферический с обеих сторон, кровообращение в нижних конечностях компенсировано. При контрольных осмотрах пациента через 6, 12, 18 месяцев стеноз в зоне ангиопластики не превышал 40%. Через 2 года по данным ДС артерий правой нижней конечности: в НПА определяется атеросклеротическая бляшка с эффектом стеноза 50% в зоне ранее выполненной ангиопластики (рисунок 84). В данный момент времени дистанция безболевого ходьбы от 200 до 300 метров, от повторного вмешательства было принято решение воздержаться, продолжено динамическое наблюдение.

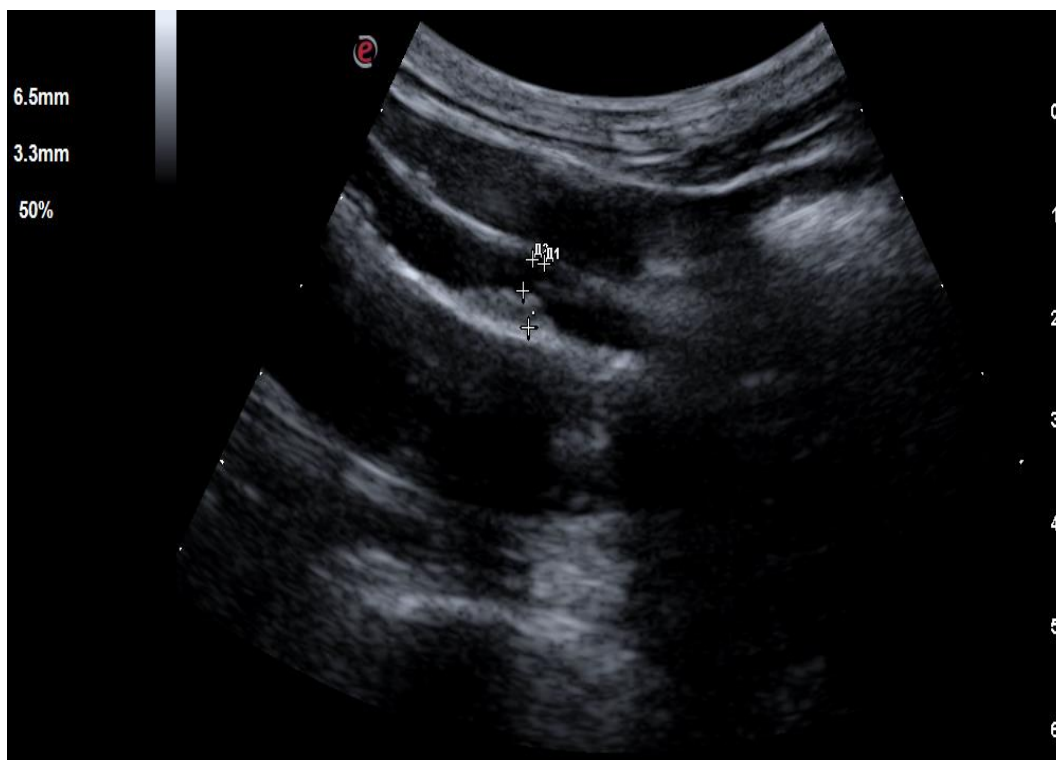


Рисунок 84 - Дуплексная сканограмма правой наружной подвздошной артерии, где определяется стеноза до 50%.

При сопоставлении значений биомаркеров пациента Т. с медианными значениями показателей пациентов группы В с рестенозом зоны реконструкции наблюдались следующие различия: количество апоптотических белков Вах и Вcl-2 в первые часы после операции у пациента Т. составили 27,4 нг/мл и 4,2 нг/мл, соответственно. При это в группе В, уровень этих же маркеров составил 34,8 нг/мл и 1,8 нг/мл. Помимо этого, было выполнено определение количества маркера дисфункции эндотелия NO на 1 сутки, составляющее 183 ммоль/л у пациента Т, при значениях в группе В – 105 ммоль/л. Также представляло интерес сравнение PDGF BB и VEGF A165 на 7 сутки, которые у пациента Т. составили – 24,6 нг/мл и 260 пг/мл, соответственно, при том, что в группе В их значения – 28,6 нг/мл и 245 пг/мл. При последующих дообследованиях проводилось сравнение значений маркера NO к концу 1 месяца, которое у пациента Т. равнялось 261 ммоль/л. В группе В количество данного маркера равнялось 184 ммоль/л.

Таким образом, данный клинический пример показывает, что применение дополнительно к базисной терапии сочетания препаратов Витамина Е и

«Актовегина»® ведет к менее выраженному росту значений маркера Вах и последующему развитию дисфункции эндотелия в послеоперационном периоде в сравнении с пациентами на базисной терапии, что, в свою очередь, привело к меньшему проценту стеноза в зоне выполнено вмешательства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно последним данным мировой статистики, около 200 млн. человек во всем мире имеют установленный диагноз ОААНК. На сегодняшний день одним из самых эффективных способов лечения пациентов с данным заболеванием является выполнение различных видов хирургических вмешательств. Однако, в большинстве случаев, травма сосудистой стенки во время оперативного вмешательства приводит к активации различных клеточных механизмов, ответственных за развитие рестеноза и прогрессирования атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде. Увеличение количества выполняемых артериальных реконструкций совместно с ростом количества послеоперационных осложнений на фоне новых диагностических возможностей в сосудистой хирургии приводят к необходимости поиска новых предикторов развития прогрессирования атеросклероза и рестеноза зоны реконструкции. В настоящее время многие исследователи отводят важную роль системе апоптоза в развитии атеросклероза. Заметим, что момент активации и последующее функционирование данной системы протекает не изолированно, а при взаимодействии с системой пролиферации и миграции клеток, а также дисфункции эндотелия. В настоящее время недостаточно изучен вопрос, посвященный исследованию маркеров вышеуказанных систем у пациентов с ОААНК, в том числе их взаимодействие в послеоперационном периоде после различных видов оперативных вмешательств. В связи с вышеизложенным, исследование маркеров данных систем в качестве факторов риска развития вышеупомянутых осложнений и поиск способов их коррекции является перспективным направлением в сосудистой хирургии.

В исследование было включено 282 пациента с ОААНК со IIБ-III стадией заболевания согласно классификации А.В. Покровского-Фонтейна и 20 здоровых добровольцев для определения референтных значений, исследуемых биомаркеров. Все пациенты были разделены на 7 групп в зависимости от вида оперативного вмешательства и проводимой медикаментозной терапии:

Группа А: 30 пациентов, которым была проведена консервативная терапия.

Группа В-D: по 45 пациентов, которым было выполнено эндоваскулярное (В), гибридное (С), открытое (D) вмешательство на артериях аорто-бедренного и бедренно-подколенного сегментов.

Группа Е-G: по 39 пациентов, которым за неделю до эндоваскулярного (Е), гибридного (F), открытого (G) вмешательства и в течение 1 недели после операции был назначен прием витамина Е в дозе 400 МЕ 1 раз в сутки в сочетании с препаратом «Актовегин»® в дозе 1200 мг 1 раз в день внутривенно капельно в течении 7 дней после операции, начиная с интраоперационного введения препарата. Исследуемые группы были сопоставимы по возрасту и гендерному составу.

В соответствии с дизайном исследования всем пациентам с ОААНК производился забор периферической венозной крови в следующие временные интервалы: на момент включения в исследование, в первые часы, 1, 7, 14, 21, 30 сутки после проведения оперативных вмешательств для определения количества маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия. Помимо этого, в группах Е-G производился дополнительный забор крови непосредственно перед операцией после недельного применения витамина Е в дозе 400 МЕ 1 раз в сутки. Из биомаркеров системы апоптоза были изучены: Вах, Bcl-2, sFas; пролиферации клеток - PDGF BB и VEGF A165; дисфункции эндотелия - NO. Количество биомаркеров в сыворотке крови определялось с помощью коммерческих наборов методом ИФА в соответствии с инструкциями производителей. У пациентов групп А и у здоровых добровольцев определение исследуемых биомаркеров проводилось только при включении в исследование.

У пациентов групп С, D, F, G во время проведения оперативного вмешательства проводился забор 3-х слоев артериальной стенки в области атеросклеротического поражения с последующим приготовлением гомогената сосудистой стенки для анализа показателей апоптоза (Bcl-2, Вах, p53, sFas) и пролиферации клеток (PDGF BB, VEGF A165). Эти маркеры также были исследованы в образцах сосудистой стенки с участками рестеноза зоны

реконструкции или прогрессирования атеросклероза, забранных при проведении повторных оперативных вмешательств в случае развития данных осложнений.

Пациенты всех оперативных групп на контрольных визитах через 1, 6, 12, 18, 24 месяцев подвергались физикальному осмотру и ДС артерий нижних конечностей, с целью оценки проходимости зоны реконструкции, измерения толщины неоинтимы, а также выявления рестеноза зоны вмешательства и прогрессирования атеросклеротического поражения. При проведении ДС проводилось измерение Vps и RI. Измерение ЛПИ производилось на контрольном визите через 2 года.

Одним из результатов исследования явилось доказательство наличия проапоптотического статуса у пациентов с ОААНК. Это было обусловлено исходно повышенным количеством маркера Вах - 24,1 [22,8; 25,4] нг/мл) на фоне сниженных значений маркеров Bcl-2 - 4,4 [4; 4,9] нг/мл) и sFas - 0,92 [0,84; 0,98] нг/мл) относительно здоровых добровольцев (Вах: 15,1 [13,9; 15,7] нг/мл, Bcl-2: 5,3 [4,8; 5,8] нг/мл, sFas: 1,1 [0,97; 1,2] нг/мл). Параллельно с активацией проапоптотических маркеров, исходно наблюдалось повышение уровней маркеров пролиферации и миграции PDGF BB – 13,3 [12,4; 14,2] нг/мл) и VEGF A165 – 367 [309; 403] пг/мл) на фоне сниженных значений дисфункции эндотелия NO (244 [225; 256] ммоль/л) по сравнению со значениями у здоровых добровольцев (PDGF BB: 8,9 [8,3; 9,5] нг/мл, VEGF A165 86 [67; 107]; NO 340 [308; 377] ммоль/мл). При этом нужно отметить, что по мере нарастания степени тяжести хронической ишемии от IIВ к III стадии заболевания наблюдалось повышение исходных значений биомаркеров Вах/PDGF BB либо снижение количества Bcl-2 ($p < 0,05$). Наличие сопутствующей патологии в виде ИБС и перенесенного инфаркта в анамнезе также оказывало влияние на исходные значения исследуемых биомаркеров, а именно приводило к повышению значению маркеров Вах/PDGF BB либо снижению количества sFas ($p < 0,05$). Кроме того, объем оперативного вмешательства приводил к более высоким значениям Вах в первые часы после операции.

Необходимо подчеркнуть, что тот же проапоптотический фон наблюдался непосредственно и в сосудистой стенке в области атеросклеротического поражения. Так, значения маркера Вах составили 7,1 [6,5; 7,6] нг/мг белка, sFas – 0,17 [0,1; 0,2] нг/мг белка, p53 – 0,29 [0,2; 0,3] ед/мг белка ($p < 0,05$), что достоверно значимо отличалось от их значений в непораженной артериальной стенке (4,8 [3,8; 6,3] нг/мг белка, 0,3 [0,24; 0,39] нг/мг белка, 0,19 [0,1; 0,2] ед/мг белка, соответственно). На фоне роста значений проапоптотических маркеров, показатели пролиферации и миграции клеток PDGF BB и VEGF A165 были увеличены в 1,9 и 1,7 раза в образцах с атеросклеротической бляшкой ($p < 0,01$).

При проведении анализа взаимоотношений между исследуемыми маркерами в сосудистой стенке, в области атеросклеротической бляшки и в сыворотке крови, была обнаружена прямая корреляционная взаимосвязь между значениями Bcl-2 ($r = +0,709$, DI: 0,395; 0,885, $p < 0,01$), Вах ($r = +0,714$ DI: 0,441; 0,862, $p < 0,01$) в стенке сосуда и в сыворотке крови.

В ходе проведения исследования, было выявлено, что различные виды оперативных вмешательств приводят к запуску системы апоптоза, которая способна протекать в виде двух волн с разными временными интервалами. Сроки и особенности первой волны: максимальный рост проапоптотических маркеров в первые часы и постепенное снижение к концу 7-х суток. Ключевые маркеры данной волны - это показатели митохондриального пути апоптоза, которые достигли своих пиковых значений к первым часам послеоперационного периода. Конкретизируя, наблюдался рост значения маркера Вах до пикового уровня – 31,2 [28,9; 34,9] нг/мл) на фоне снижения количества Bcl-2 – 2,8 [2,3; 3,1] нг/мл) ($p < 0,05$) относительно их исходных значений. Отметим, что активация первой волны апоптоза может быть обусловлена как самой операционной травмой, так и оксидативным стрессом, усиливающимся во время реперфузии конечности после восстановления кровотока. Гибель клеток сосудистой стенки в результате апоптоза привела к неспособности эндотелия нормально функционировать и синтезировать протективные молекулы, что обусловило развитие дисфункции эндотелия, подтвержденное данными корреляционного анализа. Так, на 1 сутки,

произошло пиковое снижение значений NO до 163 [107; 184] ммоль/л, при его взаимосвязях с маркерами Вах ($r=-0,567$, $p<0,01$) и Vcl-2 ($r=+0,567$, $p<0,01$) на 1 сутки.

Однако стоит отметить, что апоптоз не является единственным механизмом, который активируется в результате травмы сосудистой стенки, так как совместно с ним запускается пролиферация и миграция клеток, целью которой является восполнение клеточного дефицита. В нашем исследовании была найдена корреляционная зависимость между маркером пролиферации клеток (PDGF BB) и маркером апоптоза (Вах) в первые часы после операции ($r=+0,678$, $p<0,01$), что свидетельствует о взаимосвязи этих двух процессов.

Впервые у пациентов с ОААНК была представлена количественная характеристика маркеров второй волны апоптоза, которая протекала с конца 7 суток, и вплоть до конца первого месяца. Она характеризуется максимальным снижением значений ингибитора рецепторного пути апоптоза sFas до значений 0,4 [0,27; 0,53] нг/мл и преимущественно протекает в клетках, формирующих неointимы. Основная ее задача состоит в ограничении роста и толщины неointимы в зоне оперативного вмешательства. Триггерами ее активации выступают повышенные значения PDGF BB на 14 сутки – 24,1 [20,8; 26,5] нг/мл, а также достижение пикового уровня маркером NO – 310 [229; 352] ммоль/л. Данное предположение основывается на обратной корреляции между показателями PDGF BB и sFas ($r=-0,789$, $p<0,01$), а также NO и sFas ($r=-0,892$, $p<0,01$) в указанные промежутки времени. К концу 3-ей недели произошло снижение значений PDGF BB до 19,4 [18,3; 20,8] нг/мл ($p<0,01$) во всех оперативных группах. Дополнительно, в пользу способности второй волны апоптоза ограничивать ответный пролиферативный ответ, выступает найденная корреляция между маркерами sFas и PDGF BB ($r=+0,789$, $p<0,01$) на 21-е сутки.

При изучении влияния непосредственно самих видов оперативных вмешательств на динамику маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия, было доказано, что гибридные и эндоваскулярные вмешательства оказывают одинаковое воздействие на динамику изменения

исследуемых показателей ($p > 0,05$). В тоже время значения Вах в группе пациентов с открытым видом оперативного вмешательства было на 35,5% больше, чем при выполнении эндоваскулярных и гибридных методик на первые часы. При снижении значений NO на 13,3% на 1 сутки и росте количества PDGF на 26,6% на 7 сутки. Значения биомаркера sFas на 44% ниже на 21-е сутки в сравниваемых группах. Статистическая значимость различий составила $p < 0,05$. Все вышеперечисленное свидетельствует о большей травматичности открытых оперативных вмешательств по сравнению с эндоваскулярными и гибридными методиками. Другой возможной причиной объяснения данных результатов является тот момент, что при выполнении открытой реконструкции формируется обходной путь для восстановления кровотока с сохранением атеросклеротически измененного исходного сегмента.

Общее количество случаев выявления рестеноза зоны реконструкции через 12 [13; 14] месяцев в группе В составило 12 (27% от больных в подгруппе), в группе С – 9 (20%), в D группе – 6 (13%) наблюдений. Количество пациентов с прогрессированием атеросклеротического поражения через 18 [16; 20] месяцев после проведенных реконструкций в группе D составило 12 (27%) случаев, в группе С - 9 (20%), в группе В - 6 (13%).

Применения Рос-кривых, однофакторного и многофакторного анализа позволило выявить в группах В и С ряд маркеров и их пороговые значения, которые потенциально можно рассматривать в качестве предикторов развития рестеноза зоны реконструкции в отдаленном послеоперационном периоде. Пороговое значение, ассоциированное с риском развития рестеноза у пациентов групп В и С, представлено следующими маркерами: Вах $\geq 32,9$ нг/мл, Vcl-2 $\leq 2,44$ нг/мл и VEGF A165 ≤ 208 пг/мл на первые часы; NO ≤ 126 ммоль/л, Вах $\geq 31,6$ нг/мл на первые сутки; PDGF BB ≥ 28 нг/мл и VEGF A 165 ≤ 383 пг/мл на 7 сутки; NO ≤ 273 ммоль/л и VEGF A 165 ≤ 404 пг/мл и на 14 сутки; sFas $\geq 0,52$ нг/мл на 21 сутки, PDGF BB $\geq 15,4$ нг/мл и VEGF A 165 ≤ 355 пг/мл на 1 месяц.

С помощью применения многофакторного анализа удалось выявить следующие факторы риска развития рестеноза в группе В - Вах в первые часы

после операции, NO на 1 и 7 сутки, VEGF A 165 на 14 сутки, sFas на 21 сутки, значения Vps на 1 месяц. В группе С: значения Bcl-2 и VEGF A165 в первые часы, NO на 1 сутки, PDGF BB на 7 сутки, NO на 14 сутки, sFas на 21 сутки, PDGF BB и Vps на 1 месяц.

Полученные результаты свидетельствуют, о том, что усиленная активация системы апоптоза в первые часы после операции усугубляет дисфункцию эндотелия в послеоперационном периоде у пациентов с ОААНК. При этом, несмотря на восстановленный кровоток, выработка эндотелием NO и VEGF A165 у пациентов с рестенозом остается сниженной до конца второй недели. Результатом данных изменений явилось отсутствие активации второй волны апоптоза, что привело к повышенной пролиферации клеток сосудистой стенки к концу первого месяца у пациентов с рестенозом зоны вмешательства. К концу первого месяца была выявлена прямая корреляционная взаимосвязь между повышенными значениями PDGF BB и Vps ($r=+0,8$, $p<0,01$). При этом увеличенная скорость кровотока ведет к нарушению напряжения сдвига на поверхности эндотелия, и сама по себе дополнительно усиливает пролиферацию клеток формирующейся неоинтимы.

Анализ количества исследуемых маркеров непосредственно в зоне рестеноза выявил, что значения белка p53 в образцах с рестенозом были ниже его количества в нормальной артериальной стенке в 3,2 раза ($p<0,01$). При этом уровень PDGF BB в образцах с рестенозом превышал в 3,6 раза его количество в контрольных образцах ($p<0,01$). В зоне рестеноза, количество антиапоптотического белка Bcl-2 было повышено на 62% ($p=0,01$) по сравнению с его количеством в контрольных образцах. Количество ингибитора рецепторного пути апоптоза sFas в образцах с рестенозом было повышено на 70% по сравнению с его значением в контрольных образцах ($p=0,03$).

Нам удалось выявить, что усиленная пролиферация клеток сосудистой стенки в зоне рестеноза поддерживается за счет повышенного уровня антиапоптотического маркера Bcl-2, который защищает пролиферирующие клетки неоинтимы от гибели, продлевая период их жизни, что подтверждено

данными корреляционного анализа ($r=+0,901$, $p<0,01$). Не менее важную роль играет белок p53, который в низких количествах стимулирует митогенез клеток сосудистой стенки при неспособности активировать систему апоптоза. Полученные результаты показывают, что отсутствие активации системы апоптоза приводит к усиленной пролиферации клеток в формирующейся неointиме с последующим развитием рестеноза зоны вмешательства. Так, повышенные значения маркера PDGF BB обратно коррелируют с низкими значениями белка p53 ($r=-0,777$, $p=0,001$) при прямой взаимосвязи с повышенным количеством маркера sFas ($r=+0,545$, $p=0,001$).

В случае с прогрессированием атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде факторами риска в группах С и D выступили следующие маркеры и их пороговые значения: исходный Вах $\geq 25,4$ нг/мл и sFas $\leq 0,91$ нг/мл; Вах $\geq 34,4$ нг/мл и sFas $\leq 0,67$ нг/мл в первые часы; NO ≤ 118 ммоль/л на 1 сутки; PDGF BB $\geq 28,2$ нг/мл на 7 сутки, PDGF BB $\geq 28,5$ нг/мл на 14 сутки, PDGF BB $\geq 13,4$ нг/мл, NO ≤ 215 ммоль/л, RI $\geq 1,17$ на 1 месяц.

При проведении многофакторного анализа, факторами риска прогрессирования атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде для групп С и D выступили значения Вах и sFas исходно и на первые часы; NO на 1 сутки; PDGF BB на 7 и 14 сутки; PDGF BB и NO на 1 месяц.

Проведение бинарной логистической регрессии показало, что вероятность прогрессирования атеросклероза в послеоперационном периоде после выполнения гибридных вмешательств находится в зависимости от исходных значений биомаркера Вах и позволяет прогнозировать риск данного осложнения при расчете по формуле: $P = 1 / (1 + e^{-Y})$; где P – вероятность прогрессирования атеросклероза, e – основание натурального логарифма (число Эйлера), а Y – показатель, рассчитываемый следующим образом: $Y = -27,134 + 1,028x$, где x – исходное количество маркера Вах в сыворотке крови до операции.

В образцах сосудистой стенки в области прогрессирования атеросклеротического поражения наблюдалось увеличение значений маркеров p53 в 2,1 раза ($p<0,01$) и Вах в 1,9 раза ($p < 0,01$) по сравнению с их значениями в

нормальной артериальной стенке. Количество маркеров пролиферации и миграции клеток сосудистой стенки PDGF BB и VEGF A165 было увеличено в 2,3 и 2 раза ($p < 0,01$), соответственно по сравнению с их значениями в нормальной стенке. Уровень ингибитора рецепторного пути апоптоза sFas был снижен в 4,6 раза ($p < 0,01$).

При сравнении исходных значений биомаркеров в сосудистой стенке в зоне атеросклеротического поражения у пациентов с прогрессированием атеросклероза и без данного осложнения получены следующие результаты. Исходное количество биомаркера $Va_{x} \geq 7,15$ нг/мг белка (AUC = 0,98, 95% DI: 0,95-1,0; $p = 0,001$) при значениях $sFas \leq 0,14$ нг/мг белка (AUC=1,0, 95% DI: 0,98-1,0, $p < 0,001$) в сосудистой стенке у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей было ассоциировано с риском прогрессирования атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде.

Прогрессирование атеросклеротического поражения в послеоперационном периоде может быть связано с исходно повышенной интенсивностью апоптотической гибели клеток в атеросклеротической бляшке, усиленной интраоперационной травмой. В ответ на гибель клеток путем запуска двух путей апоптоза происходила значительная ответная пролиферация и миграция соседних клеток сосудистой стенки. Активация второй волны апоптоза не смогла компенсировать такой усиленный пролиферативный ответ, что привело к сохранению высоких значений PDGF BB и сниженного значения NO на 1 месяц с развитием прогрессирования атеросклероза в послеоперационном периоде.

Применение комбинированной терапии в виде витамина E в дозе 400 МЕ 1 раз в сутки в сочетании с препаратом «Актовегин»® в дозе 1200 мг 1 раз в день внутривенно капельно в течение 7 дней после различных видов оперативных вмешательств, начиная с интраоперационного введения препарата, позволило добиться изменений в течении маркеров апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия в различные сроки послеоперационного периода. Это отразилось на интенсивности протекания первой волны апоптоза, выражающейся в снижении количества белков Va_x и $Bcl-2$ как на первые часы, так и на первые

сутки, а также смещения пика активации первой волны апоптоза с первых часов на первые сутки. Это, в свою очередь, повлияло на последующие различия в значениях маркеров, ответственных за пролиферацию клеток, дисфункцию эндотелия и менее интенсивное протекание второй волны апоптоза. Назначение витамина Е за неделю до операции привело к уменьшению интенсивности выработки маркеров апоптоза и пролиферации клеток на фоне улучшения функционирования эндотелия. Однако, следует отметить, что данные изменения были статистически незначимыми, что стало одной из основных причин к применению второго препарата исследования - «Актовегина»®.

Вторым важным эффектом комбинированной терапии явилось то, что медиана значений исследуемых маркеров в ключевые временные точки не достигла пороговых значений, которые были выявлены как факторы риска развития рестеноза зоны реконструкции и прогрессирования атеросклероза в исследуемых группах.

Результатом применения комбинированной антиоксидантной терапии явилось снижение доли пациентов с прогрессированием атеросклероза после выполнения открытых реконструкций на 15% и пациентов с рестенозом зоны реконструкции после гибридных и эндоваскулярных вмешательств на 10% ($p < 0,05$). Важно отметить, что срок возникновения вышеперечисленных осложнений приходился на более поздний период времени в сравнении с пациентами без комбинированной антиоксидантной терапии ($p < 0,05$).

Толщина неоинтимы после различных видов артериальных вмешательств у пациентов на базисной терапии в сроки на 1, 1,5 и 2 года была достоверно выше, чем у пациентов с применением комбинированной антиоксидантной терапии ($p < 0,01$). При этом значения ЛПИ через 2 года у пациентов групп E-G были выше в сравнении со значениями у пациентов групп B-D ($p < 0,05$).

Вероятность формирования неоинтимы зоны реконструкции после выполнения шунтирующих операций на артериях бедренно-подколенного сегмента у пациентов с ОААНК увеличивалась при значениях VEGF A165 равном 307 [299; 312] пг/мл, RI - 0,82 [0,7; 0,9], Vps - 115 [112; 120] см/с к концу первого

месяца и отсутствия ретроградного диастолического и антеградного конечного диастолического пика по данным дуплексного сканирования.

Таким образом, в настоящее время не остается сомнений во взаимосвязи между маркерами системы апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия у пациентов с ОААНК, а также их непосредственного участия в прогрессировании атеросклероза и рестеноза зоны реконструкции. Изучение данных биомаркеров в послеоперационном периоде после проведения различных видов оперативных вмешательств позволило найти новые сведения о патогенезе развития послеоперационных осложнений и способах их диагностики и прогнозирования. В свою очередь, применение сочетания препаратов витамина Е и «Актовегина»® как до, так и в течение первой недели после операции, позволяет улучшить результаты лечения пациентов с ОААНК путем воздействия на маркеры системы апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия.

ВЫВОДЫ

1. Для пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей со IIВ-III стадией заболевания характерна активация систем апоптоза и пролиферации клеток на фоне дисфункции эндотелия. Это выражается в повышенных значениях маркеров – Вах на 57%, PDGF BB на 45% и VEGF A165 в 4,1 раза на фоне сниженного количества Vcl-2 на 17%, sFas на 20%, NO на 29% в сыворотке крови по сравнению со значениями здоровых добровольцев ($p<0,01$). В сосудистой стенке в области атеросклеротического поражения наблюдалось повышение количества маркеров p53 на 55%, Вах на 47%, PDGF BB в 1,9 раза, VEGF A165 в 1,8 раза при сниженных значениях Vcl-2 на 10%, sFas на 45% по сравнению с их количеством в нормальной артериальной стенке ($p<0,01$).

2. Значения биомаркеров Vcl-2 ($r=+0,709$, DI: 0,395; 0,885, $p<0,01$) и Вах ($r=+0,714$, DI: 0,441; 0,862, $p<0,01$) в сыворотке крови имеют прямую корреляционную взаимосвязь с их значениями в сосудистой стенке у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей.

3. Проведение различных видов артериальных реконструкций у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей ведет к активации системы апоптоза в виде двух волн. Для первой волны апоптоза характерно повышение значений биомаркера Вах на 44% при снижении количества Vcl-2 на 41% в первые часы относительно их исходных значений ($p<0,01$). Для активации второй волны апоптоза характерно снижение значений маркера sFas на 62% на 21 сутки по отношению к исходным значениям ($p<0,01$). Две волны апоптоза функционально взаимосвязаны с дисфункцией эндотелия и пролиферацией клеток сосудистой стенки. Активация первой волны апоптоза приводит к снижению значений VEGF A165 на 43% в первые часы, NO на 34% на первые сутки при увеличении значений PDGF BB в 2 раза на седьмые сутки относительно исходных значений ($p<0,01$). Запуск второй волны апоптоза ведет к снижению значений PDGF BB на 23% на 21 сутки по сравнению со значениями на 14 сутки ($p<0,01$).

4. Значения маркеров: Вах \geq 32,9 нг/мл, Vcl-2 \leq 2,44 нг/мл, VEGF A165 \leq 208 пг/мл в первые часы; NO \leq 125 ммоль/л на 1 сутки, PDGF BB \geq 28 нг/мл на 7 сутки, NO \leq 273 ммоль/л и VEGF A165 \leq 404 пг/мл на 14 сутки; sFas \geq 0,52 нг/мл на 21 сутки, PDGF BB \geq 15,4 нг/мл, VEGF A165 \leq 355 пг/мл на 1 месяц ассоциируется с развитием рестеноза зоны реконструкции после эндоваскулярных и гибридных вмешательств. В образцах сосудистой стенки с рестенозом зоны реконструкции повышенная пролиферативная активность клеток сосудистой стенки поддерживается за счет повышенного количества антиапоптотических маркеров – Vcl-2 ($r=+0,901$, $p<0,001$), и sFas ($r=+0,545$, $p=0,001$).

5. Вероятность прогрессирования атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде после проведения гибридных вмешательств находится в прямой зависимости от исходно повышенных значений маркера Вах; для открытых вмешательств от повышенных значений Вах при сниженных значениях маркера sFas на первые часы. Предикторами прогрессирования атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде после открытых и гибридных вмешательств явились следующие биомаркеры: исходное количество Вах \geq 25,4 нг/мл при значении sFas \leq 0,91 нг/мл; в первые часы значения показателей Вах \geq 34,4 нг/мл и sFas \leq 0,7 нг/мл; через сутки после операции сниженное количество NO \leq 118 ммоль/л с последующим ростом значений маркера PDGF BB \geq 28,2 нг/мл на 7 сутки и \geq 28,5 нг/мл 14 сутки; к концу первого месяца повышенные значения PDGF BB \geq 13,4 нг/мл на фоне сниженного количества NO \leq 215 ммоль/л. Исходное количество биомаркера Вах \geq 7,15 нг/мг белка при значении sFas \leq 0,14 нг/мг белка в сосудистой стенке у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей ассоциировано с риском прогрессирования атеросклероза в отдаленном послеоперационном периоде.

6. Применение сочетания витамина Е в дозе 400 МЕ 1 раз в сутки, в течение 1 недели до и после операции, с интраоперационным введением препарата «Актовегин»® в дозе 1200 мг 1 раз в день внутривенно капельно в течение 7 дней после операции привело к снижению интенсивности двух волн

апоптоза, выраженности дисфункции эндотелия и ответной пролиферативной реакции ($p < 0,05$).

7. Клиническая эффективность применения комбинированной антиоксидантной терапии выразилась в снижении доли пациентов с прогрессированием атеросклероза после выполнения открытых реконструкций на 15% и пациентов с рестенозом зоны реконструкций после гибридных и эндоваскулярных вмешательств на 10%, а также более отдаленным сроком возникновения данных осложнений в сравнении с пациентами без данной терапии ($p < 0,05$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей целесообразно проводить комплексную оценку маркеров системы апоптоза, пролиферации клеток и дисфункции эндотелия с целью выявления предикторов развития рестеноза зоны реконструкции и прогрессирования атеросклероза.

2. Рекомендуется выполнять измерения количества Вах в первые часы и на первые сутки после выполнения эндоваскулярных вмешательств. Повышение значений Вах до 34,8 [27,1; 42,5] нг/мл в первые часы и до 32,2 [27; 37,4] нг/мл на 1 сутки после эндоваскулярных вмешательств ассоциируется с повышенным риском развития рестеноза в отдаленном послеоперационном периоде (патент РФ на изобретение № 2764155).

3. Целесообразно производить оценку количества маркеров sFas и Вах в интраоперационных образцах сосудистой стенки с атеросклеротическим поражением в виду того, что при значениях $sFas \leq 0,14$ нг/мг белка и $Вах \geq 7,15$ нг/мг белка прогнозируется прогрессирование атеросклероза после выполнения открытых и гибридных вмешательств.

4. С целью прогнозирования прогрессирования атеросклеротического поражения после выполнения гибридных оперативных вмешательств на магистральных артериях нижних конечностей целесообразно производить оценку исходного количества биомаркера Вах. Рекомендуется использовать предложенную формулу расчета прогнозирования прогрессирования атеросклероза после проведения гибридных вмешательств, в которой используется вышеупомянутый показатель (патент РФ на изобретение №2770737).

5. Необходимо производить определение количества маркеров апоптоза Вах и sFas в первые часы после проведения открытых оперативных вмешательств на артериях нижних конечностей с целью прогнозирования неблагоприятных исходов в виде прогрессирования атеросклероза. Использование предложенной

формулы расчета риска прогрессирования атеросклероза после выполнения открытых вмешательств будет способствовать прогнозированию развития вышеуказанного осложнения с высокой точностью (патент РФ на изобретение №2758207 С1).

6. У пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей рекомендуется применение дополнительно к базисной терапии сочетания витамина Е в дозе 400 МЕ 1 раз в сутки, в течение 1 недели до и после операции, с интраоперационным введением препарата «Актовегин»® в дозе 1200 мг 1 раз в день внутривенно капельно в течение 7 дней после операции с целью улучшения результатов оперативного лечения (Рационализаторское предложение №1452).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД – артериальное давление

АКШ – аорто-коронарное шунтирование

АТ – антитела

АТ II – ангиотензин IIАФК - активные формы кислорода

БАБШ – бифуркационное аорто-бедренное шунтирование

БПП – бедренно-подколенное протезирование

БПШ – бедренно-подколенное шунтирование

ВСА – внутренняя сонная артерия

ВКМ – внеклеточный матрикс

ГБ – гипертонической болезни

ГАБ – глубокая артерия бедра

ГМК – гладкомышечные клетки

ДС – дуплексное сканирование

ДЭ – дисфункция эндотелия

ЗБА – задняя большеберцовая артерия

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИМ – инфаркт миокарда

КА – коронарные артерии

КИНК – критическая ишемия нижних конечностей

ЛПНП – липопротеиды низкой плотности

ММР – металлопериоксидаза

НИ – неоинтима

НПА – наружная подвздошная артерия

НСА – наружная сонная артерия

ОААНК – облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей

ОБА – общая бедренная артерия

ОПА – общая подвздошная артерия

ПБА – поверхностная бедренная артерия
ПББА – передняя большеберцовая артерия
ПкА – подколенная артерия
ПЦР – полимеразная цепная реакция
СД – сахарный диабет
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
УЗДГ – ультразвуковая доплерография
ФНО- α – фактор некроза опухоли
ФС – фосфатидилсерин
ЦОГ-2 – циклооксигеназа-2
ЧТБА – чрескожная транслюминальная ангиопластика
ЭАЭ – эндартерэктомии
ЭК – эндотелиальные клетки
ЭТ-1 – эндотелин -1
bFGF – фактором роста фибробластов
eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота
FasL – Fas лиганд
FGF – фибробластный фактор роста
Hcy – гомоцистеин
IAP – ингибитор апоптоза
MAPK – митоген-активируемой протеинкиназы
PDGF – тромбоцитарный фактор роста
PDGF R – рецептор тромбоцитарного фактора роста
RI – индекс периферического сопротивления
VEGF – факторы роста эндотелия сосудов
Vps – пиковая систолическая скорость кровотока

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. «Актовегин»®: механизмы действия и эффективность при неврологических осложнениях сахарного диабета / И.А. Строков, О.С. Федорова, А.С. Фокина [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Нервные болезни. – 2012. – Т. 3. – С. 21-26.
2. Альфа-токоферол предотвращает резкое падение содержания антиапоптотического белка Bcl-2 в нейронах коры мозга, вызванное окислительным стрессом / И.О. Захарова, Т.В. Соколова, Н.Ф. Аврова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Нейрохимия. – 2016. – Т. 33, № 3. – С. 238–243.
3. Асташкин, Е.И. Влияние «Актовегина»® на фагоциты крови при оксидативном стрессе у пациентов с сердечной недостаточностью / Е.И. Асташкин, М.Г. Глезер, Н.С. Орехова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Фарматека. – 2014. № 9. – С. 14-19.
4. Власова, Ю.А. Влияние альфа-токоферола и H₂O₂ на мембранный потенциал митохондрий и отношение Вах/Bcl-x1 в клетках PC12. / Ю.А. Власова, И.О. Захарова, Н.Ф. Аврова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Нейрохимия. – 2016. – Т. 33, № 4. – С. 344–349.
5. Влияние витамина Е на физиологические процессы: результаты и перспективные направления исследований / Д.Л. Теплый, Е.И. Кондратенко, Ю.В. Нестеров [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Фундаментальные исследования. – 2005. – № 9. – С. 92-93.
6. Влияние водной депривации и α-токоферола ацетата на экспрессию белков-маркеров апоптоза / Ю.В. Азизова, Д.Л. Тёплый, Е.Д. Бажанова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Успехи геронтологии. – 2011. – Т. 24, № 2. – С. 220-224.
7. Влияние препарата «Актовегина»® на метаболическую и вазомоторную функции микрососудистого эндотелия кои человека / А.А. Федорович, А.Н. Рогоза, Е.М. Канищева [и др.]. – Текст (визуальный) :

непосредственный // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. – 2010. – Т. 6, № 1. – С. 53-60.

8. Габбасов, З.А. Клеточные аспекты патогенеза стенозирования артерий и рестеноза стентов / З.А. Габбасов, С.Г. Козлов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Клиническая геронтология. – 2009. – Т. 5, № 3. – С. 3-9.

9. Гавриленко, Т.И. Сосудистый эндотелиальный фактор роста в клинике внутренних заболеваний и его патогенетическое значение. / Т.И. Гавриленко, Н.А. Рыжкова, А.Н. Пархоменко. – Текст (визуальный) : непосредственный // Украинский Кардиологический журнал. – 2011. – Т. 4. – С. 87-95.

10. Действие альфа-токоферола на жизнеспособность клеток РС12 при окислительном стрессе и экспрессию генов про- и антиапоптотических белков митохондрий, *sod 2* и факторов транскрипции *nrf-1*, *nrf-2* и *tfam*. / И.О. Захарова, А.О. Ахметшина, Л.В. Баюнова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2020. – Т. 56, № 3. – С. 232–244.

11. Егорова, И.Э. Молекулярные механизмы апоптоза, вовлеченные в развитие различных патологических процессов / И.Э. Егорова, В.И. Бахтаирова, А.И. Сулова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Инновационные тенологии в фармации. – 2019. – Т. 6. – С. 108-114.

12. Затевахин, И.И. Отдаленные результаты открытых и эндоваскулярных операций в коррекции окклюзивно - стенотических поражений артерий бедренно – подколенного сегмента / И.И. Затевахин, В.Н. Шиповский, В.Н. Золкин. – Текст (визуальный) : непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011. – Т. 17, № 3. – С. 59- 62.

13. Калинин, Р.Е. Эффективность L-аргинина в лечении атеросклероза артерий нижних конечностей и профилактике рестеноза зоны реконструкции / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, А.С. Пшенников. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Ивановской Медицинской Академии. – 2013. – Т. 18, № 2. – С. 18-21.

14. Канаровский, Е.Ю. Кинетика антиоксидантной активности α -токоферола и некоторых его гомологов. Часть 1. Обзор проблемы. Теоретическая модель / Е.Ю. Канаровский, О.В. Ялтыченко, Н.Н. Горинчой. – Текст (визуальный) : непосредственный // Электронная обработка материалов. – 2017. – Т. 53, № 5. – С. 48-66.
15. Консервативное лечение хронической ишемии нижних конечностей в практике амбулаторного хирурга / А.В. Шабунин, Д.В.Матвеев, М.Р. Кузнецов, А.Д. Матвеев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2019. – № 3. – С. 98-104.
16. Майборова, А.А. Апоптоз – гены и белки / А.А. Майборова. – Текст (визуальный): непосредственный // Сибирский медицинский журнал. –2013. – Т. 3. – С. 130-135.
17. Механизмы развития осложнений эндоваскулярного лечения артерий нижних конечностей и их хирургическая коррекция / А.В. Гавриленко, А.Э. Котов, Д.В. Шаталов [и др]. – Текст (визуальный): непосредственный // Анналы хирургии. – 2013. – Т. 5. – С. 28-35.
18. Механизмы развития рестеноза в стенке коронарных артерий у больных с ишемической болезнью сердца / Н.М. Абдужамалова, М.Р. Кабардиева, Е.В. Меркулов [и др]. – Текст (визуальный) : непосредственный. // Кардиологический Вестник. – 2016. – № 2. – С. 100-103.
19. Национальные рекомендации по диагностике и лечению заболеванию артерий нижних конечностей / С.В. Сапелкин, М.Р. Кузнецов, В.Ю. Калашников [и др.]. – М., 2019. – 89 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.
20. Оксидантный стресс и ранние осложнения послеоперационного периода в кардиохирургии / Ж.С. Филипповская, О.Н. Герасименко, О.А. Гребенчиков [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2016. – Т. 13, № 6. – С. 13-21.
21. Папоян, С.А. Результаты эндоваскулярного лечения больных с поражением аорто-подвздошного сегментатипов С и D по классификации TASC II / С.А.Папоян, А.А. Щеголев, Д.Г. Громов. – Текст (визуальный) :

непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2016. – Т. 22, № 3. – С. 75-79.

22. Патофизиологические механизмы и генетические маркеры рестеноза после чрескожных коронарных вмешательств / Ю.А. Шувалова, А.Н. Мешков, А.И. Каминный [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2007. – Т. 6, № 5. – С. 107-114.

23. Применение препарата «Актовегин»® при лечении больных с хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей / И.Г. Учкин, А.М. Зудин, А.Г. Багдасарян [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Справочник поликлинического врача. – 2014. – № 1. – Р. 40-46.

24. Проблема хирургии ишемии конечности: сравнительная оценка ангиогенного эффекта L-аргинина и VEGF фактора роста эндотелия сосудов / В.Д. Луценко, С.Л. Сперанский, В.Ф. Куликовский [и др.]. – Текст : (визуальный) // Научные ведомости. – 2012. – Т. 22, № 141. – С. 137-140.

25. Профилактика рестеноза у пациентов после чрескожного коронарного вмешательства: возможный патогенетический подход / О.А. Громова, И.Ю. Торшин, А.М. Лиля [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Кардиология. – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 33-40.

26. Роль васкулоэндотельного фактора в развитии рестеноза в стенке / Е.И. Сенькина, К.Л. Козлов, В.В. Тишко [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Клиническая геронтология. – 2018. – Т. 7. – С. 45-51.

27. Роль протеолитических ферментов в контроле различных стадий апоптоза / Г.А. Яровая, Е.А. Нешкова, Е.А. Мартынова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Лабораторная медицина. – 2011. – № 11. – С. 39-51.

28. Светликов, А.В. Современная стратегия улучшения отдаленных результатов хирургического лечения заболеваний периферических артерий / А.В. Светликов, Л.Э. Ишпулаева. – Текст (визуальный) : непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2020. – Т. 26, № 4. – С. 23-31.

29. Современное состояние проблемы in-stent рестенозов / Д.Э. Майлян, Ю.И. Афанасьев, Д.О. Гагарина, Э.А. Майлян. – Текст (визуальный) : непосредственный // Научные ведомости. – 2015. – № 10. – С. 5-12.

30. Современные тенденции развития хирургического и эндоваскулярного лечения больных с артериальной патологией / Б.Г. Алекян, А.В. Покровский, Н.Г. Карапетян [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2019. – Т. 25, № 4. – С. 55-61.

31. Сосудистый эндотелиальный фактор роста в регуляции развития и функционирования головного мозга: новые молекулы – мишени для фармакотерапии / В.В. Рославцева, А.Б. Салмина, С.В. Прокопенко [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биомедицинская химия. – 2016. – Т. 26, № 2. – С. 124-133.

32. Староверов, И.Н. Особенности морфологических изменений сосудистой стенки / И.Н. Староверов, А.В. Кораблев, О.М. Лончакова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2014. – № 1. – С. 26-31.

33. Факторы, связанные с развитием рестеноза после реконструктивных операций на артериях / Б.Б. Кок, А.В. Федоров, А.А. Костарева [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова. – 2013. – № 6. – С. 108-111.

34. Цыган, В.Н. Роль апоптоза в регуляции иммунного ответа / В.Н. Цыган. – Текст (визуальный) : непосредственный // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 62-77.

35. Чубуков, Ж.А. Фактор Виллебранда и дисфункция эндотелия при стрессе / Ж.А. Чубуков – Текст (визуальный) : // Проблемы здоровья и экологии. – 2012. – № 2. – С. 40-45.

36. Шавловская, О.А. Новые аспекты применения «Актовегина»®: от механизмов действия к клиническим эффектам / О.А. Шавловская. – Текст (визуальный) : непосредственный // Эффективная фармакотерапия. – 2016. – №. 9. – С. 4-6.

37. Шевченко, Л.Ю. Стимуляция ангиогенеза эндогенными факторами роста / Л.Ю. Шевченко, Г.Г. Борщев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. – 2018. – Т. 13, № 3. – С. 96-102.

38. Шилов, А.М. Антигипоксанты и антиоксиданты (Актовегин) в профилактике и лечении сердечно-сосудистых осложнений / А.М. Шилов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Фарматека. – 2013. – № 9. – Р. 42-48.

39. A macrophage-specific lncRNA regulates apoptosis and atherosclerosis by tethering HuR in the nucleus / V. Simion, H. Zhou, S. Haemmig [et al.]. – Text : visual // Nat Commun. – 2020. – Vol. 11, N 1. – P. 6135.

40. A macrophage-specific lncRNA regulates apoptosis and atherosclerosis by tethering HuR in the nucleus/ V. Simion, H. Zhou, S. Haemmig [et al.]. – Text : visual // Nat Commun. – 2020. – Vol. 11, N 1. – P. 6135.

41. A new Mfn-2 related synthetic peptide promotes vascular smooth muscle cell apoptosis via regulating the mitochondrial apoptotic pathway by inhibiting Akt signaling / X. Zhang, X. Xu, L. Lu. [et al.]. – Text : visual // J Transl Med. – 2021. – Vol. 19, N 1. – P. 395.

42. A Randomized Controlled Trial to Assess the Efficacy of Actovegin in Poststroke Cognitive Impairment / A. Guekht, I. Skoog, S. Edmundson [et al.]. – Text : visual // Stroke. – 2017. – Vol. 48, N 5. – P. 1262-1270.

43. Åberg, M. Tissue Factor Noncoagulant Signaling: Mechanisms and Implications for Cell Migration and Apoptosis /M. Åberg O. Eriksson, A. Siegbahn. – Text : visual // Semin Thromb Hemost. – 2015. – Vol. 41, N 7. – P. 691-699.

44. Aboyans, V. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of peripheral arterial diseases, in collaboration with the European Society for vascular surgery / Jean – Baptiste Ricco, E.L. Marie-Louise. Bartelink, M. Bjorck [et al.]. – Text : visual // European Heart Journal. – 2017. – P. 1-60.

45. Actovegin reduces the hydrogen peroxide-induced cell apoptosis of SK-N-SH neuroblastoma by means of p38MAPK and PI-3K inhibition / M.M. Yurinskaya,

M.G. Vinokurov, S.V. Grachev [et al.]. – Text : visual // Dokl Biol Sci. – 2014. – Vol. 456, N 1. – P. 215-217.

46. Actovegin reduces PMA-induced inflammation on human cells / F.X. Reichl, C. Högg, F. Liu [et al.]. – Text : visual // Eur J Appl Physiol. – 2020. – Vol. 120, N 7. – P. 1671-1680.

47. Actovegin in the management of patients after ischemic stroke: A systematic review / I. Fleur, A. Baizhaxynova, E. Reynen [et al.]. – Text : visual // PLoS One. – 2022. – Vol. 17, N 6. – e0270497.

48. Actovegin: a biological drug for more than 5 decades / M.W. Elmlinger, F. Buchmayer, J. Pleiner, [et al.]. – Text : visual // Wien Med Wochenschr. – 2011. – Vol. 161, N 3-4. – P. 80-88.

49. All-trans-retinoic acid decreases cell proliferation and increases apoptosis in an animal model of vein bypass grafting / C.D. Leville, V.O. Osipov, J.M. Jean-Claude [et al.]. – Text : visual // Surgery. – 2000. – Vol. 128, N 2. – P. 178–184.

50. Alpha-tocopherol preserves endothelial cell migration in the presence of cell-oxidized low-density lipoprotein by inhibiting changes in cell membrane fluidity / J.A. van Aalst, W. Burmeister, P.L. Fox [et al.]. – Text : visual // J Vasc Surg. – 2004. – Vol. 39, N 1. – P. 229–237.

51. Álvarez-Aznar, A. VEGF Receptor Tyrosine Kinases: Key Regulators of Vascular Function / A. Álvarez-Aznar, L. Muhl, K. Gaengel. – Text : visual // Curr Top Dev Biol. – 2017. – Vol. 123. – P. 433–482.

52. Alzate, J.M. The role of the multi-drug resistance 1, p53, B cell lymphoma 2, and Bcl2-associated X genes in the biologic behavior and chemotherapeutic resistance of canine transmissible venereal tumors / J.M. Alzate, L.M. Montoya-Florez, J.E. Pérez. – Text: visual // Vet Clin Pathol. – 2019. – Vol. 48, N 4. – P. 730-739.

53. An increase of VEGF plasma levels is associated with restenosis of drug-eluting stents / K.M. Katsaros, S.P. Kastl, K.A. Krychtiuk [et al.]. – Text : visual // Euro Intervention. – 2014. – Vol. 10, N 2. – P. 224-230.

54. Analysis of Mutations in K-ras and p53 Genes in Sputum and Plasma Samples / L. Zhang, W. Gao, P. Keohavong [et al.]. – Text : visual // *Methods Mol Biol.* – 2020. – Vol. 2102. – P. 373-394.
55. Analysis of p53 gene polymorphism (codon 72) in symptomatic patients with atherosclerosis / M.H. Lagares, K.S.F. Silva, A.M. Barbosa [et al.]. – Text : visual // *Genet Mol Res.* – 2017. – Vol. 16, N 3. – P. 103-109.
56. Angiogenesis in the atherosclerotic plaque / C. Camaré, M. Pucelle, A. Nègre-Salvayre, R. Salvayre. – Text : visual // *Redox Biol.* – 2017. – Vol. 12. – P. 18-34.
57. Angioplasty versus stenting for infrapopliteal arterial lesions in chronic limb-threatening ischaemia / C.C. Hsu, G.N. Kwan, D. Singh [et al.]. – Text : visual // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2018. – Vol. 12, N 12. – P. 1-10.
58. Anti-apoptotic effects of autophagy via ROS regulation in microtubule-targeted and PDGF-stimulated vascular smooth muscle cells / H.S. Park, J.H. Han, S.H. Jung [et al.]. – Text : visual // *Physiol Pharmacol.* – 2018. – Vol. 22, N 3. – P. 349-360.
59. Antioxidant vitamin supplementation in cardiovascular diseases / G. Riccioni, T. Bucciarelli, B. Mancini [et al.]. – Text : visual // *Ann Clin Lab Sci.* – 2007. – Vol. 37, N 1. – P. 89-95.
60. Antioxidant vitamin supplementation reduces arterial stiffness in adults: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / A.W. Ashor, M. Siervo, J. Lara [et al.]. – Text : visual // *J Nutr.* – 2014. – Vol. 144. – P. 1594–1160.
61. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species / L. He, T. He, S. Farrar [et al.]. – Text : visual // *Cell Physiol Biochem.* – 2017. – Vol. 44, N 2. – P. 532-553.
62. Antioxidants Targeting Mitochondrial Oxidative Stress: Promising Neuroprotectants for Epilepsy / N. Yang, Q.W. Guan, F.H. [et al.]. – Text : visual // *Chen Oxid Med Cell Longev.* – 2020. – N 4. – P. 1-14.
63. Apoptosis After Stent Implantation Compared With Balloon Angioplasty in Rabbits / M. Kollum, S. Kaiser, R. Kinscherf [et al.]. – Text : visual // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* – 1997. – Vol. 17. – P. 2383–2388.

64. Apoptosis and cell proliferation after porcine coronary angioplasty / N. Malik, S.E. Francis, C.M. Holt [et al.]. – Text: visual // *Circulation*. – 1998. – Vol. 98. – P. 1657–1665.
65. Apoptosis and proliferation of endothelial cells in early atherosclerotic lesions: possible role of oxidised LDL / G.D. Norata, L. Tonti, P. Roma [et al.]. – Text : visual // *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. – 2002. – Vol. 12, N 5. – P. 297-305.
66. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques / M.M. Kockx, G.R. De. Meyer, J. Muhring [et al.]. – Text : visual // *Circulation*. – 1998. – Vol. 97, N 23. – P. 2307–2315.
67. Apoptosis as a mechanism for the elimination of cardiomyocytes after acute myocardial infarction / M. Prech, A. Marszałek, J. Schröder [et al.]. – Text: visual // *Am J Cardiol*. – 2010. – Vol. 105. – P. 1240–1245.
68. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis / J.M. Isner, M. Kearney, S. Bortman [et al.]. – Text : visual // *Circulation*. – 1995. – Vol. 91. – P. 2703–2711.
69. Apoptosis in restenosis versus stable-angina atherosclerosis. Implications for the pathogenesis of restenosis / G. Bauriedel, S. Schluckebier, R. Hutter [et al.]. – Text : visual // *Thromb. Vasc. Biol*. – 1998. – Vol. 18. – P. 1132–1139.
70. Apoptosis participates in cellularity regulation during rat aortic intimal thickening / M. Bochaton-Piallat, F. Gabbiani, M. Redard [et al.]. – Text : visual // *Am J Pathol*. – 1995. – Vol. 146. – P. 1059–1064.
71. Apoptosis, autophagy and atherosclerosis: Relationships and the role of Hsp27 / R. Shan, N. Liu, Y. Yan [et al.]. – Text : visual // *Pharmacol Res*. – 2021. – Vol. 166. – P. 105169.
72. Apoptosis, cell proliferation and modulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21(cip1) in vascular remodelling during vein arterialization in the rat / T.F. Borin, A.A. Miyakawa, L. Cardoso [et al.] – Text : visual // *Int J Exp Pathol*. – 2009. – Vol. 90, N 3. – P. 328–337.

73. Apoptosis, proliferation, and morphology during vein graft remodeling in rabbits / L. Wan, S.H. Dai, S.Q. Lai [et al.]. – Text : visual // *Genet Mol Res.* – 2016. – Vol. 15, N 4. – P. 10-15.
74. Apoptotic Bodies: Mechanism of Formation, Isolation and Functional Relevance / J.P. Santavanond, S.F. Rutter, G.K. Atkin-Smith, I.K.H. Poon. – Text : visual // *Subcell Biochem.* – 2021. – Vol. 97. – P. 61-88.
75. Asiri, Y.A. Probuocol attenuates cyclophosphamide-induced oxidative apoptosis, p53 and Bax signal expression in rat cardiac tissues / Y.A. Asiri. – Text : visual // *Oxid Med Cell Longev.* – 2010. – Vol. 3, N 5. – P. 308-316.
76. Associations Between Polymorphisms of Endothelial Nitric Oxide Synthase, Matrix Metalloproteinase 3, Angiotensinogen, and Angiotensin II Type 1 Receptor and Risk of Restenosis After Percutaneous Coronary Intervention: A Meta-analysis / S. Zhou, G. Mu, S. Wei [et al.]. – Text: visual // *Clin Ther.* – 2020. – Vol. 42, N 3. – P. 458-474.
77. Bae, H. Effects of nitric oxide on apoptosis and voltage-gated calcium channels in human cardiac myofibroblasts / H. Bae, T. Kim, I. Lim. – Text : visual // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2020. – Vol. 47, N 1. – P. 16-26.
78. Bauriedel, G. Detection of PDGF mRNA in human restenotic plaque tissue by in situ hybridization: implication for novel therapeutic approaches / G. Bauriedel. – Text : visual // *J Am Coll Cardiol.* – 1994. – Vol. 23. – P. 124 –129.
79. Bauriedel, G. Increased apoptotic and necrotic cell death in human coronary plaques with unstable versus stable angina / G. Bauriedel, I. Schmücking, R. Hutter. – Text : visual // *Circulation.* – 1997. – Vol. 96, N 1. – P. 290 – 295.
80. Birringer, M. Vitamin E: Regulatory role of metabolites / M. Birringer, S. Lorkowski. – Text : visual // *IUBMB Life.* – 2019. – Vol. 71, N 4. – P. 479-486.
81. Boscoboinik, D. Alpha-tocopherol (vitamin E) regulates vascular smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity / D. Boscoboinik, A. Szewczyk, A. Azzi. – Text : visual // *Arch Biochem Biophys.* – 1991. – Vol. 286, N 1. – P. 264-9.
82. Both nitric oxide and nitrite prevent homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and subsequent apoptosis via cGMP-dependent pathway in neuronal

cells / S.O. Jeong, Y. Son, J.H. Lee [et al.]. – Text : visual // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2017. – Vol. 493, N 1. – P. 164–169.

83. Cardioprotection with alpha-tocopheryl phosphate: amelioration of myocardial ischemia reperfusion injury is linked with its ability to generate a survival signal through Akt activation / S. Mukherjee, I. Lekli, M. Das [et al.]. – Text : visual // *Biochim Biophys Acta.* – 2008. – Vol. 1782, N 9. – P. 498-503.

84. Cardiovascular bioimaging of nitric oxide: Achievements, challenges, and the future / A.K. Vidanapathirana, P.J. Psaltis, C.A. [et al.]. – Text : visual // *Bursill Med Res Rev.* – 2021. – Vol. 41, N 1. – P. 435-463.

85. Carrizzo, A. Circulating VEGF and atherosclerosis risk: is it perhaps the case to reevaluate association with the inflammatory state? / A. Carrizzo, F. Pagano. – Text : visual // *Minerva Cardiol Angiol.* – 2021. – Vol. 69, N 2. – P. 114-116.

86. Cheng, Q. Long non-coding RNA LOC285194 regulates vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis / Q. Cheng, M. Zhang. – Text : visual // *Bioengineered.* – 2020. – Vol. 11, N 1. – P. 53-60.

87. Cheng, X. Apoptosis propagates through the cytoplasm as trigger waves / X. Cheng, J.E. Ferrell. – Text : visual // *Science.* – 2018. – Vol. 361, N 6402. – P. 607-612.

88. Chronic stress: a crucial promoter of cell apoptosis in atherosclerosis / L.B. Meng, M.J. Shan, Z.M. Yu [et al.]. – Text : visual // *J Int Med Res.* – 2020. – Vol. 48. – P. 10-18.

89. Clarke, M. The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability / M. Clarke, M. Bennett. – Text : visual // *M Am J Nephrol.* – 2006. – Vol. 26, N 6. – P. 531-535.

90. Claus Bartels, M.D. Accelerated smooth muscle cell apoptosis in occluded aorto-coronary saphenous vein grafts / M.D. Claus Bartels, M.D. Rainer Malisius, J.F. Friedhelm. – Text : visual // *International Journal of Angiology.* – 2001. – Vol. 10. – P. 237–240.

91. Clowes, A.W. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury, I: smooth muscle cell growth in the absence of endothelium / A.W. Clowes, M.A. Reidy, M.M. Clowes. – Text : visual // *Lab Invest.* – 1983. – Vol. 49, – P. 327–333.
92. Co-expression of p53 and MDM2 in human atherosclerosis: implications for the regulation of cellularity of atherosclerotic lesions / C. Ihling, J. Haendeler, G. Menzel [et al.]. – Text : visual // *J Pathol.* – 1998. – Vol. 185, N 3. – P. 303–312.
93. Comparison of Atherectomy to Balloon Angioplasty and Stenting for Isolated Femoropopliteal Revascularization / H. Bai, A. Fereydooni, H. Zhuo [et al.]. – Text : visual // *Ann Vasc Surg.* – 2020. – Vol. 69. – P. 261-273.
94. Correlation between increasing tissue ischemia and circulating levels of angiogenic growth factors in peripheral artery disease / J. Jalkanen, O. Hautero, M. Maksimow [et al.]. – Text : visual // *Cytokine.* – 2018. – Vol. 110. – P. 24–28.
95. Custodio-Chablé, S.J. Platelet activation as a trigger factor for inflammation and atherosclerosis / S.J. Custodio-Chablé, R.A. Lezama, E. Reyes-Maldonado. – Text : visual // *Cir Cir.* – 2020. – Vol. 88, N 2. – P. 233-243.
96. D-alpha-tocopherol control of cell proliferation / A. Azzi, D. Boscoboinik, E. Chatelain [et al.]. – Text : visual // *Mol Aspects Med.* – 1993. – Vol. 14, N 3. – P. 265-271.
97. D'Arcy, M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy / M.S. D'Arcy. – Text : visual // *Cell Biol Int.* – 2019. – Vol. 43, N 6. – P. 582-592.
98. Date, Y. Oncogenic RUNX3: A Link between p53 Deficiency and MYC Dysregulation / Y. Date, K. Ito. – Text : visual // *Mol Cells.* – 2020. – Vol. 43, N 2. – P. 176-181.
99. Decreased expression of pigment epithelium-derived factor is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy / J.J. Wang, S.X. Zhang, K. Lu [et al.]. – Text : visual // *Diabetes.* – 2005. – Vol. 54. – P. 243–250.
100. Dendritic cells in neointima formation after rat carotid balloon injury: coordinated expression with anti-apoptotic Bcl-2 and HSP47 in arterial repair / G.

Bauriedel, A. Jabs, D. Skowasch [et al.]. – Text : visual // J Am Coll Cardiol. – 2003. – Vol. 42, N 5. – P. 930-938.

101. Devaraj, S. The effects of alpha tocopherol supplementation on monocyte function. Decreased lipid oxidation, interleukin 1 beta secretion, and monocyte adhesion to endothelium / S. Devaraj, D. Li, I. Jialal. – Text : visual // J Clin Invest. – 1996. – Vol. 98, N 3. – P. 756-63.

102. Difference of tissue characteristics between early and late restenosis lesion after bare metal stent implantation: an optical coherence tomography study / M. Habara, M. Terashima, K. Nasu [et al.]. – Text : visual // Circ. Cardiovasc. Interv. – 2011. – Vol. 4, N 3. – P. 232-238.

103. Dimmeler, S. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors / S. Dimmeler, A.M. Zeiher. – Text : visual // Regul Pept. – 2000. – Vol. 90, N 1-3. – P. 19-25.

104. Dual gene transfer of bFGF and PDGF in a single plasmid for the treatment of myocardial infarction / K. Cui, X. Zhou, J. Luo [et al.]. – Text : visual // Experim. Therapeut. Med. – 2014. – Vol. 7. – P. 691–696.

105. Duran, X. Exogenous in vivo NO- donor treatment preserves p53 levels and protects vascular cells from apoptosis / X. Duran, G. Vilahur, L. Badimon. – Text : visual // Atherosclerosis. – 2009. – Vol. 205, N 1. – P. 101-106.

106. Early cell loss after angioplasty results in a disproportionate decrease in percutaneous gene transfer to the vessel wall. Hum Gene / A. Rivard, Z. Luo, H. Perlman, [et al.]. – Text : visual // Ther. – 1999. – Vol. 10, – P. 711–721.

107. Effect of actovegin and solcoseryl on microcirculation in experimental critical lower limb ischaemia / A.I. Orlova, B.S. Sukovatykh, E.B. Artiushkova [et al.]. – Text : visual // Angiol Sosud Khir. – 2017. – Vol. 23, N 1. – P. 29-35.

108. Effect of actovegin on intestinal mucosa and expression of Bcl-2/Bax genes in rats with acute radiation enteritis / X.M. Wang, X.Y. Lin, Y.H. Bi [et al.]. – Text : visual // Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. – 2009. – Vol. 31, N 10. – P. 742-745.

109. Effect of high-dose alpha-tocopherol supplementation on biomarkers of oxidative stress and inflammation and carotid atherosclerosis in patients with coronary

artery disease / S. Devaraj, R. Tang, B. Adams-Huet [et al.]. – Text : visual // *Am J Clin Nutr.* – 2007. – Vol. 86, N 5. – P. 1392-1398.

110. Effect of norcantharidin on the proliferation, apoptosis, and cell cycle of human mesangial cells / K. Ye, Q. Wei, Z. Gong [et al.]. – Text : visual // *Ren Fail.* – 2017. – Vol. 39, N 1. – P. 458-464.

111. Effect of vitamin C and vitamin E supplementation on endothelial function: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials / A.W. Ashor, M. Siervo, J. Lara [et al.]. – Text : visual // *Br J Nutr.* – 2015. – Vol. 113, N 8. – P. 1182-1194.

112. Effects of Microvesicles on Cell Apoptosis under Hypoxia / Y. Guo, J. Tan, Y. Miao [et al.]. – Text : visual // *Oxid Med Cell Longev.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 1-11.

113. Elmlinger, M.W. Neuroprotective and anti-oxidative effects of the hemodialysate actovegin on primary rat neurons in vitro / M.W. Elmlinger, M. Kriebel, D. Ziegler. – Text : visual // *Neuromolecular Med.* – 2011. – Vol. 13, N 4. – P. 266-274.

114. Endogenous p53 protects vascular smooth muscle cells from apoptosis and reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice / J. Mercer, N. Figg, V. Stoneman [et al.]. – Text : visual // *Circ Res.* – 2005. – Vol. 96, N 6. – P. 667–674.

115. Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of NF-kappaB: antiapoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells / M. Aoki, T. Nata, R. Morishita [et al.]. – Text : visual // *Hypertension.* – 2001. – Vol. 38, N 1. – P. 48-55.

116. Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis / S. Paone, A.A. Baxter, M.D. Hulett [et al.]. – Text : visual // *Cell Mol Life Sci.* – 2019. – Vol. 76, N 6. – P. 1093-1106.

117. English, W.R. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 (TIMP-3) induces FAS dependent apoptosis in human vascular smooth muscle cells / W.R. English, H. Ireland-Zecchini, A.H. Baker. – Text : visual // *PLoSOne.* – 2018. – Vol. 13, N 4. – P. 1-22.

118. Enhanced proliferation of coronary endothelial cells in response to growth factors is synergized by hemodialysate compounds in vitro / D. Schönwald, B. Sixt, F. Machicao [et al.]. – Text : visual // *Res Exp Med (Berl)*. – 1991. – Vol. 191, N 4. – P. 259-272.

119. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model / D.K.M. Han, C.C. Haudenschild, M.K. Hong [et al.]. – Text : visual // *Am J Pathol*. – 1995. – Vol. 147. – P. 267-277.

120. Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells following balloon injury / H. Perlman, L. Maillard, K. Krasinski [et al.]. – Text : visual // *Circulation*. – 1997. – Vol. 95. – P. 981–987.

121. Expression of p53 protein and p53 gene transcripts in rabbit carotid arteries after balloon denudation / M. Aoyagi, M. Yamamoto, H. Azuma [et al.]. – Text : visual // *Histochem Cell Biol*. – 1997. – Vol. 107, N 5. – P. 365-370.

122. Expression of PDGF-A and -B in Human Coronary Atherosclerotic Lesion: Immunohistochemical and in Situ Hybridization Study / T. Tamamoto, T. Toda, S. Shimajiri. – Text : visual // *Rinsho Byori*. – 1994. – Vol. 42, N 9. – P. 971–976.

123. Expression of platelet derived growth factor B chain and beta receptor in human coronary arteries after percutaneous transluminal coronary angioplasty: an immunohistochemical study / S. Tanizawa, M. Ueda, CM. van der Loos [et al.]. – Text : visual // *Heart*. – 1996. – Vol. 75. – P. 549–556.

124. Expression of platelet-derived growth factor B-chain in neointimal smooth muscle cells of balloon injured rabbit femoral arteries / K. Uchida, M. Sasahara, N. Morigami [et al.]. – Text : visual // *Atherosclerosis*. – 1996, – Vol. 124, N 1. – P. 9–23.

125. Expression of platelet-derived growth factor in the vascular walls of patients with lower extremity arterial occlusive disease / Y. Zhang, W. Zhang, KQ. Wang, [et al.]. – Text : visual // *Exp Ther Med*. – 2015. – Vol. 9, N 4. – P. 1223–1228.

126. Faletti, L. TNF α sensitizes hepatocytes to FasL-induced apoptosis by NF κ B-mediated Fas upregulation / L. Faletti, L. Peintner, S. Neumann. – Text : visual // *Cell Death Dis*. – 2018. – N 9. – P. 2-14.

127. Fang, J. Research advance of ANRIL on atherosclerosis by regulating cell proliferation and apoptosis / J. Fang, Z. Pan, X. Guo X. – Text : visual // *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* – 2020. – Vol. 49, N 1. – P. 113-117.

128. Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells / Y.J. Geng, L.E. Henderson, E.B. Levesque [et al.]. – Text : visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 1997. – Vol. 17, N 10. – P. 2200–2208.

129. Fas ligand/Fas-mediated apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells: therapeutic implications of fratricidal mode of action / A.J. Belanger, A. Scaria, H. Lu [et al.]. – Text : visual // *Cardiovasc. Res.* – 2001. – Vol. 51. – P. 749-761.

130. Fas promoter region gene polymorphism is associated with an increased risk for myocardial infarction / H. Hanasaki, Y. Takemura, K. Fukuo [et al.]. – Text : visual // *Hypertens Res.* – 2009. – Vol. 32, N 4. – P. 261-264.

131. Fibroblast growth factor 21 inhibits atherosclerosis in apoE^{-/-} mice by ameliorating Fas-mediated apoptosis / X. Yan, Z. Gou, Y. Li [et al.]. – Text : visual // *Lipids Health Dis.* – 2018. – Vol. 17. – P. 1-8.

132. Fibroblast growth factor-2/platelet-derived growth factor enhances atherosclerotic plaque stability / Y. Mao, XQ. Liu, Y. Song [et al.]. – Text : visual // *J Cell Mol Med.* – 2020. – Vol. 24, N 1. – P. 1128-1140.

133. Firan, F.C. Current Synthesis and Systematic Review of Main Effects of Calf Blood Deproteinized Medicine (Actovegin) in Ischemic Stroke / F.C. Firan, A. Romila, G. Onose. – Text : visual // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, N 9. – P. 3181.

134. Firnhaber, J.M. Lower Extremity Peripheral Artery Disease: Diagnosis and Treatment / J.M. Firnhaber, C.S. Powell. – Text : visual // *Am Fam Physician.* – 2019. – Vol. 99, N 6. – P. 362-369.

135. Folestad, E. PDGF-C and PDGF-D signaling in vascular diseases and animal models / E. Folestad, A. Kunath, D. Wågsäter. – Text : visual // *Mol Aspects Med.* – 2018. – Vol. 62. – P. 1-11.

136. Fukuo, K. Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle / K. Fukuo, S. Hata, T. Suhara. – Text : visual // Hypertension. –1996. – Vol. 27. – P. 823-826.

137. Growth factor production by arterial and vein grafts: relevance to coronary artery bypass grafting / A.V. Sterpetti, A. Cucina, B. Randone[et al.]. – Text : visual // Surgery. – 1996. – Vol. 120, N 3. – P. 460–467.

138. Guégan, J.P. Nonapoptotic functions of Fas/CD95 in the immune response / J.P. Guégan, P. Legembre. – Text : visual // FEBS J.– 2018. – Vol. 285. – P. 809-827.

139. Gupta, A. Reactivation of p53 gene by MDM2 inhibitors: A novel therapy for cancer treatment / A. Gupta, K. Shah, M.J. Oza. – Text : visual // Biomed Pharmacother. – 2019. – Vol. 109. – P. 484-492.

140. H19 knockdown suppresses proliferation and induces apoptosis by regulating miR-148b/WNT/ β -catenin in ox-LDL - stimulated vascular smooth muscle cells / L. Zhang, H. Cheng, Y. Yue [et al.]. – Text : visual // J Biomed Sci. – 2018. – Vol. 25, N 1. – P. 1-12.

141. H₂S attenuates oxidative stress via Nrf2/NF- κ B signaling to regulate restenosis after percutaneous transluminal angioplasty / G. Hu, J. Chu, F. Xie [et al.]. – Text : visual // Exp Biol Med (Maywood). – 2021. – Vol. 246, N 2. – P. 226-239.

142. Haendeler, J. Vitamin C and E prevent lipopolysaccharide-induced apoptosis in human endothelial cells by modulation of Bcl-2 and Bax / J. Haendeler, A.M. Zeiher, S. Dimmeler. – Text : visual // Eur J Pharmacol. – 1996. – Vol. 317, N 2-3. – P. 407-411.

143. Haider, S.N. Two-year outcome with preferential use of infrainguinal angioplasty for critical ischemia. / S.N. Haider, E.G. Kavanagh, M. Forlee. – Text: visual // J Vasc Surg. – 2006. – Vol. 43, N 3. – P. 504–512.

144. Hajibandeh, S. Treatment strategies for in-stent restenosis in peripheral arterial disease: a systematic review / S. Hajibandeh. – Text : visual // Interact Cardiovasc Thorac Surg. – 2019. – Vol. 28, N 2. – P. 253-261.

145. High soluble Fas and soluble Fas Ligand serum levels before stent implantation are protective against restenosis / K.M. Katsaros, F. Wiesbauer, W.S.

Speidl [et al.]. – Text : visual // *Thromb Haemost.* – 2011. – Vol. 105, N 5. – P. 883–891.

146. Highly purified calf hemodialysate (Actovegin) may improve endothelial function by activation of proteasomes: A hypothesis explaining the possible mechanisms of action / A. Stelmakh, O. Abrahamovych, A. Cherkas [et al.]. – Text : visual // *Med Hypotheses.* – 2016. – Vol. 95. – P. 77-81.

147. Histological features of restenosis associated with paclitaxel drug-coated balloon: implications for therapy / P. Krishnan, K.R. Purushothaman, M. Purushothaman [et al.]. – Text : visual // *Cardiovasc Pathol.* – 2019. – Vol. 43. – P. 14-18.

148. HO-1 and VEGF gene expression in human arteries with advanced atherosclerosis / W.G. Morsi , O.G. Shaker, E.F. Ismail [et al.]. – Text : visual // *Clin. Biochem.* – 2006. – Vol. 39. – P. 1057-1062.

149. Human vascular smooth muscle cells from restenosis or in-stent stenosis sites demonstrate enhanced responses to p53: implications for brachytherapy and drug treatment for restenosis / S. Scott, M. O'Sullivan, S. Hafizi [et al.]. – Text : visual // *Circ Res.* – 2002. – Vol. 90, N 4. – P. 398–404.

150. Imanishi, T. Expression of cellular FLICE-inhibitory protein in human coronary arteries and in a rat vascular injury model / T. Imanishi, J. McBride, Q. Ho. – Text : visual // *Am J Pathol.* – 2000. – Vol. 156, N 1. – P. 125-137.

151. In situ detection of platelet-derived growth factor-A and factor-B chain mRNA in human coronary arteries after percutaneous transluminal coronary angioplasty / M. Ueda, AE. Becker, N. Kasayuki [et al.]. – Text : visual // *Am J Pathol.* – 1996. – Vol. 149. – P. 831–843.

152. Increased p53 gene dosage reduces neointimal thickening induced by mechanical injury but has no effect on native atherosclerosis / S.M. Sanz-González, L. Barquín, I. García-Cao [et al.]. – Text : visual // *Cardiovasc Res.* – 2007. – Vol. 75, N 4. – P. 803–812.

153. Induction of atherosclerotic plaque rupture in apolipoprotein E^{-/-} mice after adenovirus-mediated transfer of p53 / J.H. von der Thüsen, B.J. van Vlijmen, R.C. Hoeben [et al.]. – Text: visual // *Circulation*. – 2002. – Vol. 105, N 17. – P. 2064–2070.

154. Induction of apoptosis in breast cancer cells in vitro by Fas ligand reverse signaling / T. Kolben, U. Jeschke, T. Reimer [et al.]. – Text : visual // *J Cancer Res ClinOncol*. – 2018. – Vol. 144, N 2. – P. 249-256.

155. Infectious agents, inflammation, and growth factors: how do they interact in the progression or stabilization of mild human atherosclerotic lesions? / J. Góis, M. Higuchi, M. Reis [et al.]. – Text : visual // *Ann Vasc Surg*. – 2006. – Vol. 20, N 5. – P. 638–645.

156. Inhibition of MDM2 attenuates neointimal hyperplasia via suppression of vascular proliferation and inflammation / T. Hashimoto, T. Ichiki, J. Ikeda [et al.]. – Text : visual // *Cardiovasc Res*. – 2011. – Vol. 91, N 4. – P. 711-719.

157. Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease / M.J. Pollmann, Z.L. Hall, M.J. Mann [et al.]. – Text : visual // *Nat Med*. – 1998. – Vol. 4. – P. 222–227.

158. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF / G.A. Ferns, E.W. Raines, K.H. Sprugel [et al.]. – Text : visual // *Science*. – 1991. – Vol. 253. – P. 1129–1132.

159. Inhibition of protein kinase C activity and vascular smooth muscle cell growth by d-alpha-tocopherol / D.O. Boscoboinik, E. Chatelain, G.M. Bartoli [et al.]. – Text : visual // *Biochim Biophys Acta*. – 1994. – Vol. 1224, N 3. – P. 418-426.

160. Inhibitory effects of Brazilin on the vascular smooth muscle cell proliferation and migration induced by PDGF- BB / J. Guo, L. Li, Y.J. Wu [et al.]. – Text : visual // *Am. J. Chinese Med*. – 2013. – Vol. 41. – P. 1283–1296.

161. Interplay of nitric oxide metabolites and markers of endothelial injury, inflammation, and vascular disease in the spectrum of advanced chronic kidney disease / K. Batko, M. Krzanowski, A. Pietrzycka [et al.]. – Text : visual // *Kardiol Pol*. – 2020. – Vol. 78, N 1. – P. 51-58.

162. Jackson, C.L. Effects of probucol on rat carotid artery responses to balloon catheter injury / C.L. Jackson, K.S. Pettersson. – Text : visual // *Atherosclerosis*. – 2001. – Vol. 154, N 2. – P. 407-414.

163. Jacob, T. p53 gene therapy modulates signal transduction in the apoptotic and cell cycle pathways downregulating neointimal hyperplasia / T. Jacob, A. Hingorani, E. Ascher. – Text : visual // *Vasc Endovascular Surg*. – 2012. – Vol. 46, N 1. – P. 45-53.

164. Jagadeesha, D.K. Inhibition of apoptotic signaling and neointimal hyperplasia by tempol and nitric oxide synthase following vascular injury / D.K. Jagadeesha, F.J. Miller, R.C. Bhalla. – Text : visual // *J Vasc Res*. – 2009. – Vol. 46, N 2. – P. 109-118.

165. Kale, J. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death / J. Kale, E.J. Osterlund, D.W. Andrews. – Text : visual // *Cell Death Differ*. – 2018. – Vol. 25, N 1. – P. 65-80.

166. Karaman, S. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease / S. Karaman, V.M. Leppänen, K. Alitalo. – Text : visual // *Development*. – 2018. – Vol. 145, N 14. – P. 1-9.

167. Kavurma, M.M. The walking dead: macrophage inflammation and death in atherosclerosis / M.M. Kavurma, K.J. Rayner, D. Karunakaran. – Text : visual // *Curr Opin Lipidol*. – 2017. – Vol. 28, N 2. – P. 91-98.

168. Kazlauskas, A. PDGFs and their receptors / A. Kazlauskas – Text : visual // *Gene*. – 2017. – Vol. 614. – P. 1-7.

169. Laminar shear stress stimulates vascular smooth muscle cell apoptosis via the Akt pathway / T.N. Fitzgerald, B.R. Shepherd, H. Asada [et al.]. – Text : visual // *J Cell Physiol*. – 2008. – Vol. 216, N 2. – P. 389–395.

170. L-arginine alleviates doxorubicin-induced endothelium-dependent dysfunction by promoting nitric oxide generation and inhibiting apoptosis / X. Li, J. Gu, Y. Zhang [et al.]. – Text : visual // *Toxicology*. – 2019. – Vol. 423. – P. 105-111.

171. Li, C.J. Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Human Diseases: Pathophysiology, Predictive Biomarkers, Therapeutic / C.J. Li. – Text : visual // Biomolecules. – 2020. – N 10. – P. 1-3.

172. Li, L. Platelet derived growth factor- B (PDGF- B) induced by hypoxia promotes the survival of pulmonary arterial endothelial cells through the PI3K/Akt/Stat3 pathway / L. Li, M. Xu, X. Li. – Text : visual // Cellular Physiol. Biochem. – 2015. – Vol. 35. – P. 441–451.

173. Long Noncoding RNA TYKRIL Plays a Role in Pulmonary Hypertension via the p53-mediated Regulation of PDGFR β / C.M. Zehendner, C. Valasarajan, A. Werner [et al.]. – Text : visual // Am J Respir Crit Care Med. – 2020. – Vol. 202, N 10. – P. 1445-1457.

174. Loss of Fas signaling in fibroblasts impairs homeostatic fibrosis resolution and promotes persistent pulmonary fibrosis / E.F. Redente, S. Chakraborty, S. Sajuthi [et al.]. – Text : visual // JCI Insight. – 2020. – Vol. 6, N 1. – P. e141618.

175. Low shear stress induces endothelial cell apoptosis and monocyte adhesion by upregulating PECAM- 1 expression / X. Xie, F. Wang, L. Zhu [et al.]. – Text : visual // Mol Med Rep. – 2020. – Vol. 21, N 6. – P. 2580-2588.

176. Luminal foam cell accumulation is associated with smooth muscle cell death in the intimal thickening of human saphenous vein grafts / M. Kockx, G. De Meyere, H. Bortier [et al.]. – Text: visual // Circulation. – 1996. – Vol. 94. – P. 1255-1262.

177. Luo, X. The third model of Bax/Bak activation: a Bcl-2 family feud finally resolved? / X. Luo, K.L. O'Neill, K. Huang. – Text : visual // F1000Research. – 2020. – Vol. 9. – P. 1-15.

178. Luo, Z. Adenovirus-mediated delivery of fas ligand inhibits intimal hyperplasia after balloon injury in immunologically primed animals / Z. Luo. – Text : visual // Circulation. – 1999. – Vol. 13. – P. 1776-1779.

179. Macrophage Apoptosis and Efferocytosis in the Pathogenesis of Atherosclerosis / M.F. Linton, V.R. Babaev, J. Huang [et al.]. – Text : visual // Circ J. – 2016. – Vol. 80, N 11. – P. 2259-2268.

180. Major Adverse Limb Events and Mortality in Patients with Peripheral Artery Disease / S.S. Anand, F. Caron, J.W. Eikelboom [et al.]. – Text : visual / The COMPASS Trial. *J Am Coll Cardiol* // – 2018. – Vol. 71, N 20. – P. 2306-2315.

181. Malekmohammad, K. Antioxidants and Atherosclerosis: Mechanistic Aspects / K. Malekmohammad, R.D.E. Sewell, M. Rafieian-Kopaei. – Text : visual // *Biomolecules*. – 2019. – Vol. 9, N 8. – P. 301.

182. Mallat, Z. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance / Z. Mallat, A. Tedgui. – Text : visual // *Br J Pharmacol*. – 2000. – Vol. 130, N 5. – P. 947-962.

183. Matrix Metalloproteinases Retain Soluble FasL-mediated Resistance to Cell Death in Fibrotic-Lung Myofibroblasts / D. Nareznoi, J. Konikov-Rozenman, D. Petukhov [et al.]. – Text : visual // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, N 2. – P. 411.

184. Matter, C.M. Role of endogenous Fas (CD94/Apo-1) ligand in balloon-induced apoptosis, inflammation and neointima formation / C.M. Matter, C.E. Chadjichristos, P. Meier. – Text : visual // *Circulation*. – 2006. – Vol. 118, N 15. – P. 1879-1887.

185. Mcl-1 and Bcl-x_L sequestration of Bak confers differential resistance to BH3-only proteins / C. Hockings, A.E. Alsop, S.C. Fennell [et al.]. – Text : visual // *Cell Death Differ*. – 2018. – Vol. 25, N 4. – P. 721-734.

186. Mechanisms of vascular endothelial cell injury in response to intermittent and/or continuous hypoxia exposure and protective effects of anti-inflammatory and anti-oxidant agents / F. Xiao, X. Li, J. Wang, J. Cao. – Text : visual // *Sleep Breath*. – 2019. – Vol. 23, N 2. – P. 515-522.

187. Mehrbod, P. The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections / P. Mehrbod, S.R. Ande, J. Alizadeh. – Text : visual // *Virulence*. – 2019. – Vol. 10, N 1. – P. 376-413.

188. Melatonin and vitamin E alleviate homocysteine-induced oxidative injury and apoptosis in endothelial cells / G. Aykutoglu, M. Tartik, E. Darendelioglu [et al.]. – Text : visual // *Mol Biol Rep*. – 2020. – Vol. 47, N 7. – P. 5285-5293.

189. Mercer, J. The role of p53 in atherosclerosis / J. Mercer, M. Bennett. – Text : visual // *Cell Cycle*. – 2006. – Vol. 5, N 17. – P. 1907-1909.
190. MiR-140-3p is Involved in In-Stent Restenosis by Targeting C-Myb and BCL-2 in Peripheral Artery Disease / R. Zheng, H. Qiong, W. Wei-Bin [et al.]. – Text : visual // *J Atheroscler Thromb*. – 2018. – Vol. 25. – P. 1168-1181.
191. MiR-21 regulates the apoptosis of keloid fibroblasts by caspase-8 and the mitochondria-mediated apoptotic signaling pathway via targeting FasL / Y. Liu, L. Ren, W. Liu [et al.]. – Text : visual // *Biochem Cell Biol*. – 2018. – Vol. 96. – P. 548-555.
192. MiR-93 regulates vascular smooth muscle cell proliferation, and neointimal formation through targeting Mfn2 / S. Feng, L. Gao, D. Zhang [et al.]. – Text : visual // *Int J Biol Sci*. – 2019. – Vol. 15, N 12. – P. 2615-2626.
193. Modulation by alpha- and gamma-tocopherol and oxidized low-density lipoprotein of apoptotic signaling in human coronary smooth muscle cells / F. de Nigris, F. Franconi, I. Maida [et al.]. – Text : visual // *Biochem Pharmacol*. – 2000. – Vol. 59, N 11. – P. 1477- 1487.
194. Modulation of Adhesion Process, E-Selectin and VEGF Production by Anthocyanins and Their Metabolites in an in vitro Model of Atherosclerosis / M. Marino, C. Del Bo', M. Tucci [et al.]. – Text : visual // *Nutrients*. – 2020. – Vol. 12, N 3. – P. 655.
195. Molecular machinery and interplay of apoptosis and autophagy in coronary heart disease / Y. Dong, H. Chen, J. Gao [et al.]. – Text : visual // *J Mol Cell Cardiol*. – 2019. – Vol. 136. – P. 27-41.
196. Multinucleated variant endothelial cells (MVECs) of human aorta: expression of tumor suppressor gene p53 and relationship to atherosclerosis and aging. Endothelium / T. Satoh, E. Sasatomi, F. Yamasaki [et. al]. – Text : visual // *Endothelium*. –1998. – Vol. 6, N 2. – P. 123-132.
197. Narasimhalu, K. Elevated platelet-derived growth factor AB/BB is associated with a lower risk of recurrent vascular events in stroke patients / K. Narasimhalu, L. Ma, DA. De Silva. – Text : visual // *Int J Stroke*. – 2015. – Vol. 10, N 1. – P. 85–89.

198. NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability / J.L. Martín-Ventura, L.M. Blanco-Colio, B. Muñoz-García [et al.]. – Text : visual // *Stroke*. – 2004. – Vol. 35, N 2. – P. 458-463.

199. NF-kappaB-mediated nitric oxide production and activation of caspase-3 cause retinal ganglion cell death in the hypoxic neonatal retina / G. Rathnasamy, V. Sivakumar, P. Rangarajan [et al.]. – Text : visual // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2014. – Vol. 55, N 9. – P. 5878-5889.

200. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis / H.T. Chung, H.O. Pae, B.M. Choi [et al.]. – Text : visual // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2001. – Vol. 282, N 5. – P. 1075-1079.

201. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator / B.M. Choi, H.O. Pae, S.I. Jang [et al.]. – Text : visual // *J Biochem Mol Biol*. – 2002. – Vol. 31, N 35. – P. 116–126.

202. Nitric oxide induces apoptosis in human gingival fibroblast through mitochondria-dependent pathway and JNK activation / M.W. Baek, K.J. Seong, Y.J. Jeong [et al.]. – Text : visual // *Int. Endod*. – 2015. – Vol. 48. – P. 287-97.

203. Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle / K. Fukuo, S. Hata, T. Suhara, [et al.]. – Text : visual // *Hypertension*. – 1996. – Vol. 27. – P. 823-826.

204. Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome C, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells / I.H. Chae, K.W. Park, H.S. Kim [et al.]. – Text : visual // *Clin Chim Acta*. – 2004. – Vol. 341. – P. 83-91.

205. Nitric oxide-mediated expression of Bcl-2 and Bcl-xl and protection from tumor necrosis factor- α -mediated apoptosis in porcine endothelial cells after exposure to low concentrations of xenoreactive natural antibody / A. Delikouras, M. Hayes, P. Malde [et al.]. – Text : visual // *Transplantation*. – 2001. – Vol. 71. – P.599-605.

206. Nitric oxide-mediated pathways and its role in the degenerative diseases / N. Zhang, Y. Diao, R. Hua [et al.]. – Text : visual // *Front Biosci (Landmark Ed)*. – 2017. – Vol. 22. – P. 824–834.

207. Nitric Oxide-Producing Cardiovascular Stent Coatings for Prevention of Thrombosis and Restenosis. / J. Rao, H. Pan Bei, Y. Yang, [et al.]. – Text : visual // *Front Bioeng Biotechnol*. – 2020. – Vol. 8. – P. 578.

208. Obeng, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals – A review. / E. Obeng. – Text : visual // *Braz J Biol*. – 2021. – Vol. 81, N 4. – P. 1133-1143.

209. Outcomes after first-time lower extremity revascularization for chronic limb-threatening ischemia in insulin-dependent diabetic patients / J.D. Darling, T.F.X. O'Donnell, S.E. Deery [et al.]. – Text : visual // *J Vasc Surg*. – 2018. – Vol. 68, N 5. – P. 1455–1464.

210. Oxidative stress induces early-onset apoptosis of vascular smooth muscle cells and neointima formation in response to injury / C. Gomez, L. Martinez, A. Mesa [et al.]. – Text : visual // *Biosci Rep*. – 2015. – P. 35:e00227.

211. Oxidised LDL (OxLDL) induces production of platelet derived growth factor AA (PDGF AA) from aortic smooth muscle cells / A. Cucina, S. Pagliei, V. Borrelli [et al.]. – Text : visual // *Eur J Vasc Endovasc Surg*. – 1998. – Vol. 16, N 3. – P. 197–202.

212. p53 gene transfer to the injured rat carotid artery decreases neointimal formation / M. Scheinman, E. Ascher, G.S. Levi [et al.]. – Text : visual // *J Vasc Surg*. – 1999. – Vol. 29, N 2. – P. 360–369.

213. Paek, S.C. Effects of platelet-derived growth factor-BB on cellular morphology and cellular viability of stem cell spheroids composed of bone-marrow-derived stem cells / S.C. Paek, S.K. Min, J.B. Park. – Text : visual // *Biomed Rep*. – 2020. – Vol. 13, N 6. – P. 59.

214. PDGF receptor mutations in human diseases / E. Guérit, F. Arts, G. Dachy [et al.]. – Text : visual // *Cell Mol Life Sci*. – 2021. – Vol. 78, N 8. – P. 3867-3881.

215. PDGF–C and –D and their receptors PDGFR-alpha and PDGFR-beta in atherosclerotic human arteries / H. Karvinen, J. Rutanen, O. Leppänen [et al.]. – Text : visual // *Eur J Clin Invest.* – 2009. – Vol 39, N 4. – P. 320–327.

216. PDGF-induced Akt phosphorylation does not activate NF-kappa B in human vascular smooth muscle cells and fibroblasts / B.H. Rauch, A. Weber, M. Braun [et al.]. – Text : visual // *FEBS Lett.* – 2020. – Vol. 481. – P. 3-7.

217. Pérez-Garijo, A. When dying is not the end: Apoptotic caspases as drivers of proliferation / A. Pérez-Garijo. – Text : visual // *Semin Cell Dev Biol.* – 2018. – Vol. 82. – P. 86-95.

218. Perigraft adventitia and intima remodeling after synthetic patch implantation in sheep carotid artery: role of apoptosis and proliferation / P. Huang, W.J. Hawthorne, P. Ao [et al.]. – Text : visual // *J Vasc Surg.* – 2002. – Vol. 36, N 2. – P. 371-378.

219. Perioperative Vitamin C and E levels in Cardiac Surgery Patients and Their Clinical Significance / A. Hill, C. Borgs, C. Fitzner [et al.]. – Text : visual // *Nutrients.* – 2019. – Vol. 11, N 9. – P. 21-57.

220. Perioperative Vitamin C and E levels in Cardiac Surgery Patients and Their Clinical Significance / A. Hill, C. Borgs, C. Fitzner, C. Stoppe. – Text : visual // *Nutrients.* – 2019. – Vol. 11, N 9. – P. 2157.

221. Peripheral vascular disease assessment in the lower limb: a review of current and emerging non-invasive diagnostic methods / E. Shabani Varaki, G.D. Gargiulo, S. Penkala [et al.]. – Text : visual // *Biomed Eng Online.* – 2018. – Vol. 17, N 1. – P. 61.

222. Physiological Roles of Red Carrot Methanolic Extract and Vitamin E to Abrogate Cadmium-Induced Oxidative Challenge and Apoptosis in Rat Testes: Involvement of the Bax/Bcl-2 Ratio / A. Abdel-Wahab, K.M.A. Hassanin, A.A. Mahmoud [et al.]. – Text : visual // *Antioxidants (Basel).* – 2021. – Vol. 10, N 11. – P. 1653.

223. Platelet-derived growth factor BB-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation causes cell growth, but not apoptosis, in vascular smooth muscle cells

/ H. Yamaguchi, M. Igarashi, A. Hirata [et al.]. – Text : visual // *Endocr J.* – 2001. – Vol. 48, N 4. – P. 433–442.

224. Platelet-derived growth factor in a chemotractant for vascular smooth muscle cells / G.R. Grotenderst, T. Chang, H.E.J. Seppa [et al.]. – Text : visual // *J Cell Physiol.* – 1982. – Vol. 113. – P. 261–266.

225. Platelet-derived growth factor receptor inhibition reduces allograft arteriosclerosis of heart and aorta in cholesterol-fed rabbits / R.K. Sihvola, J.M. Tikkanen, R. Krebs [et al.]. – Text : visual // *Transplantation.* – 2003. – Vol. 75, N 3. – P. 334–339.

226. Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells / T. Marumo, V.B. Schini-Kerth, B. Fisslthaler [et al.]. – Text : visual // *Circulation.* – 1997, – Vol. 96, N 7. – P. 2361-2367.

227. Pleiotropic neuroprotective and metabolic effects of Actovegin's mode of action / F. Machicao, D.F. Muresanu, H. Hundsberger [et al.]. – Text : visual // *J Neurol Sci.* – 2012. – Vol. 322, N 1-2. – P. 222-227.

228. Pollman, M.J. Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury. Influence of redox state and cell phenotype / M.J. Pollman, J.L. Hall, G.H. Gibbons. – Text : visual // *Circ Res.* – 1999. – Vol. 84, N 1. – P. 113–121.

229. 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.

230. Probucol promotes high glucose-induced proliferation and inhibits apoptosis by reducing reactive oxygen species generation in Müller cells / X. Zhou, S. Ai, Z. Chen, C. Li. – Text : visual // *Int Ophthalmol.* – 2019. – Vol. 39, N 12. – P. 2833–2842.

231. Ranard, K.M. α -Tocopherol, but Not γ -Tocopherol, Attenuates the Expression of Selective Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced Genes in Primary

Human Aortic Cell Lines / K.M. Ranard, M.J. Kuchan, J.W. Erdman. – Text : visual // Lipids. – 2019. – Vol. 54, N 5. – P. 289-299.

232. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage / K. Jakubczyk, K. Dec, J. Kałduńska [et al.]. – Text : visual // Pol Merkur Lekarski. – 2020. – Vol. 48, N 284. – P. 124-127.

233. Rho-kinase Inhibition Reduces Neointima Formation After Vascular Injury by Enhancing Bax Expression and Apoptosis / R. Shibata H. Kai, Y. Seki [et al.]. – Text : visual // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 2003. – Vol. 42. – P. 43–47.

234. Risk Factors for Restenosis after Drug-coated Balloon Angioplasty for Complex Femoropopliteal Arterial Occlusive Disease / J.W. Roh, Y.G. Ko, C.M. Ahn [et al.]. – Text : visual // Ann Vasc Surg. – 2019. – Vol. 55. – P. 45-54.

235. Role of oxidative stress in the process of vascular remodeling following coronary revascularization / G. Gallo, G. Pierelli, M. Forte [et al.]. – Text : visual // Int J Cardiol. – 2018. – Vol. 268. – P. 27-33.

236. Role of Smooth Muscle Cells in Vascular Calcification: Implications in Atherosclerosis and Arterial Stiffness / A.L. Durham., M.Y. Speer, M. Scatena [et al.]. – Text : visual // Cardiovasc Res. – 2018. – Vol. 114, N 4. – P. 590-600.

237. Roles of platelet-derived growth factor in vascular calcification / L. Ouyang, K. Zhang, J. Chen [et al.]. – Text : visual // J Cell Physiol. – 2018. – Vol. 233, N 4. – P. 2804-2814.

238. Rutherford, C. Substantial inhibition of neointimal response to balloon injury in the rat carotid artery using a combination of antibodies to platelet-derived growth factor-BB and basic fibroblast growth factor / C. Rutherford, W. Martin, M. Salame. – Text : visual // Atherosclerosis. – 1997. – Vol. 130, N 1-2. – P. 45–51.

239. Rymer, J.A. Femoropopliteal In-Stent Restenosis / J.A. Rymer, W.S. Jones. – Text : visual // Circ Cardiovasc Interv. – 2018. – Vol. 11, N 12. – P. e007559.

240. Sata, M. Acute and chronic smooth muscle cell apoptosis after mechanical vascular injury can occur independently of the Fas-death pathway / M. Sata, S. Sugiura, M. Yoshizumi. – Text : visual // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2001. – Vol. 21, N 11. – P. 1733-1737.

241. Sata, M. Fas ligand gene transfer to the vessel wall inhibits neointima formation and overrides the adenovirus-mediated T cell response / M. Sata, H. Perlman, D.A. Muruve. – Text : visual // Proc Natl AcadSci USA. – 1998. – Vol. 95, N 3. – P. 1213-1217.

242. Schürch, K.A. Update über die aktuelle Diagnostik und Therapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) / K.A. Schürch, S. Sixt, C. Jeanneret. – Text : visual // Ther Umsch. – 2018. – Bd. 75, N 8. – S. 478–488.

243. Seimon, T. Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis / T. Seimon, I. Tabas. – Text : visual // J Lipid Res. – 2009. – Vol. 50. – P. 382-387.

244. Shafi, O. Switching of vascular cells towards atherogenesis, and other factors contributing to atherosclerosis: a systematic review / O. Shafi. – Text : visual // Thromb J. – 2020. – Vol. 18. – P. 28.

245. Shashar, M. Vascular Endothelial Growth Factor Augments Arginine Transport and Nitric Oxide Generation via a KDR Receptor Signaling Pathway / M. Shashar, T. Tchernichovsky, O. Pasvolsky [et al.]. – Text : visual // Kidney Blood Press Res. – 2017. – Vol. 42, N 2. – P. 201–208.

246. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells / S. Dimmeler, J. Haendeler, V. Rippmann [et al.]. – Text : visual // Rippmann, FEBS Lett. – 1996. – Vol. 399, N 1-2. – P. 71-74.

247. Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor receptor -1:a dual regulator for angiogenesis // M. Shibuya. – Text : visual // Angiogenesis. – 2006. – Vol. 9. – P. 225-230.

248. Simple classification and clinical outcomes of angiographic dissection after balloon angioplasty for femoropopliteal disease / N. Kobayashi, K. Hirano, M. Yamawaki [et al.]. – Text : visual // J Vasc Surg. – 2018. – Vol. 67, N 4. – P. 1151–1158.

249. S-nitrosylation of the death receptor Fas promotes Fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells / L. Leon-Bollotte, S. Subramaniam, O. Cauvard [et al.]. – Text : visual // Gastroenterology. – 2011. – Vol. 140, N 7. – P. 1-4.

250. Statins, Bcl-2, and apoptosis: cell death or cell protection? / W.G. Wood, U. Igbavboa, W.E. Muller [et. al]. – Text : visual // *Mol Neurobiol.* – 2013. – Vol. 48, N 2. – P. 308-314.

251. Sterpetti, A.V. Growth factors and experimental arterial grafts. / A.V. Sterpetti, S. Lepidi, V. Borrelli. – Text : visual // *J Vasc Surg.* – 2016. – Vol. 64, N 5. – P. 1444–1449.

252. Stoneman, V.E. Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications / V.E. Stoneman, M.R. Bennett. – Text : visual // *Clin Sci (Lond).* – 2004. – Vol. 107, N 4. – P. 343–354.

253. Structural Basis for Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Activation and Implications for Disease Therapy / F. Shaik, G.A. Cuthbert, S. Homer-Vanniasinkam [et al.]. – Text : visual // *Biomolecules.* – 2020. – Vol. 10, N 12. – P. 1673.

254. Tanaka, K. Effects of human cytomegalovirus immediate-early proteins on p53-mediated apoptosis in coronary artery smooth muscle cells / K. Tanaka, J.P. Zou, K. Takeda. – Text : visual // *Circulation.* – 1999. – Vol. 99. – P. 1656-1659.

255. Tawakol, A. Imaging Apoptosis in Atherosclerosis: From Cell Death, A Ray of Light / A. Tawakol, S. Abohashem, H. Zureigat. – Text : visual // *J Am Coll Cardiol.* – 2020. – Vol 76, N 16. – P. 1875-1877.

256. Tempol therapy attenuates medial smooth muscle cell apoptosis and neointima formation after balloon catheter injury in carotid artery of diabetic rats / D.K. Jagadeesha, T.E. Lindley, J. Deleon [et al.]. – Text : visual // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2005. – Vol. 289, N 3. – P. 1047-1053.

257. Tenopoulou, M. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism / M. Tenopoulou, P.T. Doulias. – Text : visual // *F1000 Research.* – 2020. – N 9. – P. 1190.

258. Tepe, G. Drug-coated balloon versus standard percutaneous transluminal angioplasty for the treatment of superficial femoral and popliteal peripheral artery disease: 12-month results from the IN PACT SFA randomized trial. / G. Tepe, J. Laird, P. Schneider. – Text : visual // *Circulation.* – 2015. – Vol. 131, N 5. – P. 495–502.

259. The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo / N.V. Guevara, H.S. Kim, E.I. Antonova [et al.]. – Text : visual // *Nat Med.* – 1999. – Vol 5, N 3. – P. 335-339.

260. The circulating vascular endothelial growth factor is only marginally associated with an increased risk for atherosclerosis / N. Pauli, A. Kuligowska, A. Krzystolik [et al.]. – Text : visual // *Minerva Cardioangiol.* – 2020. – Vol. 68, N 4. – P. 332-338.

261. The Extracellular Matrix Signature in Vein Graft Disease / B. Kahle, C. Schmidtke, N. Hunzelmann [et al.]. – Text : visual // *Can J Cardiol.* – 2016. – Vol. 32, N 8. – P. 1008.e11-7.

262. The prevalence of polyvascular disease in patients with carotid artery disease and peripheral artery disease / H.D. Vlajinac, J.M. Marinković, M.Z. Maksimović [et.al.]. – Text : visual // *Kardio Pol.* – 2019. – Vol. 77, N 10. – P. 926-934.

263. The prevention of restenosis in vivo with a VEGF gene and paclitaxel co-eluting stent / J. Yang, Y. Zeng, C. Zhang [et al.]. – Text : visual // *Biomaterials.* – 2013. – Vol. 34, N 6. – P. 1635-43.

264. The relationship of serum soluble FAS ligand (sFasL) level with the extent of coronary artery disease / A. Sahinarslan, B. Boyaci, S.A. Kocaman [et al.]. – Text : visual // *Int J Angiol.* – 2012. – Vol. 21, N 1. – P. 29–34.

265. The role of Fas/APO 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions / W. Cai, B. Devaux, W. Schaper [et al.]. – Text : visual // *Atherosclerosis.* – 1997. – Vol. 131, N 2. – P. 177–186.

266. Therapeutic Options for In-Stent Restenosis / C. Nicolais, V. Lakhter, H.U.H. Virk [et al.]. – Text : visual // *Virk Curr Cardiol Rep.* – 2018. – Vol. 20, N 2. – P. 1-7.

267. Thorp, E. The role of macrophages and dendritic cells in the clearance of apoptotic cells in advanced atherosclerosis / E. Thorp, M. Subramanian, I. Tabas. – Text : visual // *Eur J Immunol.* – 2011. – Vol. 41, N 9. – P. 2515-2518.

268. Three-Year Sustained Clinical Efficacy of Drug-Coated Balloon Angioplasty in a Real-World Femoropopliteal Cohort / G. Torsello, K. Stavroulakis, M.

Brodmann [et al.]. – Text : visual // J Endovasc Ther. – 2020. – Vol. 27, N 5. – P. 693-705.

269. TP53 haplotype-based analysis and incidence of post-angioplasty restenosis / R.Y. Zee, N.R. Cook, C.A. Kim [et al.]. – Text : visual // Hum Genet. – 2004. – Vol. 114, N 4. – P. 386-390.

270. Transfection of antisense p53 tumor suppressor gene oligodeoxynucleotides into rat carotid artery results in abnormal growth of vascular smooth muscle cells / H. Matsushita, R. Morishita, M. Aoki [et al.]. – Text : visual // Circulation. – 2000. – Vol. 101, N 12. – P. 1447–1452.

271. Transfer of wild-type p53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo / Y. Yonemitsu, Y. Kaneda, S. Tanaka [et al.]. – Text : visual // Circ Res. – 1998. – Vol. 82, N 2. – P. 147–156.

272. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NF kappaB activation in primary hippocampal neurons / M. Tamatani, Y.H. Che, H. Matsuzaki [et al.]. – Text : visual // J Biol Chem. – 1999. – Vol. 274, N 13. – P. 8531-8538.

273. Tzovaras, A.A. Tumor Protein p53 Gene and Cardiovascular Disease. / A.A. Tzovaras, F. Gentimi, M. Nikolaou. – Text : visual // Angiology. – 2018. – Vol. 69, N 8. – P. 736-737.

274. Uemura, M. Alpha-tocopherol prevents apoptosis of vascular endothelial cells via a mechanism exceeding that of mere antioxidation / M. Uemura, H. Manabe, N. Yoshida. – Text : visual // Eur J Pharmacol. – 2002. – Vol. 456. – P. 29-37.

275. Update on the Role of Actovegin in Musculoskeletal Medicine: A Review of the Past 10 Years / J. Brock, D. Golding, P.M. Smith [et al.]. – Text : visual // Clin J Sport Med. – 2020. – Vol. 30, N 1. – P. 83-90.

276. Upregulation of miR-200c-3p induced by NaF promotes endothelial apoptosis by activating Fas pathway / Y. Jiang, Y. Yang, C. Zhang [et al.]. – Text : visual // Environ Pollut. – 2020. – Vol. 266, N 1. – P. 11-17.

277. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1, in the plasma of patients with coronary or peripheral atherosclerosis, or Type II diabetes / A.D. Blann,

F.M. Belgore, C.N. McCollum [et al.]. – Text : visual // Clin Sci (Lond). – 2002. – Vol. 102, N 2. – P. 187-194.

278. Vascular endothelial growth factor enhancer atherosclerotic plaque progression / F.L. Celletti, J.M. Waugh, Ph.G. Amabile [et al.]. – Text : visual // N. Med. – 2001. – Vol. 7. – P. 425-429.

279. Vascular endothelial growth factor regulates reendothelialization and neointima formation in a mouse model of arterial injury / R. Hutter, F.E. Carrick, C. Valdiviezo [et al.]. – Text : visual // Circulation. – 2004. – Vol. 10, N 16. – P. 2430-2435.

280. Vascular Positron Emission Tomography and Restenosis in Symptomatic Peripheral Arterial Disease: A Prospective Clinical Study / M.M. Chowdhury, J.M. Tarkin, M.S. Albaghdadi [et al.]. – Text : visual // Albaghdadi JACC Cardiovasc Imaging. – 2020. – Vol. 13, N 4. – P. 1008-1017.

281. Vascular Smooth Muscle Cell Death, Autophagy and Senescence in Atherosclerosis / M.O.J. Grootaert, M. Moulis, L. Roth [et al.]. – Text : visual // Cardiovasc Res. – 2018. – Vol. 114, N 4. – P. 622-634.

282. VEGF-A, VEGF-D and VEGF-D (DeltaNDeltaC) induced intimal hyperplasia in carotid arteries / S. Bhardwaj, H. Roy, T. Heikura [et al.]. – Text : visual // Eur J Clin Invest. – 2005. – Vol. 35, N 11. – P. 669-676.

283. Vitamin E administration improves impairment of endothelium-dependent vasodilation in patients with coronary spastic angina / T. Motoyama, H. Kawano, K. Kugiyama [et al.]. – Text : visual // J Am Coll Cardiol. – 1998. – Vol. 32, N 6. – P. 1672-1679.

284. Vitamin E analogues inhibit angiogenesis by selective induction of apoptosis in proliferating endothelial cells: the role of oxidative stress. Cancer Res. / L.F. Dong, E. Swettenham, J. Eliasson [et al.]. – Text: visual // – 2007. – Vol. 67, N 24. – P. 11906-11913.

285. Vitamin E inhibits CD95 ligand expression and protects T cells from activation-induced cell death / M. Li-Weber, M.A. Weigand, M. Giaisi [et al.]. – Text : visual // J Clin Invest. – 2002. – Vol. 110, N 5. – P. 681-690.

286. Vitamin E protects against gabapentin-induced chronic hepatic and renal damage associated with the inhibition of apoptosis and tissue injury in rats / N.N. Welson, R.R. Rofaeil, S.M. Ahmed [et al.]. – Text : visual // Life Sci. – 2021. – Vol. 267. – P. 118940.

287. Vladimirskaya, T.E. Sootnoshenie eksperessii belkov BCL-2 b BAX v stenke koronarnykh arteriy, porazhennykh aterosklerozom. / T.E. Vladimirskaya – Text : visual // Izvestiya natsional'noy akademii nauk Belarusii. – 2015. – Vol. 4, – P. 51-55.

288. Walsh, K. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture / K. Walsh, R.C. Smith, H.S. Kim. – Text : visual // Circ Res. – 2000. – Vol. 87, N 3. – P. 184-188.

289. Wu, J. R. Activation of endothelial NO synthase by a xanthine derivative ameliorates hypoxia-induced apoptosis in endothelial progenitor cells / J.R. Wu. – Text : visual // J Pharm Pharmacol. – 2016. – Vol. 68, N 6. – P. 810-818.

290. Xu, X. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials / X. Xu, Y. Lai, Z.C. Hua. – Text : visual // Biosci Rep. – 2019. – Vol. 39, N 1. – P. BSR20180992.

291. Yang, Z.L. Nitric oxide / Z.L. Yang, Q. Zhao, Q. He. – Text : visual // Med Gas Res. – 2019. – Vol. 9, N 4. – P. 170.

292. Yin, J. Inverse Relationship between Serum VEGF Levels and Late In-Stent Restenosis of Drug-Eluting Stents / J. Yin, L. Shen, M. Ji. – Text : visual // Biomed Res Int. – 2017. – 8730271.

293. Zhang, L. LncRNA RP11-400K9.4 Aggravates Cardiomyocytes Apoptosis After Hypoxia/Reperfusion Injury by Targeting miR-423 / L. Zhang, C. Yang. – Text : visual // Qiu. Int Heart J. – 2021. – Vol. 62, N 5. – P. 1124-1134.

294. Zingg, J.M. Vitamin E: Regulatory Role on Signal Transduction / J.M. Zingg. – Text: visual // IUBMB Life. – 2019. – Vol. 71, N 4. – P. 456-478.

295. α -Tocopherol, especially α -tocopherol phosphate, exerts antiapoptotic and angiogenic effects on rat bone marrow-derived endothelial progenitor cells under high-glucose and hypoxia conditions / Z. Wu, X. Zheng, L. Meng [et al.]. – Text : visual // J Vasc Surg. – 2018. – Vol. 67, N 4. – P. 1263-1273.

296. δ -Tocopherol prevents methylglyoxal-induced apoptosis by reducing ROS generation and inhibiting apoptotic signaling cascades in human umbilical vein endothelial cells / Mh. Do, Sn. Kim, S.Y. Seo [et al.]. – Text : visual // Food Funct. – 2015. – Vol. 6, N 5. – P. 1568-1577.