

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КОМПЛЕКСНЫХ ПРОБЛЕМ
СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ»

УДК 616-018, 616.13-089

№ госрегистрации

121100700026-0

от 07.10.2021

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт

комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»

академик РАН, профессор, д.м.н.

О.Л. Барбараш



«*Барбараш*» _____ 2023 г.

**ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ**

Разработка новых фармакологических подходов
к экспериментальной терапии атеросклероза и комплексных цифровых решений
на основе искусственного интеллекта для автоматизированной диагностики
патологий системы кровообращения и определения риска летального исхода
(промежуточный)

Шифр темы № 0419-2021-0001

Руководитель НИР, к.м.н.

А.Г. Кутихин

Кемерово-2023

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы:

канд. мед. наук



А.Г. Кутихин

Ответственные исполнители:

канд. биол. наук



Р.А. Мухамадияров

канд. техн. наук



Е.А. Овчаренко

канд. биол. наук



Д.К. Шишкова

канд. мед. наук



К.Ю. Клышников

мл. науч. сотр.



Л.А. Богданов

мл. науч. сотр.



П.С. Онищенко

мл. науч. сотр.



В.Е. Маркова

мл. науч. сотр.



А.Ю. Канонькина

мл. науч. сотр.



А.И. Лазебная

мл. науч. сотр.



В.А. Кошелев

РЕФЕРАТ

Отчет изложен на 93 страницах, содержит 14 рисунков, 7 таблиц, 111 источников литературы.

Ключевые слова: атеросклероз, доклинические испытания, экспериментальная терапия, ультраструктурная патология, трансляционная медицина, искусственный интеллект, большие данные, цифровая патология, машинное обучение, нейронные сети.

Объекты исследования

- биологические ткани (брюшная аорта ApoE-нокаутных мышей, большая подкожная вена человека, полученная в процессе коронарного шунтирования);
- лабораторные животные (ApoE-нокаутные мыши);
- первичные коммерческие культуры эндотелиальных клеток коронарной артерии, внутренней грудной артерии и большой подкожной вены человека.

Цель исследования: разработать новые фармакологические подходы к экспериментальной терапии атеросклероза и линейку комплексных цифровых решений на основе искусственного интеллекта для автоматизированной диагностики патологий системы кровообращения и персонифицированного определения риска летального исхода.

Задачи исследования

1. Провести доклинические испытания и апробацию новых подходов к экспериментальной терапии атеросклероза посредством коррекции нарушений минерального гомеостаза.
2. Используя технологии искусственных нейронных сетей, сконструировать инструменты автоматизированного прогнозирования риска летального исхода у пациентов с тяжелым течением COVID-19.

Методы исследования

1. Рандомизация и экспериментальная терапия ApoE-нокаутных мышей (добавление тестируемых препаратов в их воду).
2. Выведение ApoE-нокаутных мышей из эксперимента с иссечением аорты на всем ее протяжении (включая дугу и бифуркацию аорты) и забором сыворотки их крови для биохимического анализа параметров минерального гомеостаза (измерение молярной концентрации общего и ионизированного кальция, молярной концентрации магния, молярной концентрации неорганического фосфора, концентрации общего белка, концентрации альбумина) и иных параметров системного гомеостаза.
3. Получение сегментов большой подкожной вены человека при выполнении коронарного шунтирования.
4. Моментальная криоконсервация брюшных аорт ApoE-нокаутных мышей и большой подкожной вены человека в металлических формах при внешнем воздействии жидкого азота.
5. Серийная криотомная резка брюшных аорт ApoE-нокаутных мышей и большой подкожной вены человека.
6. Окрашивание срезов брюшной аорты липофильным красителем Oil Red O и кальцитропным красителем ализариновым красным (Alizarin Red S).
7. Продольное рассечение извлеченных аорт ApoE-нокаутных мышей и окрашивание цельных рассеченных аорт липофильным красителем Oil Red O по принципу *en face* (интимой вверх).
8. Иммуногистохимическое и иммунофлюоресцентное окрашивание срезов большой подкожной вены человека.
9. Световая, эпифлюоресцентная и конфокальная микроскопия.
10. Культивирование первичных коммерческих культур эндотелиальных клеток коронарной артерии человека, внутренней грудной артерии человека и большой подкожной вены человека.
11. Выделение РНК.
12. Выделение белка.

13. Спектрофотометрия.
14. Обратная транскрипция.
15. Измерение генной экспрессии методом количественной полимеразной цепной реакции.
16. Измерение белковой экспрессии и оценка посттрансляционных модификаций белков методом иммуноблоттинга.
17. Классические методы статистического анализа.
18. Анализ историй болезни, составление регистровых массивов табличных данных.
19. Машинное обучение инструментов искусственного интеллекта (деревья решений, случайные леса, сверхслучайные деревья, нейронные сети, метод k-ближайших соседей, алгоритмы градиентного бустинга: XGBoost, LightGBM, CatBoost).
20. Многофакторная логистическая регрессия.
21. Автоматическая генерация нейронных сетей при помощи соответствующего модуля программы STATISTICA, мануальный скрининг эффективности нейронных сетей.

Использованная аппаратура:

- операционный микрохирургический микроскоп (OPMI pico, Carl Zeiss)
- полуавтоматические криотомы (Microm HM 525 и NX50, Thermo Scientific)
- прямой эпифлюоресцентный микроскоп (AxioImager.A1, Carl Zeiss)
- автоматизированный сканирующий микроскоп для лабораторных исследований (слайд-сканер) (Vision Slide Assist, West Medica)
- система двойной дистилляции (A4000, Antylia Scientific)
- CO₂-инкубаторы с кислородным редуктором для культивирования клеток (MCO-18AIC, RHCbi)
- бокс микробиологической безопасности (БМБ-II-"Ламинар-С"-1,8 NEOTERIC, II класс защиты, тип A2, Ламинарные системы)
- инвертированный эпифлюоресцентный микроскоп AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss)

- конфокальный лазерный сканирующий микроскоп (LSM700, Carl Zeiss)
- центрифуга с охлаждением (Microfuge 20R, Beckman Coulter)
- микропланшетный спектрофотометр (Multiskan Sky, Thermo Scientific)
- спектрофотометр для измерения концентраций веществ в микрообъемах (NanoDrop 2000 UV-Vis, Thermo Scientific)
- ПЦР-боксы (UVC/T-M-AR, BioSan)
- амплификаторы для проведения ПЦР с флюоресцентной схемой детекции результата в режиме реального времени (CFX96 Touch, Bio-Rad; ViiA7, Applied Biosystems)
- камеры для проведения вертикального электрофореза (XCell SureLock Mini-Cell, Invitrogen)
- источник питания (PowerEase 90W Power Supply, Invitrogen)
- система для сухого переноса белка при блоттинге (iBlot 2, Invitrogen)
- система для гибридизации блотов (iBind Flex, Invitrogen)
- цифровой сканер хемилюминесцентных блотов (C-DiGit, LI-COR Biosciences)
- цифровой сканер хемилюминесцентных и флюоресцентных блотов (Odyssey XF, LI-COR Biosciences)

Полученные результаты и научная новизна

Проведена первая очередь доклинических испытаний препаратов для коррекции нарушений минерального гомеостаза. Показано, что пероральный прием цитрата магния (комбинированного хелатного соединения и донора ионов магния) на протяжении 6 месяцев снижает уровень общего и ионизированного кальция в пределах физиологической нормы, а также незначительно уменьшает индекс атерогенности липидов у ApoE-нокаутных мышей, с рождения склонных к развитию атеросклероза. В настоящее время проводится вторая очередь доклинических испытаний, направленная на оценку потенциала двух препаратов для профилактики атеросклероза.

Выполнено первое в России трехцентровое исследование факторов риска смерти при COVID-19 вне зависимости от пола и возраста, поставившее задачу

разработать инструменты искусственного интеллекта для прогнозирования риска летального исхода в отделении реанимации и интенсивной терапии у пациентов с тяжелым течением COVID-19. Определено четыре независимых от пола и возраста параметра, определяющих риск смерти (наличие в анамнезе ишемической болезни сердца или хронической сердечной недостаточности, хронической болезни почек, концентрация С-реактивного белка, уровень мочевины в сыворотке крови). Разработаны нейронные сети с точностью прогнозирования 87%. В настоящее время проводится ретроспективный набор сплошной выборки пациентов с COVID-19 с целью независимой внешней апробации разработанного ансамбля нейронных сетей и внедрения данной системы поддержки принятия решений в клиническую практику.

Показано, что в сравнении с маркерами эндотелиальных клеток (CD31 и VE-кадгерин) маркеры сосудистых гладкомышечных клеток (SM-MHC и α -SMA) позволяли осуществлять объективную визуализацию и оценку сосудистой геометрии и обеспечивали максимальное соотношение «сигнал-шум» независимо от вида маркера, типа сосуда или антитела. Аутофлюоресценция и специфичный гистологический паттерн эластических мембран в ходе пентахромного окрашивания по Мовату позволяли дифференцировать артериолы от остальных сосудов микроциркуляторного русла. Несмотря на то, что иммуноокрашивание аорт крыс показало специфичные маркеры венозного (KLF2 и PROX1) и капиллярного (HEY1) эндотелия, данные находки не нашли подтверждения при иммуноокрашивании большой подкожной вены человека. Таким образом, специфичных маркеров венул и капилляров в тканях взрослого человека идентифицировано не было, несмотря на анализ широкой палитры классических маркеров различных эндотелиальных дифференцировочных факторов. Отсутствие специфичных маркеров дифференцировки микрососудов (в частности, *vasa vasorum*) позволяет предположить пентахромное окрашивание по Мовату, дифференцирующее артериолы от венул и капилляров за счет контрастирования внутренней эластической мембраны, в качестве оптимальной опции для машинного обучения нейронных сетей с целью анализа сосудов микроциркуляторного русла.

Продемонстрировано, что спонтанный эндотелиально-мезенхимальный переход первичных эндотелиальных клеток пупочной вены человека характеризуется многократным повышением уровня экспрессии генов транскрипционных факторов *SNAI2* и *TWIST1*, полной потерей экспрессии маркеров и транскрипционных факторов эндотелиальной дифференцировки (CD31/PECAM1, VE-кадгерина, транскрипционного фактора ERG), ярко выраженной экспрессией генов маркеров мезенхимальной дифференцировки (фибробласт-специфичного белка и альфа-актина гладких мышц) и выраженным синтезом основного компонента внеклеточного матрикса коллагена I типа. Оптимальным алгоритмом определения эндотелиально-мезенхимального перехода в экспериментах *in vitro* и *in situ* (в том числе при анализе функционального состояния эндотелия тканеинженерных медицинских изделий) является определение транскрипции генов эндотелиальной дифференцировки (*PECAM1*, *CDH5*, *VWF*, *ERG*), генов транскрипционных факторов *SNAI2* и *TWIST1*, генов мезенхимальной дифференцировки (*FAP*, *S100A4*, *ACTA2*) и генов маркеров активности синтеза компонентов внеклеточного матрикса (*COL1A1*, *COL1A2*) с последующей верификацией отрицательной экспрессии маркеров эндотелиального фенотипа и положительной экспрессии коллагена I типа внутри клеток посредством иммунофлюоресцентного окрашивания.

Степень внедрения

Разработанные протоколы окрашивания сосудов микроциркуляторного русла и оценки эндотелиально-мезенхимального перехода *in vitro* (в экспериментах на клеточных культурах) и *in situ* (в тканеинженерных медицинских изделиях) внедрены в научно-исследовательскую практику отдела экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

Область применения: гистология, патологическая анатомия, патологическая физиология, сосудистая биология, тканевая инженерия, кардиология, инфекционные болезни.

Экономическая эффективность

Проведение доклинических испытаний эффективности экспериментальной терапии по коррекции нарушений минерального гомеостаза в отношении профилактики атеросклероза позволит предложить исследуемые терапевтические режимы для первой фазы клинических испытаний. Первая очередь доклинических испытаний, проведенная в течение этого года, показала принципиальную эффективность такой терапии в отношении снижения уровня общего и ионизированного кальция в пределах физиологической нормы (то есть успешность таргетирования собственно факторов риска развития атеросклероза). В случае успешного проведения второй очереди доклинических испытаний (уменьшения липидного и кальциевого поражения аорты) справедливо будет говорить о потенциальном вкладе данных терапевтических режимов в профилактику атеросклероза, что будет иметь прямую экономическую эффективность в отношении продолжительности и качества жизни населения.

Использование разработанных инструментов искусственного интеллекта для прогнозирования риска летального исхода у пациентов с тяжелым течением COVID-19 при их поступлении или переводе в отделения реанимации и интенсивной терапии позволит моментально выделять группы высокого риска смерти и соответствующим образом модифицировать лечение таких пациентов, что, следуя принципам персонифицированной медицины, позволит сделать терапию высокоточной и уменьшить смертность пациентов с одновременной экономией медицинских ресурсов.

Внедрение разработанных протоколов окрашивания сосудов микроциркуляторного русла с использованием маркеров сосудистых гладкомышечных клеток позволит осуществлять объективную визуализацию и оценку сосудистой геометрии, а также машинное обучение нейронных сетей для

автоматизированного анализа состояния микроциркуляторного русла в экспериментальной патологии (животные модели) и прототипах тканеинженерных медицинских изделий нового поколения. Это позволит сократить временные и финансовые затраты на их разработку, поскольку состояние микроциркуляторного русла является важным критерием активности воспалительного процесса после имплантации тканеинженерных медицинских изделий в организм лабораторных животных на стадии доклинических испытаний.

Применение оригинального алгоритма анализа эндотелиально-мезенхимального перехода в первую очередь позволит оценить релевантность данного патофизиологического феномена для тканеинженерных медицинских изделий после их имплантации в организм лабораторных животных (доклинические испытания) или человека (клинические испытания), а также своевременно анализировать пригодность культур первичных эндотелиальных клеток человека для заселения ими тканеинженерных медицинских изделий нового поколения (к примеру, биодеградируемых сосудистых протезов малого диаметра). Это предоставит возможность более точной оценки результатов имплантации медицинских изделий, а также контроля качества изготавливаемых персонафицированных сосудистых протезов малого диаметра. Таким образом, разработанный алгоритм оценки функционального состояния эндотелиальных клеток позволит усовершенствовать прототипы разрабатываемых тканеинженерных медицинских изделий нового поколения (с учетом необходимости поддержания гомеостатического состояния эндотелиального монослоя) и повысить эффективность доклинических и клинических испытаний персонафицированных сосудистых протезов малого диаметра, заселяемых культурами эндотелиальных клеток в биореакторе *in vitro*.

СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	12
НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ.....	13
ВВЕДЕНИЕ.....	14
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	
1. Пероральный прием цитрата магния позволяет снизить уровень общего и ионизированного кальция у ApoE-нокаутных мышей.....	22
2. Разработка инструментов искусственного интеллекта для оценки риска летального исхода при тяжелом течении COVID-19.....	29
3. Сократительные белки сосудистых гладкомышечных клеток являются универсальными маркерами сосудов микроциркуляторного русла.....	47
4. Анализ спонтанного эндотелиально-мезенхимального перехода в культуре первичных эндотелиальных клеток пупочной вены человека.....	62
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	73
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	75
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	92

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ApoE – аполиipoprotein E

α -SMA – альфа-актин гладких мышц

AUROC – площадь под ROC-кривой

bFGF – основной фактор роста фибробластов

COVID-19 – новая коронавирусная инфекция

CD – кластер дифференцировки

HIF-1 α – индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор

HCAEC – первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии человека

HITAEC – первичные эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии человека

HUVEC – первичные эндотелиальные клетки пупочной вены человека

LYVE1 – рецептор лимфатического эндотелия к гиалуроновой кислоте

PECAM1 – тромбоцитарно-эндотелиальная молекула клеточной адгезии

SM-MHC – тяжелые цепи миозина гладких мышц

VE-кадгерин – сосудистый эндотелиальный кадгерин

VEGF – фактор роста сосудистого эндотелия

VEGFR – рецептор к фактору роста сосудистого эндотелия

VV – *vasa vasorum*

vWF – фактор фон Виллебранда

БПВ – большая подкожная вена

ИИ – искусственный интеллект

МКИ – межквартильный интервал

МО – машинное обучение

ОТ-кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции

СГМК – сосудистые гладкомышечные клетки

ЭК – эндотелиальные клетки

ЭндоMT – эндотелиально-мезенхимальный переход

НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ:

1. МУ 1.3.1888-04 «Эпидемиология. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности.
2. МУ 11-16/03-06 «Методические указания по применению бактерицидных ламп для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещениях»
3. Р 3.5.1904-04 «Дезинфектология. Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях»
4. МУ 3.5.5. 1034-01 «Дезинфекционные средства и технологии. Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I-IV групп при работе методом ПЦР»
5. Приказ №267 МЗ РФ от 19.06.2003 г. «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных».
6. Все связанные с лабораторными животными процедуры, включая их содержание, выведение из эксперимента и забор образцов биоматериала, были одобрены Локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (протоколы № 06217-АФ и 2022/19/01, утверждены на заседании от 19.01.2022) и были выполнены в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986).
7. Все связанные с пациентами исследования, включая забор образцов биоматериала, были выполнены в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской Декларации. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (протокол № 2020/07/1, утвержден на заседании от 09.07.2020). До включения в исследование от всех пациентов было получено письменное информированное согласие.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на все предпринимаемые усилия по профилактике сердечно-сосудистых заболеваний, абсолютные показатели заболеваемости и смертности от них по-прежнему стабильно увеличиваются [1]. По данным глобального эпидемиологического исследования Global Burden of Disease (GBD 2019), в 2019 году в мире было зарегистрировано 523 миллиона пациентов с болезнями системы кровообращения и 18,6 миллиона сердечно-сосудистых смертей [1]. При этом доля смертей, связанных с атеросклерозом (от ишемической болезни сердца, ишемического инсульта и заболеваний периферических артерий), составила около 66% от общего числа сердечно-сосудистых смертей [2]. Растущая смертность от сердечно-сосудистых заболеваний в значительной степени обусловлена увеличением доли пациентов с сопутствующими патологиями (так называемый феномен коморбидности), то есть с сочетанием заболеваний нескольких органов или их систем [3–6]. Высокая распространенность коморбидности, в свою очередь, связана с увеличением как общей продолжительности жизни, так и непосредственно продолжительности жизни пациентов с болезнями системы кровообращения вследствие успехов современной кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии [3–6].

Одной из распространенных, но вместе с тем зачастую незаслуженно упускаемых сопутствующих патологий у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями являются нарушения минерального гомеостаза. В частности, повышение уровней ионизированного кальция и фосфора до «высоких нормальных» значений и тем более превышение их физиологической нормы прочно ассоциированы с высоким риском острых сердечно-сосудистых событий, хронической сердечной недостаточности и смерти от болезней системы кровообращения [7–15]. При этом «низкий нормальный» уровень ионов магния, являющегося физиологическим антагонистом кальция, также ассоциирован с повышенным риском неблагоприятных сердечно-сосудистых исходов и смерти от сердечно-сосудистых заболеваний [16–26]. Кроме того, последние крупные

эпидемиологические исследования и мета-анализы продемонстрировали, что, по аналогии с «высоким нормальным» уровнем кальция и фосфора, «низкий нормальный» уровень кальций-связывающих белков крови фетуина-А и альбумина ассоциирован с повышенным риском развития инфаркта миокарда, ишемического инсульта и сердечно-сосудистой смерти [27–32]. Кроме того, ранее нашей группой было показано, что пациенты с цереброваскулярной болезнью и ишемической болезнью сердца характеризуются сниженной концентрацией общего белка, кальций-связывающего белка альбумина и скевенджеров избыточных ионов кальция (кальципротеиновых частиц), что отражается повышением уровня ионизированного кальция в крови и ее повышенной склонностью к преципитации кальципротеиновых частиц в условиях минерального стресса [33]. С учетом проведенных ранее исследований нашей группой было принято решение о проведении доклинических испытаний лекарственных препаратов, способных корректировать нарушения минерального гомеостаза (в частности, снижать уровень общего и ионизированного кальция), на ApoE-нокаутных мышах, которые с рождения склонны к развитию атеросклероза.

Пандемия COVID-19 стала одним из наиболее серьезных вызовов для здравоохранения за последние годы, вызвав более 636 миллионов заболеваний новой коронавирусной инфекцией и более 6,6 миллионов смертей во всем мире [34]. В то же время данная ситуация привела к беспрецедентному накоплению массивов клинических «больших данных», которые были обработаны и транслированы в инструменты искусственного интеллекта (ИИ) для прогнозирования COVID-19 [35–37]. Большинство ($\approx 75\%$) исследований по машинному обучению (МО) было посвящено автоматизированному анализу рентгеновских и компьютерно-томографических снимков [38–40], в итоге продемонстрировав для задач диагностики и прогнозирования площадь под ROC-кривой (AUROC) $\geq 0,9$. В то же время автоматизированный анализ параметров общего анализа крови и рутинных биохимических маркеров в исследованиях по МО был представлен существенно менее, хотя такие подходы также позволяли достичь аналогичных значений AUROC в сочетании с клиническими факторами

риска, к примеру, коморбидными патологиями [41–45]. Определенное сочетание лабораторных маркеров было предложено в том числе и для диагностики COVID-19 [46–49], однако эффективность такого подхода ограничена собственно временем пандемии, поскольку он сопряжен с недопустимо высоким риском ложноположительных результатов, связанных с другими инфекционными заболеваниями [50]. В то же время быстрое прогнозирование течения и исхода COVID-19 с использованием рутинных маркеров (таких, как параметры общего анализа крови или уровень С-реактивного белка) может быть достаточно эффективным и относительно дешевым решением в случае пандемии, которую может вызвать другой мутант SARS-CoV-2. Такая стратегия подразумевает существенное ускорение медицинской сортировки для отбора пациентов из группы риска для немедленного перехода на схемы соответствующего лечения и оптимизации работы соответствующих медицинских подразделений [51]. Точность прогнозирования при таком основанном на МО подходе составляет от 81 до 96%, а наиболее чувствительными и специфичными предикторами смерти от COVID-19 являются возраст, сниженное насыщение крови кислородом, повышенный уровень лактатдегидрогеназы и С-реактивного белка в сыворотке крови, а также нарушенная функция почек (к примеру, в результате хронической болезни почек) [52–60]. В то же время данные факторы и их относительный вклад в смертность существенно варьируют между различными странами и клиниками, вероятно, вследствие различных протоколов лечения [52–60].

Другим важным аспектом, зачастую упускаемым в различных эпидемиологических исследованиях COVID-19 (в том числе связанных с МО) является тесная корреляция многих предикторов с полом и возрастом, двух неотъемлемых характеристик каждого пациента. Исследования, в которых пациенты были спарены по полу и возрасту и при этом использовались подходы МО, в настоящее время ограничены профилированием циркулирующих белков (включая цитокины), липидов, метаболитов и микроРНК, собранных до или во время госпитализации с целью прогнозирования инфицирования пациента SARS-CoV-2 [61–64] или тяжести заболевания [63–68], небольшими одноцентровыми

исследованиями маркеров коагуляции и фибринолиза в прогнозировании летального исхода [69], а также исследованиями снимков компьютерной томографии легких [70] или электрокардиограмм [71] для диагностики [70] или исключения [71] COVID-19. Спаривание когорт пациентов в этих исследованиях по полу и возрасту позволило прояснить истинные патофизиологические связи между коморбидными состояниями, повреждением органов и сывороточными биомаркерами.

Тем не менее, до настоящего времени не было проведено исследований по разработке инструментов ИИ для прогнозирования связанного с COVID-19 летального исхода со следующим сочетанием признаков: 1) многоцентровой характер, спаривание пациентов по полу и возрасту, использование подходов МО исследования; 2) использование неспецифичных предикторов (то есть коморбидных состояний и параметров общего или рутинного биохимического анализа крови). Кроме того, эволюция штаммов SARS-CoV-2 и увеличение доли вакцинированного населения также может влиять на диагностическую или предиктивную ценность данных факторов с течением времени [51]. Поэтому одной из задач этого года стало проведение трехцентрового кросс-валидационного исследования, в которое были включены спаренные по полу и возрасту пациенты с тяжелым течением COVID-19, поступившие в отделение реанимации и интенсивной терапии, и которое использовало целый ряд подходов МО в сочетании с набором большого массива табличных клинических и лабораторных данных с целью разработки инструментов ИИ.

Микроциркуляция сосудистой стенки представлена в виде *vasa vasorum* (VV) и может иметь как нормальную, так и патологическую природу [72]. В физиологических условиях сосуды микроциркуляторного русла встречаются в первую очередь в сосудах, диаметр которых превышает 0,5 мм [73, 74], однако в результате гипоксии или воспаления их можно встретить даже в сосудах, толщина стенки которых меньше диффузионного предела [72]. У человека VV присутствуют в стенках крупных артериальных и венозных сосудов, включая коронарные артерии, аорту и ее ветви, в том числе межреберные артерии, отходящие от грудной

аорты [73]. Различают артериальные, венозные и капиллярные VV [75], при этом артериальные, в свою очередь, подразделяются на *vasa vasorum interna*, которые берут свое начало из просвета сосуда [75] и *vasa vasorum externa*, которые располагаются в адвентиции и околососудистой жировой ткани [74–76]. Также VV ветвятся на несколько порядков, где VV первого порядка располагаются вдоль сосуда, а второго – по его окружности [74, 75]. Рост VV стимулируется ангиогенными факторами – например, индуцируемым гипоксией транскрипционным фактором (HIF-1 α), а также основным фактором роста фибробластов (bFGF) и фактором роста сосудистого эндотелия (VEGF), экспрессируемыми сосудистыми гладкомышечными клетками медиа и фибробластами и макрофагами адвентиции [77]. При ингибировании ангиогенеза в первую очередь подвергаются инволюции VV второго порядка [78].

При повреждении или дисфункции эндотелия патофизиологический ответ сосудистой стенки возникает в первую очередь в адвентиции: в частности, увеличивается количество и диаметр просвета VV [77], что приводит к миграции макрофагов в интиму [79, 80], накоплению в сосуде воспалительных клеток [81–83], ацидификации (закислению) микроокружения и расширению сети VV по принципу положительной обратной связи [84, 85]. Таким образом, VV являются ключевыми анатомическими путями формирования и гипертрофии (нео)интимы при сосудистом воспалении, рестенозе и атеросклерозе [73–77]. Можно предположить, что разные типы VV, представленные артериолами, венулами и капиллярами, могут вносить различный вклад в патогенез заболеваний сосудистой стенки.

В патоморфологической диагностике с целью дифференцировки лимфатических и кровеносных сосудов используют различные сосудистые маркеры [86]. В качестве маркеров эндотелия лимфатических сосудов, как правило, рассматривают PROX1 (Prospero homeobox protein 1), LYVE1 (рецептор лимфатического эндотелия к гиалуроновой кислоте) [87–90], VEGFR3 (рецептор 3 к фактору роста сосудистого эндотелия) и подоплантин (один из гликозилированных мембранных гликопротеинов) [91–94]. Маркерами кровеносных сосудов являются

пан-эндотелиальный рецептор CD31 (PECAM1, тромбоцитарно-эндотелиальная молекула клеточной адгезии), CD34 (трансмембранный фосфогликозилированный рецептор, обильно экспрессируемый в эндотелиальных клетках-предшественниках) и фактор фон Виллебранда (vWF), также экспрессируемый в эндотелиальных клетках и обеспечивающий агрегацию тромбоцитов и их адгезию к клеточной стенке поврежденных сосудов с целью формирования тромба [95, 96].

Несмотря на теоретическую обоснованность и широкое распространение в патоморфологии, вышеуказанные подходы к определению кровеносных сосудов обладают рядом недостатков. Так, при микротомной или криотомной резке гистологических препаратов (в особенности препаратов элементов системы кровообращения) и при вазоспазме просвет кровеносных сосудов часто спадается или вовсе исчезает, что не позволяет адекватно оценить их геометрию. Данная проблема имеет особую актуальность при подготовке серийных срезов, требующих максимально близкого совпадения гистологической картины для сравнительного анализа, в особенности иммуногистохимического или иммунофлюоресцентного. Кроме того, размеры эндотелиальных клеток (ЭК) ограничивают работу с некоторыми антителами, не позволяя получать качественное соотношение сигнал/шум в случае недостаточной специфичности антител.

Отдельной проблемой патоморфологического анализа является несоответствие описываемых в литературе маркеров сосудов артериального и венозного русла (зачастую идентифицированных на моделях для изучения биологии развития) реалиям окрашивания клинических образцов. По этой причине не будет преувеличением говорить об отсутствии специфических маркеров, способных дифференцировать артериолы и венулы в элементах системы кровообращения человека (к примеру, с целью уточнения вклада различных типов сосудов внутри микрососудистой сети в развитие сосудистого воспаления). По этой причине одной из задач этого года была разработка оптимальных способов детекции кровеносных сосудов и оценка подходов к дифференциальному окрашиванию артериальных, венозных и капиллярных сосудов

микроциркуляторного русла (на примере сети VV большой подкожной вены (БПВ) человека и аорты крысы).

Эндотелиально-мезенхимальный переход (ЭндоМТ) является одним из наиболее изучаемых феноменов эндотелиальной биологии, с одной стороны, играя незаменимую физиологическую роль в биологии индивидуального развития, а с другой – обладая несомненной патофизиологической значимостью в развитии атеросклероза, рестеноза и фиброза миокарда [97–101]. Сущность данного процесса заключается в поэтапной трансдифференцировке эндотелиальных клеток (ЭК) в мезенхимальные, что сопровождается постепенной утратой экспрессии маркеров эндотелиальной дифференцировки (CD31/PECAM1, VE-кадгерина, фактора фон Виллебранда (VWF), транскрипционного фактора ERG) и приобретением экспрессии маркеров мезенхимальной дифференцировки (фибробласт-ассоциированного белка, фибробласт-специфичного белка, альфа-актина гладких мышц), а также повышенной способностью к синтезу компонентов внеклеточного матрикса (в частности, коллагена I типа) [97–101]. Данная смена транскрипционных программ осуществляется под управлением ряда специфических транскрипционных факторов, к которым традиционно относят Snail, Slug, TWIST1, ZEB1 и GATA4 [97–101].

С целью детекции ЭндоМТ используют ряд методов молекулярной и клеточной биологии, включая количественную полимеразную цепную реакцию после обратной транскрипции (ОТ-кПЦР), иммуноблоттинг и иммунофлюоресцентное окрашивание, которые в совокупности позволяют оценить реализацию эндотелиальной и мезенхимальной транскрипционных и трансляционной программ, а также визуализировать данные изменения [97–101]. Патоморфологическим последствием ЭндоМТ является смена продолговатой (вытянутой, удлиненной) формы, характерной для ЭК в статических условиях и при воздействии ламинарного потока, на типичную для клеток мезенхимального ряда полиморфную [97–101]. *In vitro* изменение клеточной геометрии целесообразно детектировать при помощи фазово-контрастной микроскопии или иммунофлюоресцентного окрашивания (к примеру, сочетая окрашивание

вышеуказанных эндотелиальных или мезенхимальных маркеров с окрашиванием на F-актин) [102, 103], *in vivo* – посредством сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах после заливки цельных тканей в эпоксидную смолу [104].

Несмотря на сотни публикаций, посвященных проблеме ЭндоМТ, в русскоязычной литературе практически отсутствуют ясные практические рекомендации по методологии его детекции, следствием чего является несовершенный дизайн исследований в этом направлении в ряде открытых (научные статьи и доклады) и закрытых (проектно-сметная и отчетная документация научных коллективов) источников. Поэтому коллективом была поставлена задача по разработке алгоритма и анализу применимости конкретных инструментов для детекции ЭндоМТ *in vitro*.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ПЕРОРАЛЬНЫЙ ПРИЕМ ЦИТРАТА МАГНИЯ ПОЗВОЛЯЕТ СНИЗИТЬ УРОВЕНЬ ОБЩЕГО И ИОНИЗИРОВАННОГО КАЛЬЦИЯ У АРОЕ-НОКАУТНЫХ МЫШЕЙ

В рамках проведения первого этапа доклинических испытаний экспериментальной терапии для коррекции нарушений минерального гомеостаза (которые, как указано во вводной части, ассоциированы с повышенным риском развития гемодинамически значимого атеросклероза, острых сердечно-сосудистых событий и сердечно-сосудистой смерти) было проведено исследование на АроЕ-нокаутных мышях. Всего в исследование было включено 50 мышей (по 25 мышей в контрольной и экспериментальной группах, из них по 15 самок и по 10 самцов) в возрасте \approx 1 года, которые на протяжении 6 месяцев (26 недель) получали растворенный в питьевой воде цитрат магния в дозе 1,845 мг/сут (рассчитанная animal equivalent dose).

Расчет дозы цитрата магния был основан на расчете дозы магния (как критичного для передозировки действующего вещества). Принцип расчета дозы магния (animal equivalent dose) был основан на рекомендациях FDA [105]):

$450 \text{ мг} / 237 \text{ мл} / \text{сут} = 1,9 \text{ мг/мл/сут}$ – терапевтическая доза для человека

1. Конвертация дозы для человека (human dose) в мг/кг в дозу для животного (animal equivalent dose) в мг/кг:

$$450 \text{ мг} / 60 \text{ кг} = 7,5 \text{ мг/кг}$$

$$7,5 \text{ мг/кг} * 12,3 \text{ (фактор FDA)} = 92,25 \text{ мг/кг}$$

$$92,25 \text{ мг/кг} * 0,02 \text{ кг} = 1,845 \text{ мг (суточная доза магния для мыши)}$$

2. 1 мышь \approx 10 мл в день (из флакона 100 мл на неделю)

3. $1,845 \text{ мг} / 10 \text{ мл} / \text{сут} = 0,1845 \text{ мг/мл/сут}$ – терапевтическая доза для мыши

4. $18,45 \text{ мг} / 100 \text{ мл} / \text{нед}$ – в один флакон для одной мыши

5. В 3000 мг цитрата магния содержится 450 мг магния, соответственно, необходимо умножить дозу на 6,666 ($18,45 \text{ мг} * 6,666 \approx 123 \text{ мг цитрата магния} / 100 \text{ мл} / \text{нед}$ – в один флакон для одной мыши)

По завершении исследования (в возрасте $\approx 1,5$ года) мыши были выведены из эксперимента с последующим забором сыворотки крови и биохимическим анализом параметров минерального гомеостаза (измерение молярной концентрации общего и ионизированного кальция, молярной концентрации магния, молярной концентрации неорганического фосфора, концентрации общего белка, концентрации альбумина), а также параметров липидного состава (молярная концентрация общего холестерина, липопротеинов высокой плотности, липопротеинов низкой плотности, расчет индекса атерогенности, молярная концентрация триглицеридов), молярной концентрации глюкозы, параметров гомеостаза печени (уровень аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, гамма-глутамилтрансферазы, общего и прямого билирубина), молярной концентрации мочевой кислоты, параметров гомеостаза почек (молярная концентрация креатинина, мочевины), концентрации С-реактивного белка и концентрации железа. Результаты исследования представлены в табл. 1 и на рис. 1.

Таблица 1. Анализ биохимических параметров сыворотки крови у 1,5-летних АрсЕ-нокаутных мышей, получавших или не получавших растворенный в питьевой воде цитрат магния в дозе 1,845 мг/сут.

Параметр биохимического анализа крови	Мыши, не получавшие цитрат магния	Мыши, получавшие цитрат магния	Р
Молярная концентрация общего кальция в сыворотке крови, ммоль/л, медиана [МКИ]	2,50 [2,37-2,70]	2,30 [2,20-2,40]	0,005

Молярная концентрация ионизированного кальция в сыворотке крови, ммоль/л, медиана [МКИ]	1,08 [1,03-1,15]	1,05 [1,01-1,07]	0,025
Молярная концентрация фосфора в сыворотке крови, ммоль/л, медиана [МКИ]	2,26 [2,08-2,41]	2,11 [1,94-2,48]	0,41
Молярная концентрация магния в сыворотке крови, ммоль/л, медиана [МКИ]	1,26 [1,17-1,34]	1,29 [1,08-1,40]	0,72
Концентрация общего белка в сыворотке крови, г/л, медиана [МКИ]	49,0 [46,0-51,0]	50,0 [43,5-55,5]	0,50
Концентрация альбумина в сыворотке крови, г/л, медиана [МКИ]	25,0 [23,0-27,0]	25,0 [22,5-27,0]	0,99
Уровень щелочной фосфатазы в сыворотке крови, ЕД/л, медиана [МКИ]	66,0 [55,5-93,0]	78,5 [66,5-111,5]	0,09
Молярная концентрация общего холестерина в сыворотке крови, ммоль/л, медиана [МКИ]	5,6 [3,0-9,1]	6,0 [2,2-8,9]	0,90
Молярная концентрация липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови, ммоль/л, медиана [МКИ]	2,10 [1,61-4,06]	2,48 [1,65-5,90]	0,39
Молярная концентрация липопротеинов низкой плотности в	2,74 [1,39-5,98]	3,75 [0,31-6,18]	0,93

сыворотке крови, ммоль/л, медиана [МКИ]			
Индекс атерогенности (Отношение липопротеинов низкой плотности к липопротеинам высокой плотности)	1,35 [0,88-1,70]	0,84 [0,41-1,57]	0,14
Молярная концентрация триглицеридов в сыворотке крови, ммоль/л, медиана [МКИ]	1,00 [0,80-1,47]	0,90 [0,63-1,40]	0,26
Молярная концентрация глюкозы в сыворотке крови, ммоль/л, медиана [МКИ]	11,3 [9,6-15,1]	13,5 [10,4-15,1]	0,31
Уровень аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови, ЕД/л, медиана [МКИ]	68,0 [26,5-91,0]	70,0 [52,5-90,0]	0,65
Уровень аланинаминотрансферазы в сыворотке крови, ЕД/л, медиана [МКИ]	50,0 [35,5-76,0]	34,0 [29,0-45,0]	0,015
Уровень гамма-глутамилтрансферазы в сыворотке крови, ЕД/л, медиана [МКИ]	4,0 [1,5-7,0]	2,0 [2,0-4,8]	0,30
Молярная концентрация общего билирубина в сыворотке крови, мкмоль/л, медиана [МКИ]	5,90 [4,45-6,65]	5,90 [3,85-6,75]	0,91
Молярная концентрация прямого билирубина в сыворотке крови, мкмоль/л, медиана [МКИ]	2,30 [1,35-2,60]	1,70 [0,75-3,10]	0,61
Молярная концентрация мочевой кислоты в сыворотке крови, мкмоль/л, медиана [МКИ]	118,0 [80,0-152,5]	105,0 [81,5-160,0]	0,82

Молярная концентрация креатинина в сыворотке крови, мкмоль/л, медиана [МКИ]	17,0 [9,0-22,0]	15,0 [9,5-29,0]	0,90
Молярная концентрация мочевины в сыворотке крови, ммоль/л, медиана [МКИ]	11,5 [9,9-13,3]	10,7 [8,6-12,3]	0,18
Концентрация С-реактивного белка в сыворотке крови, г/л, медиана [МКИ]	1,0 [0,0-3,0]	2,0 [1,0-2,0]	0,74
Молярная концентрация железа в сыворотке крови, мкмоль/л, медиана [МКИ]	28,7 [22,3-32,4]	27,9 [21,9-31,9]	0,87

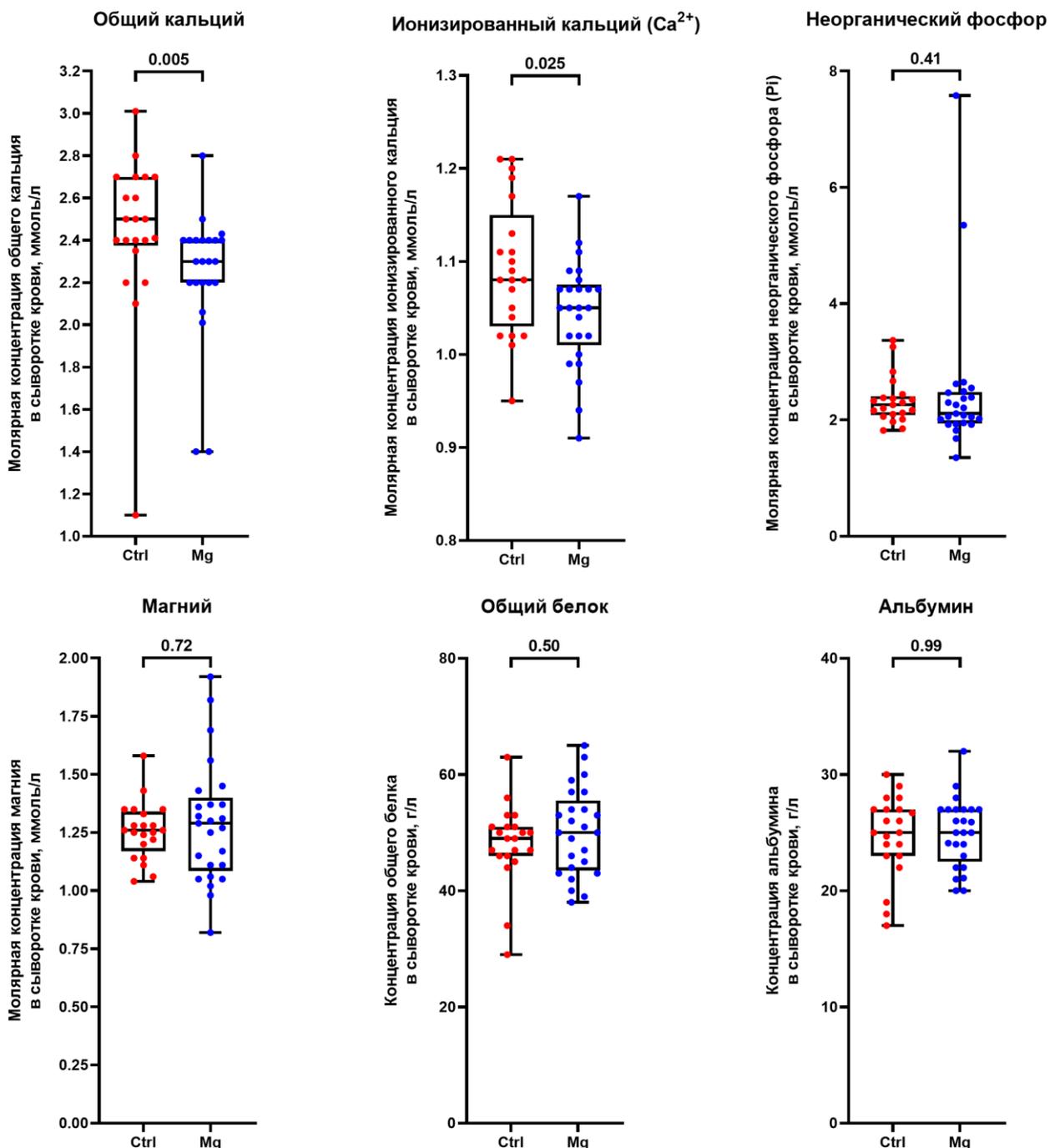


Рисунок 1. Анализ биохимических параметров минерального гомеостаза у 1,5-летних ApoE-нокаутных мышей, получавших или не получавших растворенный в питьевой воде цитрат магния в дозе 1,845 мг/сут. U-критерий Манна-Уитни, каждая точка на графике обозначает соответствующее измерение от одной мыши, значения вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу P представлены над графиками.

Красные точки – мышцы, не получавшие цитрат магния, синие точки – мышцы, получавшие цитрат магния.

Результаты анализа показали снижение молярной концентрации общего и ионизированного кальция в группе мышечной, получавших цитрат магния, в то время как значения остальных параметров системного гомеостаза существенно не различались (за исключением снижения уровня аланинаминотрансферазы у мышечной, получавших цитрат магния мышечной, что не имело существенной значимости). Также следует отметить снижение индекса атерогенности, которое, однако, не достигло статистической значимости.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности успешного фармакологического таргетирования общего и ионизированного кальция в пределах физиологической нормы путем перорального приема комбинированного препарата – цитрата магния, который одновременно является и хелатирующим соединением, и донором ионов магния. Вместе с тем следует отметить отсутствие уменьшения уровня железа в сыворотке крови мышечной, получавших цитрат магния, что с большой вероятностью указывает на то, что основным эффектом данного препарата является донорство ионов магния, являющегося природным антагонистом кальция. При этом повышения молярной концентрации магния в сыворотке крови мышечной мышечной также выявлено не было, что свидетельствует об отсутствии влияния данного препарата в используемой дозе на магниевый гомеостаз. Отсутствие патологического повышения молярной концентрации магния и патологического снижения молярной концентрации железа в сочетании с физиологическим (а не патологическим) снижением молярной концентрации общего и ионизированного кальция обуславливает безопасность данного терапевтического режима, что в совокупности с пероральной формой приема позволяет надеяться на определенные перспективы. Ответ на вопрос о способности корректирующих нарушения минерального гомеостаза препаратов (цитрата магния и протеиногенных аминокислот с разветвлённым строением алифатической боковой цепи) замедлять развитие атеросклероза будет получен во

время второй очереди доклинических испытаний на молодых ApoE-нокаутных мышах.

2. РАЗРАБОТКА ИНСТРУМЕНТОВ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА ДЛЯ ОЦЕНКИ РИСКА ЛЕТАЛЬНОГО ИСХОДА ПРИ ТЯЖЕЛОМ ТЕЧЕНИИ COVID-19

Генеральная выборка из спаренных по полу и возрасту пациентов для МО и последующей кросс-валидации была набрана в ходе трехцентрового исследования, включившего в себя 350 пациентов с тяжелым течением COVID-19, госпитализированных в отделение реанимации и интенсивной терапии центра №1 (НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, 100 пациентов), центра №2 (Кузбасская клиническая инфекционная больница, 106 пациентов) и центра №3 (Кузбасская областная клиническая больница, 144 пациента). Критериями включения в исследование были: 1) инфицирование SARS-CoV-2, подтвержденное положительным ПЦР-тестом; 2) поступление или перевод в отделение реанимации и интенсивной терапии вследствие тяжелого течения новой коронавирусной инфекции COVID-19, диагностированной по клиническим, лабораторным и инструментальным критериям согласно временным методическим рекомендациям «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» девятого пересмотра (26.10.2020) и верифицированной при помощи полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР в режиме реального времени). При поступлении пациента в стационар забирались мазки из носоглотки (из двух носовых ходов) и ротоглотки. Мазки со слизистой оболочки носоглотки и ротоглотки собирались в одну пробирку для большей концентрации вируса. Выделение РНК производилось при помощи соответствующего набора компании Вектор-Бест «РеалБест Сорбитус» (каталожный номер С-8848) на автоматической роботизированной станции пробоподготовки (Freedom EVO, Tecan), обратная транскрипция и детекция продуктов реакции также проводилась при помощи

соответствующего набора (D-5580, «РеалБест РНК SARS-CoV-2», Вектор-Бест) на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad). При поступлении или переводе в отделение реанимации и интенсивной терапии производился сбор: 1) клинических данных (пол, возраст, анамнез в отношении артериальной гипертензии, сахарного диабета, ишемической болезни сердца, хронической сердечной недостаточности, хронической обструктивной болезни легких, астме, хронической болезни почек 3–5 стадий; 2) показателей общего анализа крови (концентрация тромбоцитов, лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, нейтрофильно-лимфоцитарное соотношение); 3) параметров биохимического анализа крови (молярная концентрация мочевины, креатинина, скорость клубочковой фильтрации, уровень аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы, молярная концентрация глюкозы натощак, концентрация С-реактивного белка и D-димера). Описательная статистика представлена в табл. 2.

Таблица 2. Описательная статистика по трем центрам, включенным в исследование.

Признак	Центр №1 (НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний) (n = 100)	Центр №2 (Кузбасская клиническая инфекционная больница) (n = 106)	Центр №3 (Кузбасская областная клиническая больница) (n = 144)	FDR-corrected P	Среднее (n = 350)
Клинические данные					
Пол, мужской/женский, n (%)	50/50 (50,00% / 50,00%)	53/53 (50,00% / 50,00%)	72/72 (50,00% / 50,00%)	1,00	175/175 (50,00% / 50,00%)

Возраст, лет, медиана [МКИ]	73,00 [67,00 – 80,75]	68,50 [62,75 – 79,00]	64,00 [56,25 – 69,00]	0,0001	68,00 [61,00 – 75,00]
Артериальная гипертензия, n (%)	98/100 (98,00%)	90/106 (84,90%)	115/144 (79,86%)	0,0001	297/350 (84,86%)
Сахарный диабет, n (%)	35/100 (35,00%)	36/106 (33,96%)	63/144 (43,75%)	0,21	131/350 (37,43%)
Ишемическая болезнь сердца или хроническая сердечная недостаточность, n (%)	86/100 (86,00%)	55/106 (51,89%)	91/144 (63,19%)	0,0001	232/350 (66,29%)
Хроническая обструктивная болезнь легких или астма, n (%)	12/100 (12,00%)	7/106 (6,60%)	17/144 (11,80%)	0,33	36/350 (10,29%)
Хроническая болезнь почек 3–5 стадии, n (%)	34/100 (34,00%)	10/106 (9,43%)	38/144 (26,39%)	0,0001	82/350 (23,43%)
Параметры общего анализа крови					
Концентрация лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$, медиана [МКИ]	7,30 [5,25 – 11,68]	8,55 [5,50 – 13,45]	10,75 [7,82 – 14,20]	0,0001	9,10 [6,00 – 12,90]
Концентрация нейтрофилов, $\times 10^9/\text{л}$, медиана [МКИ]	5,40 [3,25 – 9,10]	7,55 [4,30 – 11,50]	9,20 [6,60 – 12,40]	0,0001	7,80 [4,50 – 11,30]
Концентрация лимфоцитов, $\times 10^9/\text{л}$, медиана [МКИ]	1,20 [0,60 – 1,90]	0,90 [0,40 – 1,20]	0,80 [0,50 – 1,20]	0,0003	0,90 [0,50 – 1,30]
Нейтрофильно-лимфоцитарное соотношение, медиана [МКИ]	4,75 [2,20 – 12,40]	9,40 [5,30 – 17,55]	11,60 [6,87 – 17,60]	0,0001	9,10 [4,70 – 16,33]

Концентрация тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$, медиана [МКИ]	193,5 [154,8 – 266,8]	188,5 [156,0 – 253,5]	239,5 [178,3 – 297,5]	0,0003	216,0 [160,0 – 277,0]
Параметры биохимического анализа крови					
Молярная концентрация мочевины в сыворотке крови, ммоль/л, медиана [МКИ]	6,95 [5,97 – 9,32]	7,80 [5,60 – 13,83]	8,45 [6,00 – 12,05]	0,09	7,80 [5,90 – 11,75]
Молярная концентрация креатинина в сыворотке крови, мкмоль/л, медиана [МКИ]	87,00 [74,00 – 107,00]	97,00 [76,75 – 126,80]	78,50 [65,25 – 106,50]	0,0001	85,00 [69,75 – 112,30]
Скорость клубочковой фильтрации (уравнение СКД-ЕРІ), мл/мин/1,73 м ² , медиана [МКИ]	69,00 [51,00 – 85,00]	60,00 [44,75 – 79,50]	86,50 [57,25 – 98,75]	0,0001	73,00 [50,75 – 93,00]
Уровень аспаратаминотрансферазы, ЕД/л, медиана [МКИ]	22,50 [18,25 – 35,00]	39,00 [30,75 – 58,00]	42,00 [27,00 – 66,75]	0,0001	36,00 [25,00 – 55,25]
Уровень аланинаминотрансферазы, ЕД/л, медиана [МКИ]	21,50 [16,00 – 30,00]	31,00 [25,75 – 47,00]	38,50 [22,25 – 60,75]	0,0001	30,00 [20,00 – 48,25]
Молярная концентрация глюкозы крови натощак, ммоль/л, медиана [МКИ]	6,20 [5,30 – 7,37]	7,10 [5,57 – 11,63]	7,20 [5,60 – 9,45]	0,0017	6,70 [5,50 – 8,92]
Концентрация С-реактивного белка, мг/л, медиана [МКИ]	52,00 [17,25 – 165,00]	41,50 [13,00 – 109,30]	101,00 [47,75 – 164,80]	0,0001	68,50 [22,75 – 140,00]
Концентрация D-димера, нг/мл, медиана [МКИ]	2,685 [856 – 6,701]	1,011 [325 – 1,379]	2,974 [1406 – 5,528]	0,0001	1,802 [840 – 4,320]
Исход					

Летальный исход / выписка из стационара, n (%)	50/50 (50,00% / 50,00%)	53/53 (50,00% / 50,00%)	72/72 (50,00% / 50,00%)	1,00	175/175 (50,00% / 50,00%)
--	-------------------------------	----------------------------	-------------------------------	------	------------------------------------

Для скрининга факторов риска летального исхода от COVID-19 при поступлении пациентов в отделение реанимации и интенсивной терапии, в первую очередь был проведен классический однофакторный анализ согласно критериям непараметрической статистики (U-критерий Манна-Уитни). Статистически значимыми факторами летального исхода были кардиологическая коморбидность (ишемическая болезнь сердца, хроническая сердечная недостаточность), связанные с иммунитетом параметры общего анализа крови (повышенная концентрация лейкоцитов и нейтрофилов, сниженная концентрация лимфоцитов и увеличенное нейтрофильно-лимфоцитарное соотношение), маркеры почечной дисфункции (повышенная молярная концентрация мочевины и креатинина в сыворотке крови, сниженная скорость клубочковой фильтрации), а также повышенный уровень С-реактивного белка и D-димера (табл. 3).

Таблица 3. Описательная статистика и однофакторный анализ факторов риска летального исхода у пациентов с тяжелым течением COVID-19 при неблагоприятном (летальном) исходе и благоприятном исходе (выписка из стационара).

Признак	Летальный исход (n = 175)	Выписка из стационара (n = 175)	P
Клинические данные			
Пол, мужской/женский, n (%)	79/96 (45,14% / 54,86%)	79/96 (45,14% / 54,86%)	1,00
Возраст, лет, медиана [МКИ]	68,00 [61,00 – 75,00]	68,00 [61,00 – 75,00]	1,00

Артериальная гипертензия, n (%)	161/175 (92,00%)	142/175 (81,14%)	0,003
Сахарный диабет, n (%)	70/175 (40,00%)	64/175 (36,57%)	0,51
Ишемическая болезнь сердца или хроническая сердечная недостаточность, n (%)	153/175 (87,43%)	79/175 (45,14%)	0,0001
Хроническая обструктивная болезнь легких или астма, n (%)	16/175 (9,14%)	20/175 (11,43%)	0,48
Хроническая болезнь почек 3–5 стадии, n (%)	45/175 (25,71%)	37/175 (21,14%)	0,31
Параметры общего анализа крови			
Концентрация лейкоцитов, × 10 ⁹ /л, медиана [МКИ]	10,00 [6,70 – 14,30]	8,70 [5,60 – 11,70]	0,004
Концентрация нейтрофилов, × 10 ⁹ /л, медиана [МКИ]	8,70 [5,50 – 12,80]	6,80 [3,80 – 9,90]	0,0001
Концентрация лимфоцитов, × 10 ⁹ /л, медиана [МКИ]	0,70 [0,50 – 1,20]	1,00 [0,70 – 1,50]	0,0004
Нейтрофильно- лимфоцитарное соотношение, медиана [МКИ]	11,40 [6,80 – 20,60]	6,90 [3,10 – 13,60]	0,0001
Концентрация тромбоцитов, × 10 ⁹ /л, медиана [МКИ]	208,0 [156,0 – 269,0]	219,0 [167,0 – 284,0]	0,09
Параметры биохимического анализа крови			
Молярная концентрация мочевины в сыворотке крови, ммоль/л, медиана [МКИ]	8,30 [6,50 – 13,10]	7,40 [5,60 – 10,60]	0,007

Молярная концентрация креатинина в сыворотке крови, мкмоль/л, медиана [МКИ]	89,0 [72,0 – 120,0]	83,0 [68,0 – 107,0]	0,014
Скорость клубочковой фильтрации (уравнение СКД-ЕП), мл/мин/1,73 м ² , медиана [МКИ]	69,00 [48,00 – 90,00]	75,00 [54,00 – 94,00]	0,05
Уровень аспаратаминотрансферазы, ЕД/л, медиана [МКИ]	37,00 [25,00 – 61,00]	35,00 [23,00 – 50,00]	0,07
Уровень аланинаминотрансферазы, ЕД/л, медиана [МКИ]	28,00 [20,00 – 46,00]	30,00 [20,00 – 50,00]	0,54
Молярная концентрация глюкозы крови натощак, ммоль/л, медиана [МКИ]	7,10 [5,50 – 9,90]	6,40 [5,50 – 8,30]	0,13
Концентрация С-реактивного белка, мг/л, медиана [МКИ]	101,0 [50,0 – 164,0]	37,0 [10,0 – 109,0]	0,0001
Концентрация D-димера, нг/мл, медиана [МКИ]	2,770 [1,194 – 5,001]	1,263 [565 – 3,463]	0,0001

Далее был проведен анализ ранговой корреляции по Спирмену, в результате которого были выявлены статистически значимые корреляционные связи средней силы между возрастом и скоростью клубочковой фильтрации ($r = -0,44$), молярной концентрацией мочевины в сыворотке крови и концентрацией лейкоцитов ($r = 0,31$), молярной концентрацией мочевины в сыворотке крови и концентрацией нейтрофилов ($r = 0,32$, рис. 2). Выраженные корреляционные связи между концентрациями лейкоцитов и нейтрофилов ($r = 0,92$), молярной концентрацией креатинина и скоростью клубочковой фильтрации ($r = -0,89$), нейтрофильно-

лимфоцитарным соотношением и концентрацией нейтрофилов ($r = 0,67$), нейтрофильно-лимфоцитарным соотношением и концентрацией лимфоцитов ($r = -0,72$), молярной концентрацией креатинина и мочевины в сыворотке крови ($r = 0,62$), а также аспартатаминотрансферазой и аланинаминотрансферазой ($r = 0,66$) подтвердили техническую валидность корреляционного анализа (рис. 2).

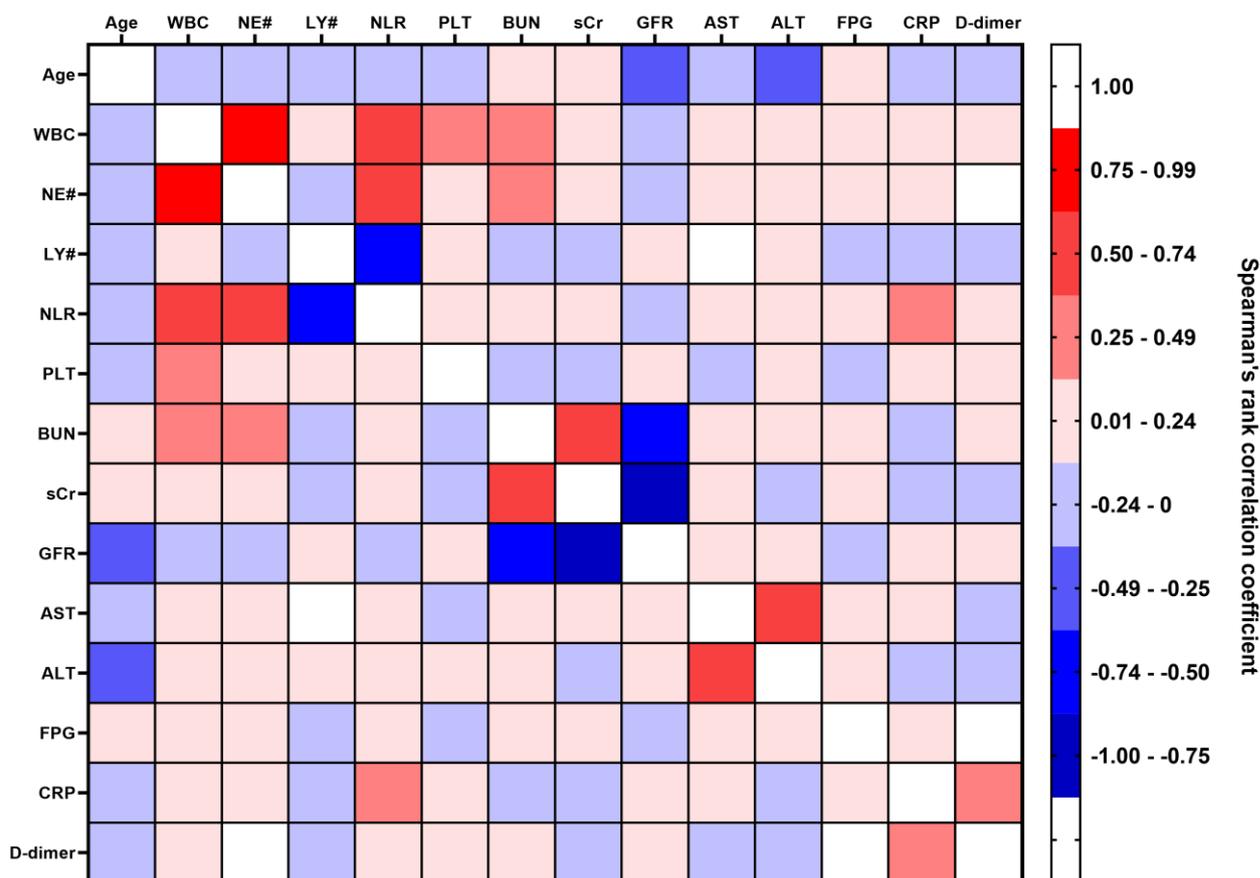


Рисунок 2. Корреляционный анализ (коэффициент ранговой корреляции Спирмена) количественных предикторов. Тепловая карта, различные оттенки синего (от светло-синего до темно-синего) отражают коэффициенты корреляции от $-0,01$ до $-1,0$ соответственно; различные оттенки красного (от розового до алого) отражают коэффициенты корреляции от $0,01$ до $1,0$ соответственно.

Сравнение AUROC продемонстрировало статистически значимые различия в эффективности между различными алгоритмами машинного обучения (рис. 3, табл. 4). Наиболее высокую эффективность показали алгоритм градиентного бустинга CatBoost (AUROC = 0,879), случайные леса (AUROC = 0,863) и нейронные сети (AUROC = 0,860), в то время как деревья решений (AUROC =

0,724) и метод k-ближайших соседей обладали наименьшей предиктивной ценностью (AUROC = 0,784, рис. 3, табл. 4). Была выявлена существенная вариабельность AUROC между различными центрами, при этом наименьший разброс был выявлен при использовании многофакторной логистической регрессии (0,014), метода k-ближайших соседей (0.044), а также алгоритмов градиентного бустинга XGBoost (0.058) и CatBoost (0.059) (табл. 4).

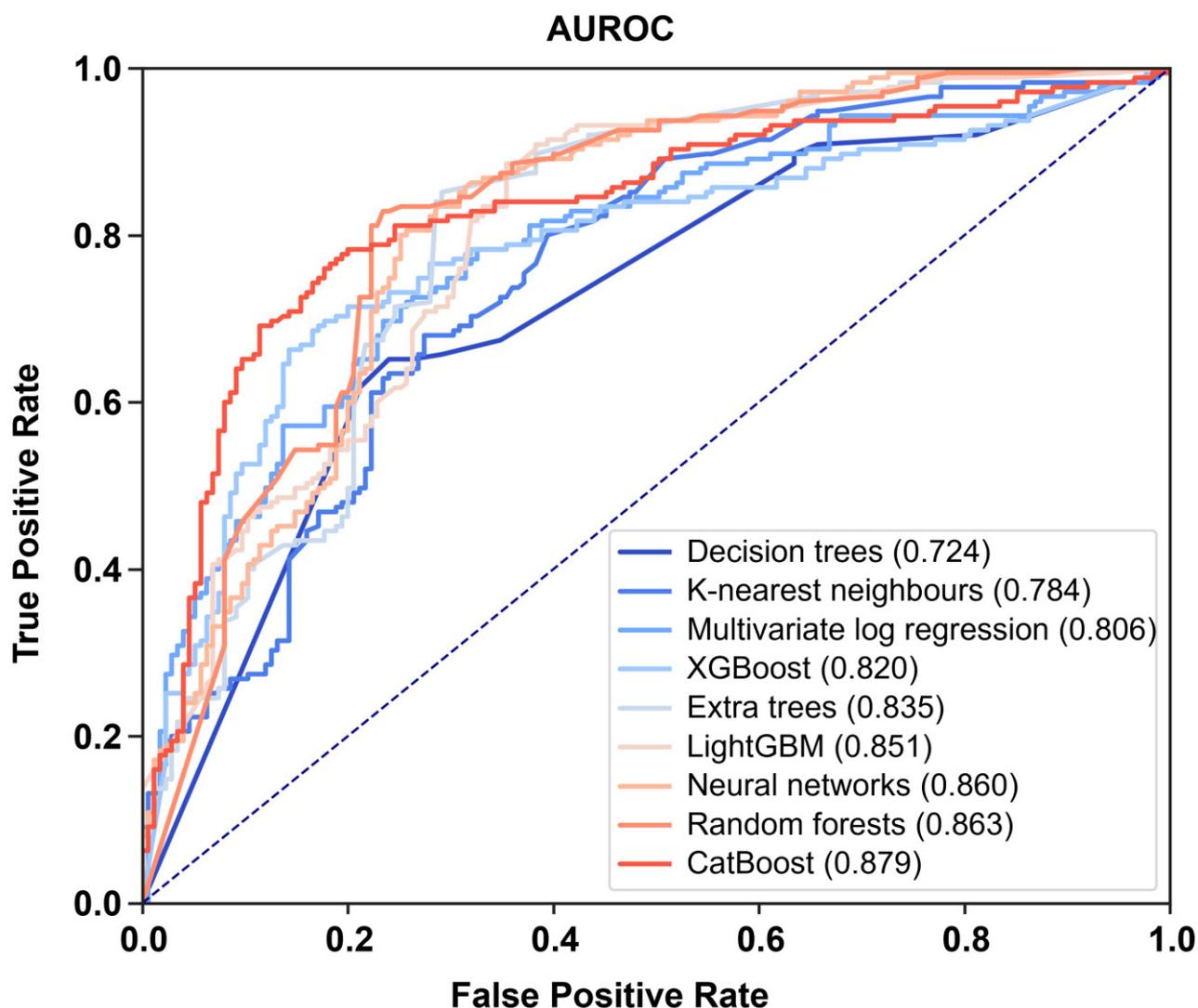


Рисунок 3. ROC-кривые и значения AUROC для наилучших моделей, разработанных при помощи различных алгоритмов МО.

Таблица 4. Сравнение значений AUROC для наилучших моделей, разработанных при помощи различных алгоритмов МО.

Алгоритм МО	AUROC				
	Центр №1 (НИИ КПССЗ) (n = 100)	Центр №2 (ГАУЗ ККИБ) (n = 106)	Центр №3 (ГАУЗ КОКБ) (n = 144)	Среднее	Разброс
Деревья решений	0,824	0,740	0,607	0,724	0,217
Случайные леса	0,908	0,821	0,861	0,863	0,087
Сверхслучайные деревья	0,817	0,806	0,882	0,835	0,076
Нейронные сети	0,898	0,849	0,834	0,860	0,064
k-ближайшие соседи	0,807	0,763	0,782	0,784	0,044
XGBoost	0,827	0,787	0,845	0,820	0,058
LightGBM	0,919	0,812	0,822	0,851	0,107
CatBoost	0,887	0,846	0,905	0,879	0,059
Многофакторная логистическая регрессия (референсный метод)	0,805	0,813	0,799	0,806	0,014

Большинство моделей с наивысшим AUROC были обучены на выборках центра №2 (Кузбасская клиническая инфекционная больница) и центра №3 (Кузбасская областная клиническая больница) (n = 250) и кросс-валидированы на выборке, набранной в центре №1 (НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний) (n = 100), что подчеркивает существенную гетерогенность между включенными в исследование центрами (рис. 4).

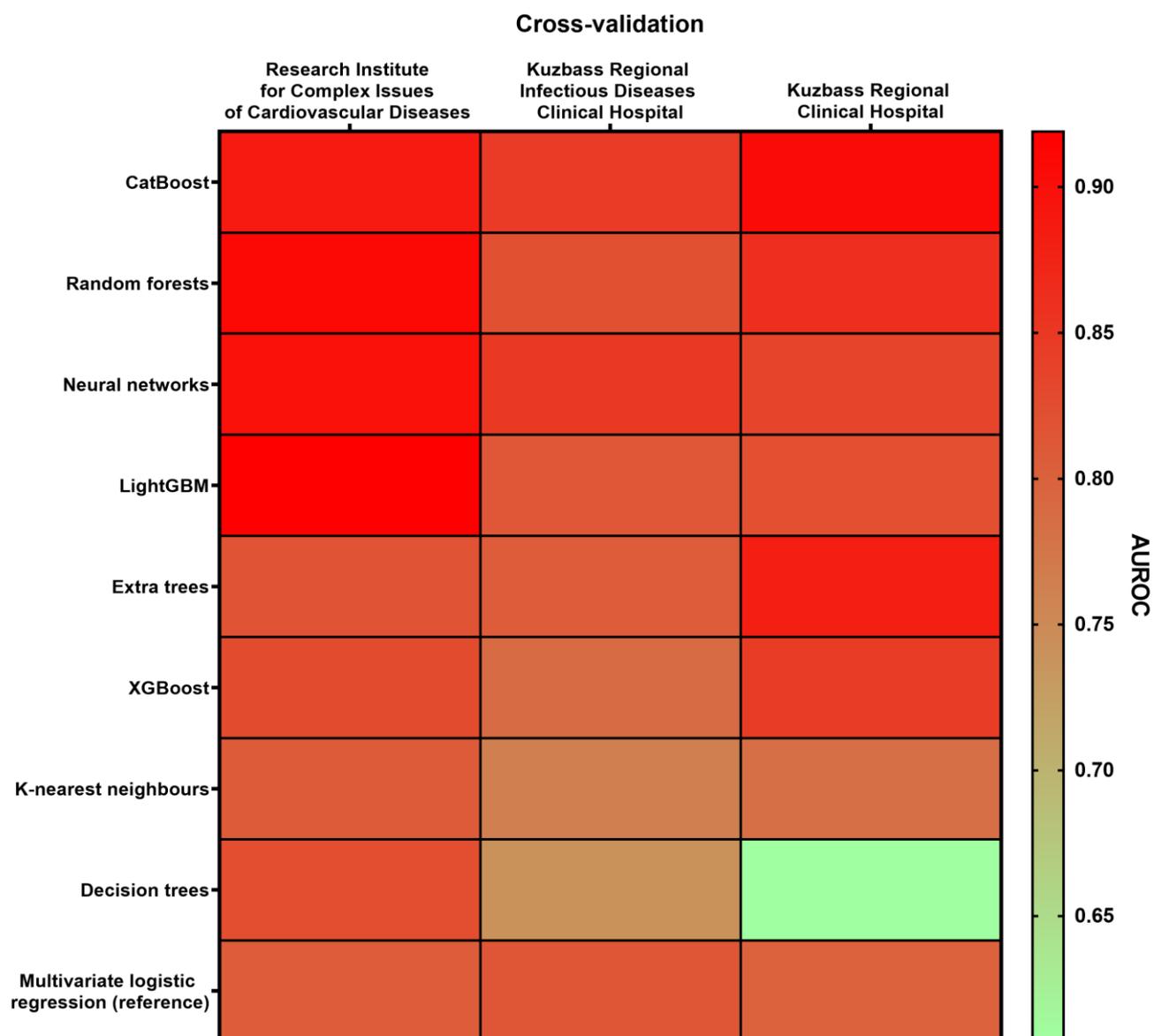


Рисунок 4. Тепловая карта, демонстрирующая вариабельность AUROC при различных сочетаниях обучения и кросс-валидации. Варьирующий от зеленого до красного цвет отражает увеличение AUROC (наименьший и наибольший AUROC окрашены зеленым и красным соответственно). Левая колонка: выборки для обучения – центр №2 (Кузбасская клиническая инфекционная больница) и центр №3 (Кузбасская областная клиническая больница) ($n = 250$), выборка для кросс-валидации – центр №1 (НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний) ($n = 100$). Центральная колонка: выборки для обучения – центр №1 (НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний) и центр № 3 (Кузбасская областная клиническая больница) ($n = 244$), выборка для кросс-валидации – центр №2 (Кузбасская клиническая инфекционная больница) ($n = 106$).

Правая колонка: выборки для обучения – центр №1 (НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний) и центр №2 (Кузбасская клиническая инфекционная больница) ($n = 206$), выборка для кросс-валидации – центр №3 (Кузбасская областная клиническая больница) ($n = 144$).

Помимо AUROC, клинически релевантные модели также должны демонстрировать одинаковую или очень близкую чувствительность и специфичность. Как чувствительность, так и специфичность были статистически значимо выше при обучении предиктивных моделей на выборках из центра №1 (НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний) и центра №2 (Кузбасская клиническая инфекционная больница) ($n = 206$) и их кросс-валидации на выборке из центра №3 (Кузбасская областная клиническая больница) ($n = 144$), что подтверждает гетерогенность между выборками из различных центров (рис. 5). Среди всех алгоритмов машинного обучения нейронные сети характеризовались наиболее высокой чувствительностью и третьей по величине специфичностью, обладая существенно большей предиктивной ценностью в сравнении с другими алгоритмами (рис. 5, табл. 5). Также следует обратить внимание на тот факт, что нейронные сети показали наиболее высокую устойчивость к гетерогенности выборок между различными центрами (наименьший разброс между чувствительностью и специфичностью, полученными в различных центрах, табл. 5).

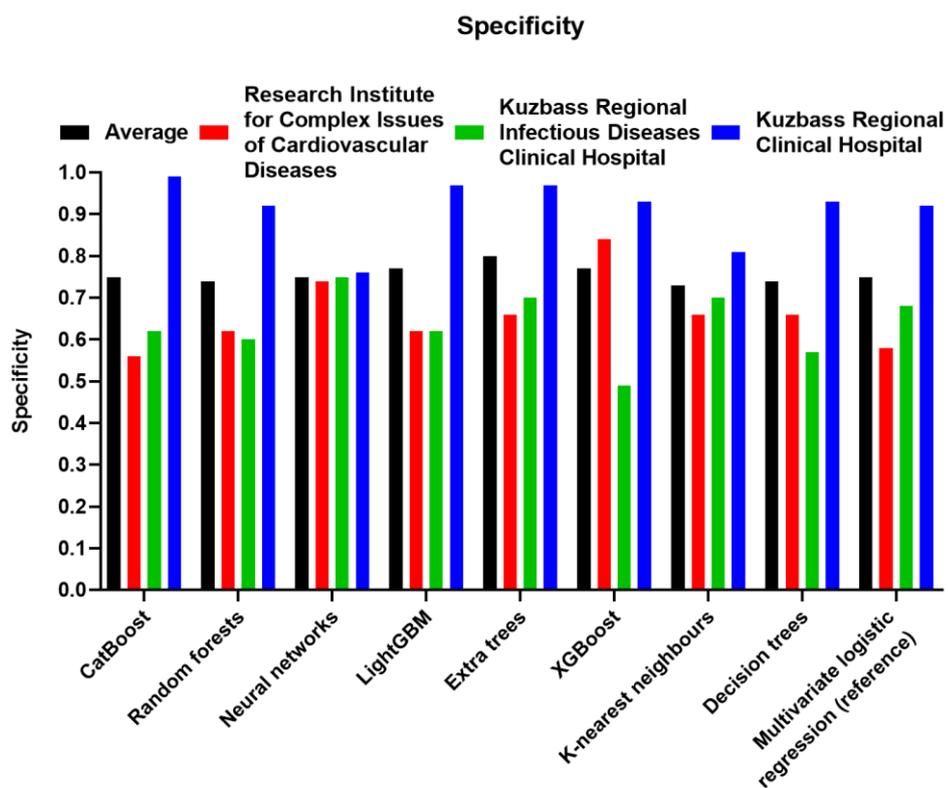
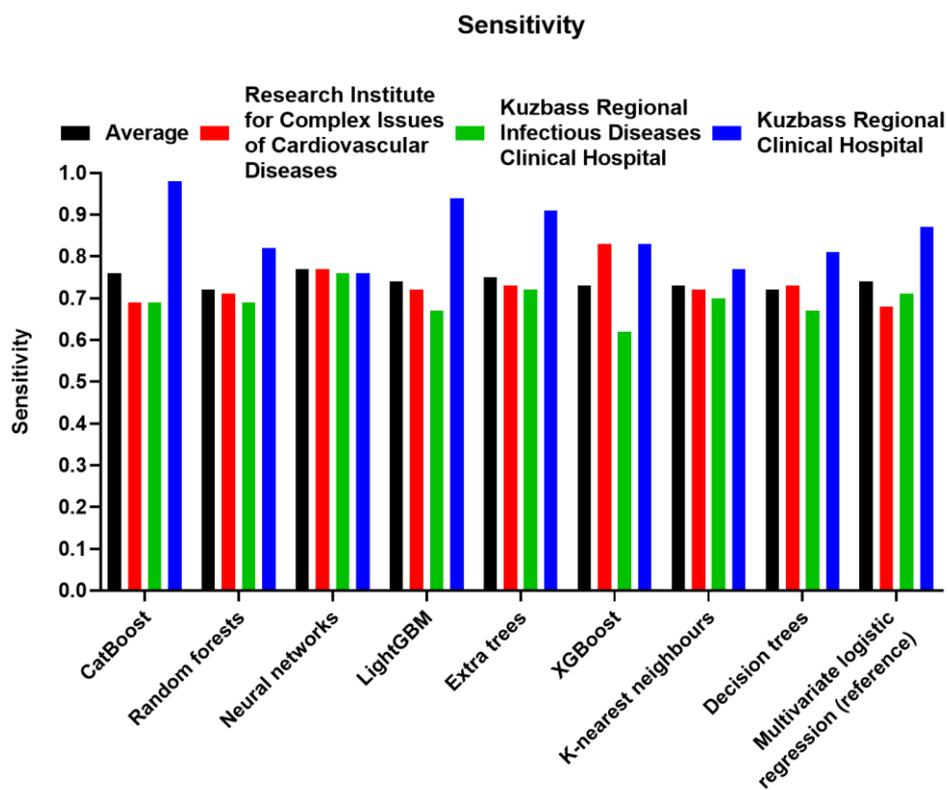


Рисунок 5. Чувствительность (сверху) и специфичность (снизу) примененных алгоритмов машинного обучения. Черный цвет: среднее значение между тремя

центрами, красный цвет: центр №1 (НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний) (n = 100); зеленый цвет: центр №2 (Кузбасская клиническая инфекционная больница) (n = 106); синий цвет: центр №3 (Кузбасская областная клиническая больница) (n = 144).

Таблица 5. Ранжирование алгоритмов МО в соответствии с их чувствительностью и специфичностью. Наименьший ранг обозначает наибольшую чувствительность или специфичность.

Алгоритм МО	Средняя чувств.	Средняя специф.	Разброс (чувств.)	Разброс (специф.)	Ранг (средняя чувств.)	Ранг (средняя специф.)	Сумма рангов
Деревья решений	0,72	0,74	0,14	0,36	6	4	10
Случайные леса	0,72	0,74	0,13	0,31	6	4	10
Сверхслучайные деревья	0,75	0,80	0,19	0,31	3	1	4
Нейронные сети	0,77	0,75	0,01	0,02	1	3	4
k-ближайшие соседи	0,73	0,73	0,07	0,15	5	5	10
XGBoost	0,73	0,77	0,21	0,44	5	2	7
LightGBM	0,74	0,77	0,26	0,35	4	2	6
CatBoost	0,76	0,75	0,28	0,43	2	3	5
Многофакторная логистическая регрессия (референсный метод)	0,74	0,75	0,18	0,34	4	3	7

Далее с целью поиска сочетания наиболее чувствительных и специфичных предикторов и разработки эффективного инструмента для прогнозирования летального исхода у пациентов с тяжелым течением COVID-19 был проведен

скрининг ансамблей нейронных сетей с использованием соответствующего модуля программы STATISTICA (Automated Neural Networks, SANN). Мануальный скрининг выявил, что наиболее эффективным сочетанием предикторов являются кардиологическая коморбидность (ишемическая болезнь сердца, хроническая сердечная недостаточность), почечная коморбидность (хроническая болезнь почек 3–5 стадии), молярная концентрация мочевины в сыворотке крови и уровень С-реактивного белка. Из отобранных таким образом 15 нейронных сетей с долей верно предсказанных исходов $> 80\%$ и AUROC $> 0,8$, четверо продемонстрировали AUROC $\geq 0,85$ (0,850, 0,853, 0,861 и 0,866), две показали чувствительность $> 90\%$ и одна показала чувствительность и специфичность $> 80\%$ при первичной кросс-валидации (30% от общей выборки). Дополнительная кросс-валидация этих ансамблей нейронных сетей с использованием бутстрэппинга (4 виртуальных кросс-валидационных выборки) доказала их высокую предиктивную значимость, поскольку нейронная сеть с AUROC = 0,866 при первичной кросс-валидации имела AUROC = 0,849 и в среднем около 80% верно предсказанных исходов при бутстрэппинге. Другие нейронные сети, разработанные при помощи мануального скрининга предикторов, также имели AUROC $\geq 0,8$, а 10 из 15 разработанных нейросетей показали $> 80\%$ верно предсказанных исходов при кросс-валидации посредством бутстрэппинга.

Далее было проведено ранжирование всех предикторов с использованием инструмента Predictor Screening программы STATISTICA. Среди всех исследованных предикторов наибольший вклад в вероятность летального исхода вносили ишемическая болезнь сердца в сочетании с хронической сердечной недостаточностью, концентрация С-реактивного белка, концентрация лимфоцитов и нейтрофильно-лимфоцитарное соотношение (information value $> 0,3$ и Cramer's V $> 0,25$, табл. 6). В то же время лишь 1 из 10 нейронных сетей, разработанных путем автоматического скрининга предикторов (#2, AUROC = 0,824) достигла наименьшего AUROC нейронных сетей, разработанных путем мануального скрининга предикторов (#6, 0,823) при первичной кросс-валидации, и ни одна из

них не достигла AUROC > 0,8 или 80% верно предсказанных исходов при кросс-валидации путем бутстрэппинга.

Таблица 6. Ранжирование предикторов в соответствии с инструментом Predictor Screening программы STATISTICA.

Предиктор	Gini	Information value	Cramer's V
Ишемическая болезнь сердца или хроническая сердечная недостаточность	0,40	0,90	0,45
Концентрация С-реактивного белка	0,41	0,84	0,41
Концентрация лимфоцитов	0,45	0,39	0,30
Нейтрофильно-лимфоцитарное соотношение	0,46	0,36	0,29
Концентрация D-димера	0,47	0,26	0,25
Молярная концентрация глюкозы крови натощак	0,47	0,20	0,22
Концентрация нейтрофилов	0,48	0,18	0,21
Концентрация тромбоцитов	0,48	0,16	0,18
Концентрация лейкоцитов	0,48	0,13	0,18
Молярная концентрация мочевины в сыворотке крови	0,49	0,11	0,16
Артериальная гипертензия	0,49	0,11	0,16

Скорость клубочковой фильтрации	0,49	0,11	0,16
Молярная концентрация креатинина в сыворотке крови	0,49	0,10	0,15
Уровень аспаргатаминотрансферазы	0,49	0,08	0,14
Уровень аланинаминотрансферазы	0,50	0,04	0,10
Хроническая болезнь почек 3–5 стадии	0,50	0,01	0,05
Хроническая обструктивная болезнь легких или астма	0,50	0,01	0,04
Сахарный диабет	0,50	0,00	0,04

Сочетание предикторов, отобранных путем мануального и автоматического скрининга (ишемическая болезнь сердца и хроническая сердечная недостаточность, хроническая болезнь почек 3–5 стадии, молярная концентрация мочевины в сыворотке крови, концентрация С-реактивного белка, концентрация лимфоцитов и нейтрофильно-лимфоцитарное соотношение) не привело к увеличению чувствительности и специфичности сгенерированных нейронных сетей, поскольку ни одна из них не смогла достичь AUROC в 0.85 при первичной кросс-валидации.

Таким образом, нейронные сети оказались наиболее эффективным (в особенности наиболее чувствительным) алгоритмом МО для прогнозирования летального исхода у спаренных по полу и возрасту пациентов с тяжелым течением COVID-19 при их поступлении в отделение реанимации и интенсивной терапии. Еще одним преимуществом нейронных сетей была их устойчивость к гетерогенности между выборками, набранными в различных центрах. AUROC

некоторых нейронных сетей превышал 0,85 при первичной кросс-валидации и достигал практически таких же значений на виртуальных выборках, сгенерированных на основе валидационной выборки посредством бутстрэппинга. Наиболее ценными предикторами летального исхода на момент поступления или перевода пациентов с COVID-19 в отделение реанимации и интенсивной терапии были кардиологическая коморбидность (ишемическая болезнь сердца и/или хроническая сердечная недостаточность), хроническая болезнь почек 3–5 стадии, молярная концентрация мочевины и концентрация С-реактивного белка в сыворотке крови. Поскольку все обозначенные параметры могут быть измерены и проанализированы достаточно быстро, а измерение молярной концентрации мочевины и концентрации С-реактивного белка не сопряжено с большими финансовыми издержками, данное сочетание предикторов может быть достаточно эффективным в медицинской сортировке пациентов с тяжелым течением COVID-19 при их поступлении или переводе в отделение реанимации и интенсивной терапии при применении в составе инструментов искусственного интеллекта (в частности, нейронных сетей).

3. СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ СОСУДИСТЫХ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК ЯВЛЯЮТСЯ УНИВЕРСАЛЬНЫМИ МАРКЕРАМИ СОСУДОВ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА

В научно-исследовательской практике детекция кровеносных сосудов, в том числе сосудов микроциркуляторного русла и конкретно VV, осуществляется при помощи иммуногистохимического или иммунофлюоресцентного окрашивания на ряд специфичных маркеров, к которым относят CD31, VE-кадгерин, VEGFR2, фактор фон Виллебранда (vWF), CD34 и ряд других. Дискуссии в отношении оптимального маркера ЭК не утихают и по сей день, однако, как правило, остаются на стадии неформальных обсуждений в рамках научных мероприятий или переписки с рецензентами в процессе подготовки к принятию статьи в печать. С теоретической стороны критике можно подвергнуть любой из этих маркеров. К примеру, CD34 является маркером эндотелиальных прогениторных клеток [106], причем данный рецептор также экспрессируется и на других клетках-предшественниках [107]. Фактор фон Виллебранда действительно обильно детектируется в цитозоле ЭК в виде телец Вайбеля-Паладе, однако также является и белком субэндотелиального внеклеточного матрикса, что особенно заметно при окрашивании тканеинженерных сосудистых протезов малого диаметра [106]; кроме того, вследствие его роли в обеспечении гемостаза он также может детектироваться в тромбах различной величины безотносительно ЭК [108]. VE-кадгерин по своей сути является маркером межклеточных контактов и, хотя и является специфичным для ЭК, может не окрашивать отдельные ЭК, потерявшие контакты с соседними ЭК в случае прерывистости эндотелиального монослоя; кроме того, данный маркер зачастую не окрашивает апикальную и базальные поверхности ЭК. CD31 (PECAM1) по своей природе экспрессируется не только в ЭК, но также и в тромбоцитах (что ясно из названия данной молекулы – platelet endothelial cell adhesion molecule) и поэтому может также быть высокоэкспрессированным в тромбах. В этом отношении привлекательной является высокая специфичность VEGFR2, однако степень экспрессии данного

маркера на порядок ниже, чем CD31 или VE-кадгерина, что зачастую делает затруднительным высококачественное окрашивание ЭК с его помощью. Данная проблема является особенно актуальной при окрашивании биоискусственных тканей (к примеру, вышеуказанных тканеинженерных сосудистых протезов) и ксеногенных (гетерологических) имплантатов (к примеру, биопротезов клапанов сердца или сосудистых заплат для каротидной эндартерэктомии). На практике высокая специфичность VEGFR2 не перекрывает его относительно низкой чувствительности в сравнении с CD31 и VE-кадгерином, окрашивание на которые даже на больших разведениях позволяет гарантировать высококачественную иммунодетекцию, несмотря на их указанные в данном абзаце недостатки. По этой причине в данной работе в качестве маркеров ЭК были использованы именно CD31 и VE-кадгерин, позволяющие получить наиболее представительную иммунофлюоресцентную картину в нативных тканях (к которым относятся и аорта крысы, и БПВ человека).

Проблемой использования антител к специфичным белкам ЭК (в том числе CD31 и VE-кадгерина) в качестве маркеров сосудов микроциркуляторного русла является то, что их относительно тонкая стенка часто не обеспечивает достаточного запаса упругости для сохранения сосудистой геометрии при подготовке гистологических срезов или при вазоспазме, что приводит к их спадаемости и даже закрытию просвета сосуда. В этой ситуации (как будет показано на одном из рисунков в данной работе) сосуд при окрашивании на маркеры ЭК детектируется как скопление клеток, которое не дает объективной информации об изначальной геометрии сосуда и, строго говоря, даже не может быть использовано как доказательство присутствия сосуда в ткани, что имеет особую значимость для безошибочного машинного обучения и последующей автоматизированной детекции.

В сравнении с монослоем ЭК слои сосудистых гладкомышечных клеток (СГМК) занимают кратно (в ряде случаев – на порядки) большую площадь сосуда, что позволяет обеспечить значительно более сильный иммуногистохимический или иммунофлюоресцентный сигнал. Кроме того, поскольку именно СГМК

составляют $\geq 80\%$ площади сосудов микроциркуляторного русла, иммуноокрашивание на их специфичные белки позволяет осуществить достаточно адекватную оценку сосудистой геометрии даже при спадании просвета сосуда, а также обеспечить надежность машинного обучения и дальнейшей детекции VV при помощи искусственного интеллекта. К маркерам СГМК относятся тяжелые цепи миозина гладких мышц (SM-MHC), альфа-актин гладких мышц (α -SMA), кальпонин, SM22 α и смузелин, из которых наиболее часто выделяют SM-MHC и α -SMA. Целью данной работы была разработка оптимальных способов детекции кровеносных сосудов и оценка подходов к дифференциальному окрашиванию артериальных, венозных и капиллярных сосудов микроциркуляторного русла (на примере сети VV БПВ человека и аорты крысы).

Окрашивание гематоксилином и эозином позволило выявить развитую микрососудистую сеть в адвентиции венозной стенки, включающую в себя разные типы VV: артериолы (рис. 6А), венулы (рис. 6Б) и капилляры (рис. 6В). В отличие от окрашивания гематоксилином и эозином (рис. 6А-6В), пентахромное окрашивание по Расселлу-Мовату позволило отчетливо визуализировать внутреннюю эластическую мембрану, являющуюся характерным признаком артериол (рис. 6Г-Е).

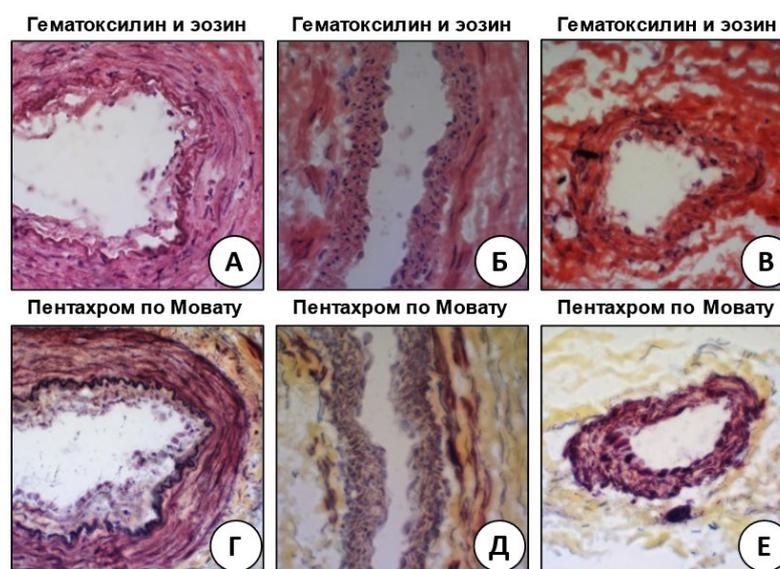


Рисунок 6. Адвентиция большой подкожной вены человека, сосуды микроциркуляторного русла. А, Г – артериола; Б, Д – венула; В, Е – капилляр. А-В:

окрашивание гематоксилином и эозином, ув. x400. Г-Е: пентахромное окрашивание по Расселлу-Мовату, ув. x400.

Отличительной чертой внутренней эластической мембраны также была ее выраженная аутофлюоресценция в зеленом или синем каналах, позволяющая дифференцировать артериолы от других сосудов даже без специфического окрашивания флюоресцентно меченным антителом к эластину (рис. 7А-7Г).

Окрашивание эндотелиальными и гладкомышечными маркерами выявило непрерывный монослой ЭК, окруженных несколькими концентрически ориентированными слоями СГМК, при этом окрашивание на CD31/PECAM1 (тромбоцитарно-эндотелиальную молекулу клеточной адгезии) позволяло идентифицировать значительно более выраженный, но менее детализированный сигнал, чем окрашивание на белок межэндотелиальных контактов VE-кадгерин, независимо от видового происхождения первичного антитела (кролик или мышь) или флюоресцентной метки (Alexa Fluor 555 или Alexa Fluor 488) (рис. 7А-7М). Иными словами, флюоресцентно меченные антитела к CD31 позволяют более ярко окрасить эндотелий, а аналогичные антитела к VE-кадгерину – более тонко детализировать межклеточные контакты (рис. 7А-7М). Следует отметить, что антитела к CD31, как правило, окрашивают как латеральные поверхности, так и базальную поверхность ЭК, в то время как антитела к VE-кадгерину окрашивают исключительно латеральные поверхности (рис. 7А-7М). Окрашивание СГМК флюоресцентно мечеными антителами к тяжелым цепям миозина гладких мышц (SM-МНС) и альфа-актину гладких мышц (α -SMA) характеризовалось высокой интенсивностью вне зависимости от выбранного маркера, видового происхождения первичного антитела (кролик или мышь) или флюоресцентной метки (Alexa Fluor 555 или Alexa Fluor 488) (рис. 7А-7М). Несмотря на активные дискуссии в профильном научном сообществе сосудистых биологов (личное общение), полученные в данном исследовании результаты показывают, что любой из этих двух классических маркеров окрашивает как непосредственно СГМК, так и внеклеточный матрикс мышечной оболочки сосудов (медии) (рис. 7А-7М).

Следует отметить, что антителами к ЭК и СГМК окрашивались как артериолы (рис. 7А-7Г) и венулы (рис. 7Д-7З), так и капилляры (рис. 7И-7М), однако при этом окрашивание на маркеры СГМК независимо от выбранного маркера (SM-МНС или α -SMA), видового происхождения первичного антитела (кролик или мышь) или флюоресцентной метки (Alexa Fluor 555 или Alexa Fluor 488) в силу больших размеров СГМК и многослойности их расположения позволяло получить кратно более высокое соотношение сигнал/шум в сравнении с окрашиванием антителами к ЭК, ясно сигнализируя о наличии кровеносного сосуда внутри определенной области (рис. 7А-7М).

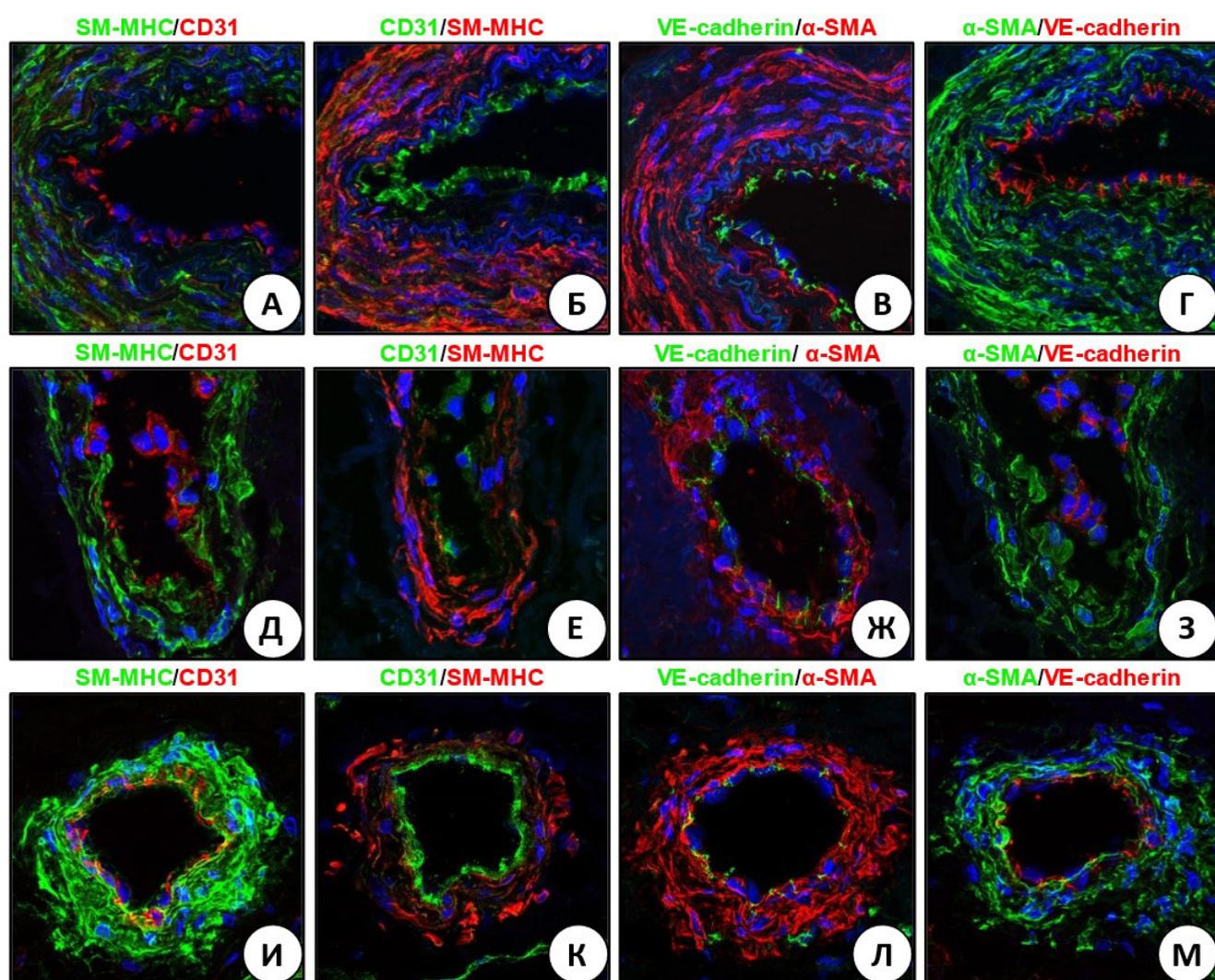


Рисунок 7. Сравнение эндотелиальных и гладкомышечных маркеров при окрашивании различных видов сосудов микроциркуляторного русла (vasa vasorum) большой подкожной вены человека. А – артериола, окрашивание антителами к CD31 и SM-МНС; Б – артериола, окрашивание антителами к SM-МНС и CD31; В –

артериола, окрашивание антителами к VE-кадгерину и α -SMA; Г – артериола, окрашивание антителами к α -SMA и VE-кадгерину; Д – венула, окрашивание антителами к CD31 и SM-MHC; Е – венула, окрашивание антителами к SM-MHC и CD31; Ж – венула, окрашивание антителами к VE-кадгерину и α -SMA; З – венула, окрашивание антителами к α -SMA и VE-кадгерину; И – капилляр, окрашивание антителами к CD31 и SM-MHC; К – капилляр, окрашивание антителами к SM-MHC и CD31; Л – капилляр, окрашивание антителами к VE-кадгерину и α -SMA; М – капилляр, окрашивание антителами к α -SMA и VE-кадгерину. Иммунофлюоресцентное окрашивание, конфокальная микроскопия, ув. x400.

Кроме того, окрашивание антителами к СГМК позволяло значительно более отчетливо визуализировать геометрию капилляров в сравнении с классическим окрашиванием антителами к ЭК, поскольку именно капиллярный эндотелий наиболее часто спадается при подготовке гистологических срезов, закрывая просвет сосуда и не позволяя провести полуколичественный анализ его площади, а также толщины сосудистой стенки (рис. 8А-8З). Таким образом, окрашивание антителами к СГМК может быть предложено в качестве альтернативного и более эффективного способа детекции сосудов микроциркуляторного русла в сравнении с окрашиванием антителами к ЭК независимо от экспериментальных условий. Наиболее правильным с позиции теоретического обоснования маркером при этом является SM-MHC, поскольку он отражает исключительно функциональную специализацию клеток, не являясь при этом также и белком внеклеточного матрикса (в отличие от α -SMA). Тем не менее, как показало в том числе и описываемое исследование, на практике паттерн окрашивания СГМК не зависит от выбранного маркера. Поэтому, с позиции авторов, при окрашивании кровеносных сосудов допустимо использование в качестве их маркера как SM-MHC, так и α -SMA и, вероятно, также и других маркеров СГМК.

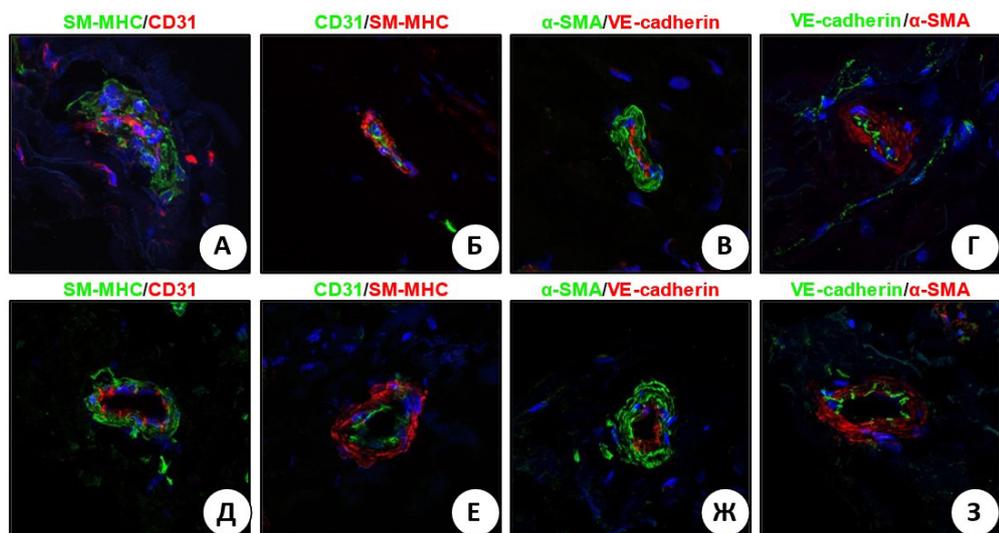


Рисунок 8. Эффективность окрашивания спавшихся капилляров (без сосудистого просвета) и неспавшихся капилляров (с сохраненным сосудистым просветом). А – спавшийся капилляр без сосудистого просвета, окрашивание антителами к CD31 и SM-MHC; Б – спавшийся капилляр без сосудистого просвета, окрашивание антителами к SM-MHC и CD31; В – спавшийся капилляр без сосудистого просвета, окрашивание антителами к VE-кадгерину и α -SMA; Г – спавшийся капилляр без сосудистого просвета, окрашивание антителами к α -SMA и VE-кадгерину; Д – неспавшийся капилляр с сосудистым просветом, окрашивание антителами к CD31 и SM-MHC; Е – неспавшийся капилляр с сосудистым просветом, окрашивание антителами к SM-MHC и CD31; Ж – неспавшийся капилляр с сосудистым просветом, окрашивание антителами к VE-кадгерину и α -SMA; З – неспавшийся капилляр с сосудистым просветом, окрашивание антителами к α -SMA и VE-кадгерину. Иммунофлюоресцентное окрашивание, конфокальная микроскопия, ув. x400.

Следующим этапом исследования стала попытка идентификации специфичных маркеров венозного и капиллярного эндотелия (дифференцировку данных сосудов от артериол целесообразно осуществлять по характерной исключительно для сосудов артериального русла эластической мембране). Предварительный анализ адвентиции и околососудистой жировой ткани аорт крыс Wistar продемонстрировал высокую специфичность механочувствительного

транскрипционного фактора KLF2 и транскрипционного фактора венозно-лимфатической дифференцировки PROX1 как маркеров венозного эндотелия (рис. 9А-9Е) и транскрипционного фактора артериальной дифференцировки HEY1 как маркера клеток стенки капилляров (рис. 9Ж-9И), в то время как транскрипционный фактор артериальной дифференцировки ERG детектировался во всех видах ЭК (рис. 9К-9М), механочувствительный транскрипционный фактор KLF4 – во всех видах СГМК и перицитах (рис. 9Н-9П), а транскрипционный фактор артериальной дифференцировки HES1 – во всех видах сосудистых клеток (рис. 9Р-9Т).

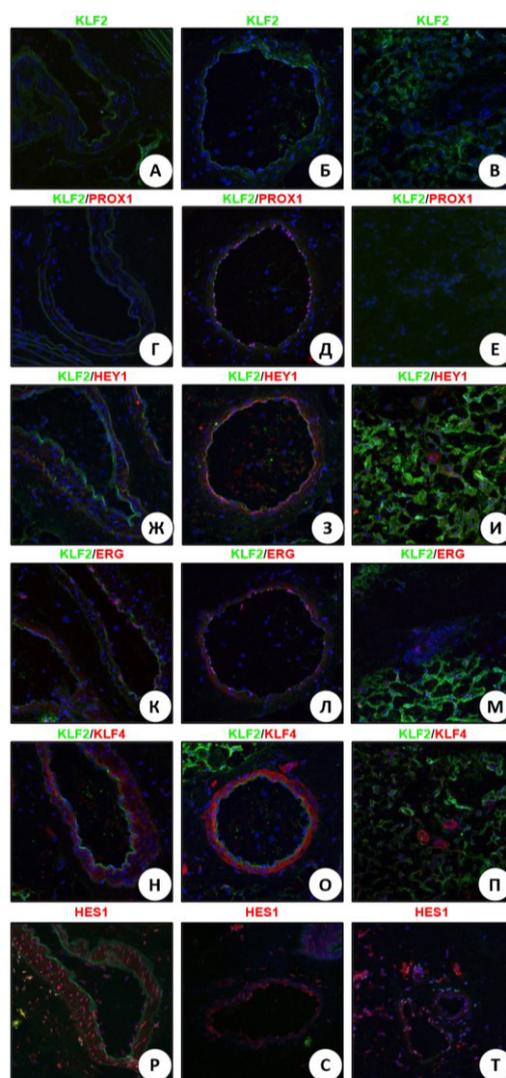


Рисунок 9. Аорта крысы, сосуды микроциркуляторного русла. А – артериола, окрашивание антителами к KLF2; Б – венула, окрашивание антителами к KLF2; В – капилляр, окрашивание антителами к KLF2; Г – артериола, окрашивание антителами к KLF2 и PROX1; Д – венула, окрашивание антителами к KLF2 и PROX1; Е – капилляр, окрашивание антителами к KLF2 и PROX1; Ж – артериола,

окрашивание антителами к KLF2 и HEY1; З – венула, окрашивание антителами к KLF2 и HEY1; И – капилляр, окрашивание антителами к KLF2 и HEY1; К – артериола, окрашивание антителами к KLF2 и ERG; Л – венула, окрашивание антителами к KLF2 и ERG; М – капилляр, окрашивание антителами к KLF2 и ERG; Н – артериола, окрашивание антителами к KLF2 и KLF4; О – венула, окрашивание антителами к KLF2 и KLF4; П – капилляр, окрашивание антителами к KLF2 и KLF4; Р – артериола, окрашивание антителами к HES1; С – венула, окрашивание антителами к HES1; Т – капилляр, окрашивание антителами к HES1. Иммунофлюоресцентное окрашивание, конфокальная микроскопия, ув. x400.

Тем не менее, при окрашивании тканей БПВ человека механочувствительный транскрипционный фактор KLF2 идентифицировался в сосудистой стенке артериол и капилляров и не был специфичен для эндотелия (рис. 10А-10Б), экспрессия транскрипционного фактора HEY1 в стенке капилляров была в лучшем случае умеренной (рис. 10В), а транскрипционный фактор венозно-лимфатической дифференцировки PROX1 не был детектирован ни в одном из видов кровеносных сосудов (рис. 10Г-10Е). Другие маркеры венозно-лимфатической дифференцировки LYVE1 (рис. 10Ж-10И), VEGFR3 (10К-10М) и NRP2 (10Н-10П) не были специфичны для эндотелия и с разной степенью выраженности детектировались во всех видах кровеносных сосудов, при этом экспрессия LYVE1 была значительно выше (рис. 10Ж-10М). Аналогичное утверждение было справедливо и для механочувствительного транскрипционного фактора KLF4 (рис. 10Р-10Т), в то время как транскрипционный фактор артериальной дифференцировки HES1 практически не экспрессировался в сосудистой стенке ВВ БПВ (рис. 10У-10Х). Как и в аортах крыс, транскрипционный фактор артериальной дифференцировки ERG был специфичен для ЭК и выраженно экспрессировался в них независимо от их дифферона (рис. 10Ц-10Ш), что позволяет рассматривать его как возможный пан-эндотелиальный маркер в дополнение к CD31 и VE-кадгерину. Единственным специфичным маркером, позволяющим при иммунофлюоресцентном окрашивании более или менее дифференцировать венулы

от артериол и капилляров, был транскрипционный фактор венозной дифференцировки NR2F2, который был детектирован внутри стенки некоторых венул (однако не экспрессируясь в венозных ЭК) и не был экспрессирован в какой-либо из клеточных популяций стенки артериол или капилляров, однако его экспрессия в венозной стенке также существенно различалась между венулами (рис. 10У-10Ш).

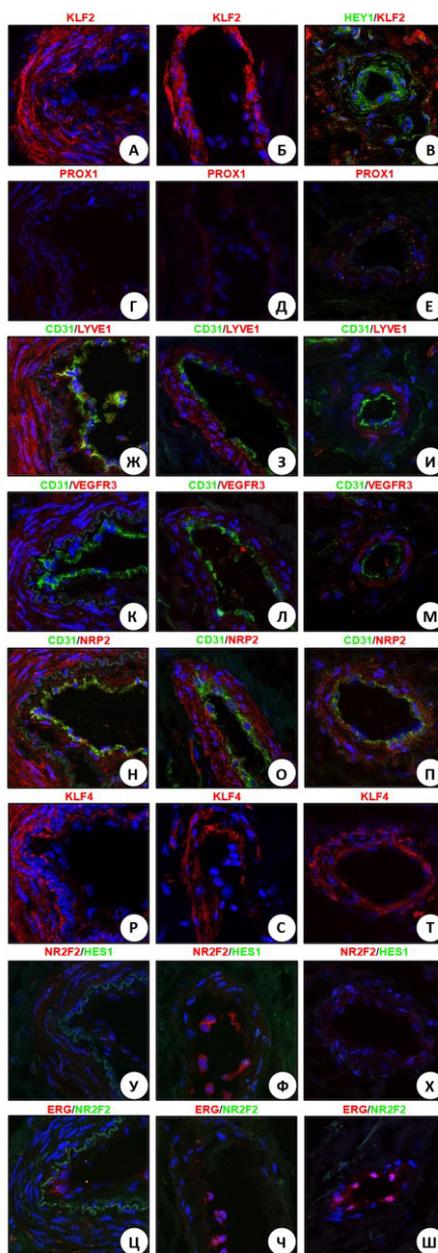


Рисунок 10. Большая подкожная вена человека, сосуды микроциркуляторного русла. А – артериола, окрашивание антителами к KLF2; Б – венула, окрашивание антителами к KLF2; В – капилляр, окрашивание антителами к KLF2 и HEY1; Г – артериола, окрашивание антителами к PROX1; Д – венула, окрашивание

антителами к PROX1; Е – капилляр, окрашивание антителами к PROX1; Ж – артериола, окрашивание антителами к CD31 и LYVE1; З – венула, окрашивание антителами к CD31 и LYVE1; И – капилляр, окрашивание антителами к CD31 и LYVE1; К – артериола, окрашивание антителами к CD31 и VEGFR3; Л – венула, окрашивание антителами к CD31 и VEGFR3; М – капилляр, окрашивание антителами к CD31 и VEGFR3; Н – артериола, окрашивание антителами к CD31 и NRP2; О 0 – венула, окрашивание антителами к CD31 и NRP2; П – капилляр, окрашивание антителами к CD31 и NRP2; Р – артериола, окрашивание антителами к KLF4; С – венула, окрашивание антителами к KLF4; Т – капилляр, окрашивание антителами к KLF4. У – артериола, окрашивание антителами к NR2F2 и HES1; Ф – венула, окрашивание антителами к NR2F2 и HES1; Х – капилляр, окрашивание антителами к NR2F2 и HES1; Ц – артериола, окрашивание антителами к NR2F2 и ERG; Ч – венула, окрашивание антителами к NR2F2 и ERG; Ш – капилляр, окрашивание антителами к NR2F2 и ERG. Иммунофлюоресцентное окрашивание, конфокальная микроскопия, ув. х400.

Иммуногистохимическое окрашивание стенки БПВ, однако, не выявило специфичности NR2F2 для венул, поскольку данный транскрипционный фактор также экспрессировался во всей венозной стенке при малом разведении соответствующего антитела (1:100, рис. 11А), хотя при больших разведениях – 1:200 (рис. 11Б) и особенно 1:500 (рис. 11В) процент положительно окрашенных венозных клеток снижался. Тем не менее, даже при окрашивании 1:500 наблюдалось положительное окрашивание на NR2F2 клеток всех сосудов микроциркуляторного русла (рис. 11Г).

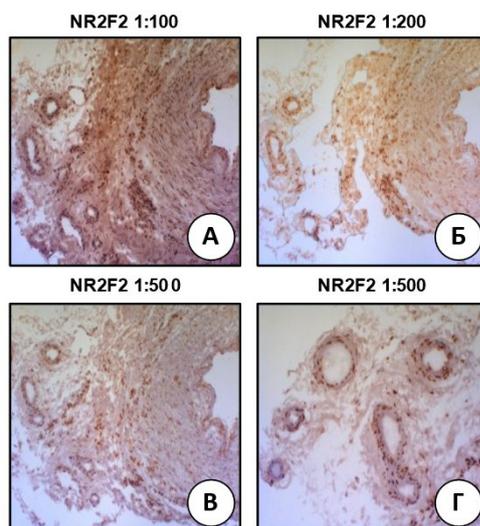


Рисунок 11. Иммуногистохимическое окрашивание большой подкожной вены человека на транскрипционный фактор NR2F2. А – стенка большой подкожной вены, разведение 1:100, ув. x200, Б – стенка большой подкожной вены, разведение 1:200, ув. x200, В – стенка большой подкожной вены, разведение 1:500, ув. x200, Г – vasa vasorum в адвентиции большой подкожной вены, разведение 1:500, ув. x400.

Таким образом, справедливо говорить о неспецифичности описанных в литературе маркеров артериальной, венозной, капиллярной и лимфатической дифференцировки. Часть из них (KLF2, KLF4, LYVE1, VEGFR3, NRP2, NR2F2 и ERG) детектировалась во всех сосудах микроциркуляторного русла (VV) БПВ (KLF2 и NR2F2 – во всей сосудистой стенке, ERG – в ЭК, KLF4, LYVE1, VEGFR3 и NRP2 – в СГМК), еще часть (PROX1, HEY1, HES1) не детектировались вообще либо были экспрессированы чрезвычайно слабо (при этом антитела к данным транскрипционным факторам позволяли детектировать соответствующий и специфичный сигнал в тканях крыс, что свидетельствует о технической валидности эксперимента). Кроме того, транскрипционные факторы артериальной дифференцировки HES1 и ERG также не продемонстрировали приверженности к какому-либо эндотелиальному дифферону даже в тканях аорт крыс: первый из них был экспрессирован во всех сосудистых клеточных популяциях, второй – во всех видах эндотелиальных клеток.

Проведенное исследование показало, что оба выбранных маркера (SM-MHC и α -SMA) характеризуются близким паттерном окрашивания и являются высокоспецифичными для СГМК. Сравнительное иммуноокрашивание на маркеры ЭК и СГМК в контексте детекции сосудов микроциркуляторного русла в соответствии с выдвинутой гипотезой действительно продемонстрировало возможность объективной оценки сосудистой геометрии при окрашивании на SM-MHC или α -SMA вне зависимости от среза, выбранного антитела или типа сосуда (артериола, вена или капилляр), что в сочетании с высокой интенсивностью флуоресцентного сигнала позволяет обосновать использование маркеров СГМК для иммунодетекции VV. Стоит отметить тот факт, что перициты стенки капилляров также окрашивались на SM-MHC или α -SMA по аналогии с СГМК артериол и венул, что делает данные маркеры универсальными для всех видов сосудов микроциркуляторного русла.

Несмотря на использование достаточно широкой палитры молекулярных маркеров (механочувствительные транскрипционные факторы KLF2 и KLF4, транскрипционные факторы артериальной дифференцировки HES1, HEY1 и ERG, транскрипционный фактор венозно-лимфатической дифференцировки PROX1, маркеры венозно-лимфатической дифференцировки LYVE1, VEGFR3 и NRP2, транскрипционный фактор венозной дифференцировки NR2F2) и определенные успехи при анализе их специфичности в адвентиции и околососудистой жировой ткани аорт крыс (в частности, специфичность механочувствительного транскрипционного фактора KLF2 и транскрипционного фактора венозно-лимфатической дифференцировки PROX1 для венул, а также определенная специфичность транскрипционного фактора артериальной дифференцировки HEY1 для капилляров), анализ адвентиции БПВ человека не выявил специфичности какого-либо из вышеуказанных маркеров для артериол, венул или капилляров. При этом транскрипционные факторы PROX1, HEY1 и HES1 экспрессировались в VV БПВ чрезвычайно слабо или не экспрессировались вообще, а транскрипционные факторы KLF2, KLF4 и NR2F2 и белки LYVE1, VEGFR3 и NRP2 экспрессировались в сосудистой стенке вне зависимости от типа

сосуда. Интересным и не сочетающимся с классическими представлениями является тот факт, что экспрессия KLF4, LYVE1, VEGFR3 и NRP2 была ограничена СГМК – как правило, LYVE1 и VEGFR3 рассматривают как маркеры лимфатического эндотелия [109, 110], а NRP2 – как маркер венозного эндотелия [111]. Кроме того, также стоит отметить высокую специфичность транскрипционного фактора артериальной дифференцировки ERG для ЭК и его экспрессию независимо от их дифферона (то есть в артериолах, венулах и капиллярах), при этом такой паттерн наблюдался в адвентиции как аорт крыс, так и БПВ человека. Это позволяет предложить транскрипционный фактор ERG в качестве дополнительного маркера эндотелиальной дифференцировки в дополнение к CD31 и VE-кадгерину.

Таким образом, на текущем уровне научно-технического развития единственным надежным и ясно детектируемым маркером, позволяющим отличить артериолы от венул и капилляров в тканях взрослого человека (по крайней мере, в его кровеносных сосудах и прилежащей к ним жировой ткани), являются эластические мембраны, которые в силу высокой плотности эластина обладают выраженной аутофлюоресценцией в зеленом или синем канале и могут быть специфично окрашены сочетанием хлорида железа и раствора Люголя в сочетании с гематоксилином при пентахромном окрашивании по Расселлу-Мовату (а также, при желании – антителами к эластину). Что касается венул и капилляров, то, вероятно, их различение возможно исключительно на уровне сосудистой геометрии (диаметр просвета сосуда, толщина и форма сосудистой стенки), а также, с некоторой долей вероятности – на уровне ультраструктурных особенностей СГМК венул и капиллярных перицитов. Оба способа не лишены недостатков, поскольку дифференцирование венул и капилляров исключительно на основании геометрии может приводить к недостаточной специфичности для эффективного машинного обучения, а анализ ультраструктуры требует получения электронно-микроскопических изображений, что резко ограничивает широту применения данного метода. К сожалению, ответ на вопрос о специфичности

отдельных белков-маркеров артериальной, венозной и капиллярной дифференцировки в тканях взрослого человека остается туманным.

Наибольшую актуальность проведенное исследование, вероятно, имеет с точки зрения анализа возможной эффективности обучения инструментов искусственного интеллекта (нейронных сетей) для определения и дифференцировки сосудов микроциркуляторного русла. С этой целью для автоматизированной детекции таких сосудов (к примеру, VV) рекомендуется применять пентахромное окрашивание по Расселлу-Мовату, поскольку оно позволяет дифференцировать артериолы от венул и капилляров, различение которых далее, видимо, придется проводить на основе характерных паттернов их геометрии. Поскольку данный вид окрашивания является достаточно редким и, как правило, применяется лишь в профильных лабораториях, дальнейшее обучение нейронных сетей для анализа состояния микроциркуляторного русла представляется целесообразным на основе окрашивания гематоксилином и эозином с обязательным сопоставлением паттерна такого окрашивания с таковым при пентахромном окрашивании по Расселлу-Мовату. Идеальным вариантом такого анализа видится двойное виртуальное окрашивание криосрезов – гематоксилином и эозином и пентахромное по Расселлу-Мовату – при помощи нейронной сети, заранее обученной на определенной выборке.

4. АНАЛИЗ СПОНТАННОГО ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА В КУЛЬТУРЕ ПЕРВИЧНЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПУПОЧНОЙ ВЕНЫ ЧЕЛОВЕКА

Всего было проведено две серии экспериментов: с первичными ЭК пупочной вены человека (HUVES) эндотелиального и мезенхимального морфотипа. HUVES эндотелиального морфотипа имели характерную для ЭК вытянутую, продолговатую форму (так называемая картина «булыжной мостовой») и относительно небольшую размерность (рис. 12А), сохраняя данные признаки на протяжении пассажирования и не обладая существенными отличиями в этом отношении от артериальных ЭК (рис. 12Б). При анализе HUVES мезенхимального морфотипа при фазово-микроскопическом контроле была обнаружена спонтанная смена вышеуказанного эндотелиального морфотипа на мезенхимальный, характеризующаяся выраженным удлинением формы до веретеновидной (рис. 12В), при этом одновременно культивируемые артериальные ЭК сохраняли вышеописанный эндотелиальный морфотип (рис. 12Г).

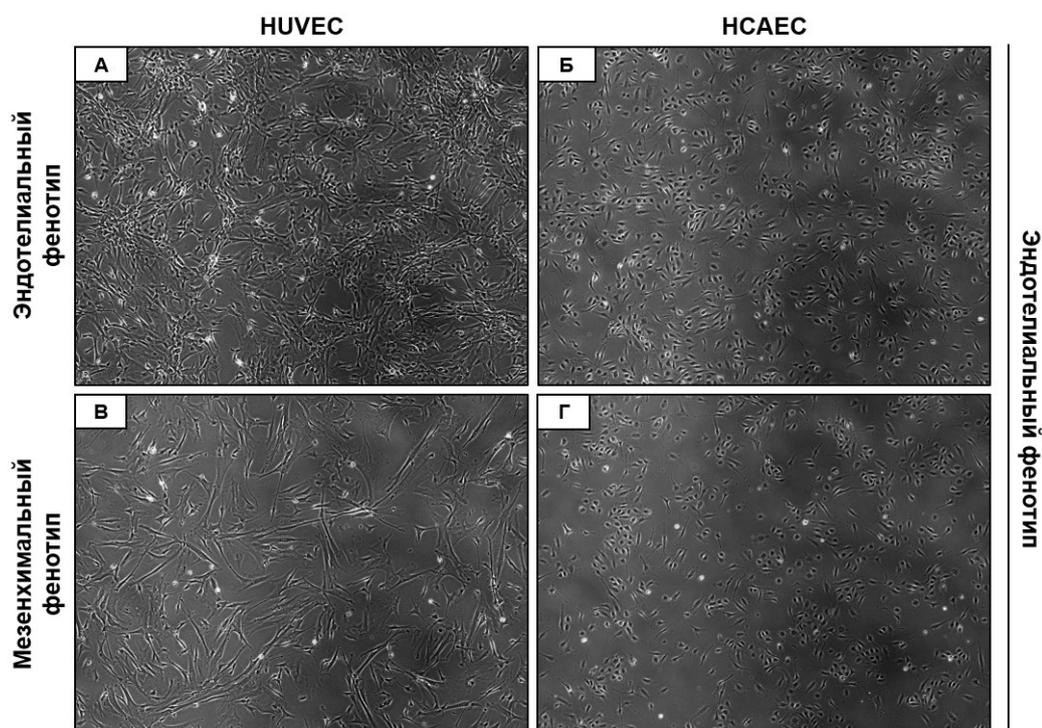


Рисунок 12. Фазово-контрастная микроскопия HUVES и HCAEC в различных сериях экспериментов. А. HUVES эндотелиального фенотипа. Б. HCAEC

эндотелиального фенотипа (культура №1). В. HUVEC мезенхимального фенотипа. Г. HCAEC эндотелиального фенотипа (культура №2).

Было решено провести комплексный анализ данного феномена, используя методы полуколичественной оценки генной и белковой экспрессии, а также иммунофенотипирование с конфокальной микроскопией. Измерение генной экспрессии методом ОТ-кПЦР (табл. 7) показало, что HUVEC из первой серии экспериментов (с эндотелиальным морфотипом) имели классический профиль экспрессии генов эндотелиальных маркеров (*PECAM1*, *CDH5*, *VWF*, *ERG*) и общесосудистых маркеров (*HES1*, *HEY1*, *NRP1*), сопоставимый с первичными ЭК коронарной и внутренней грудной артерии. Следует отметить распространенное в литературе мнение о том, что ассоциированные с сигнальным путем Notch транскрипционные факторы HES1 и HEY1 считаются специфичными маркерами артериальной дифференцировки, что не является верным для ЭК человека во взрослом возрасте. Кроме того, экспрессия генов транскрипционных факторов (*NR2F2*, *PROX1*) и маркеров (*LYVE1*, *FLT4*) венозно-лимфатической дифференцировки также существенно не отличалась между различными линиями ЭК (при этом высокие значения экспрессии демонстрировал лишь ген ключевого транскрипционного фактора венозной дифференцировки *NR2F2*). Функциональное состояние венозных ЭК не демонстрировало существенных отличий от артериальных, хотя венозные ЭК и характеризовались сниженной экспрессией нескольких провоспалительных генов (*VCAM1*, *SELP*, *CXCL8*, *CXCL1*), не имея при этом однозначно гиперэкспрессированных генов провоспалительных молекул. Экспрессия транскрипционных факторов ЭндоМТ, маркеров клеток мезенхимального ряда, маркеров сосудистой гладкомышечной дифференцировки и компонентов внеклеточного матрикса в венозных ЭК находилась на чрезвычайно низком уровне (за исключением гена виментина и, возможно, гена транскрипционного фактора *ZEB1*) и также значимо не отличалась от артериальных ЭК. Полученные результаты свидетельствовали в пользу классического эндотелиального фенотипа HUVEC и их незначительных

функциональных отличий от первичных артериальных ЭК, без какого-либо специфического маркера.

Оценка генной экспрессии HUVES из второй серии экспериментов (с мезенхимальным морфотипом) показала существенное отличие профиля их транскриптов как от параллельно культивируемых HCAEC и HITAEC, так и от HUVES из первой серии экспериментов (с эндотелиальным морфотипом). В частности, HUVES с мезенхимальным морфотипом характеризовались практически полной потерей экспрессии генов маркеров эндотелиального фенотипа *PECAM1*, *CDH5* и *VWF*, а также гена эндотелиального транскрипционного фактора *ERG* на фоне многократного повышения экспрессии генов транскрипционных факторов ЭндоМТ *SNAI2* и *TWIST1* в сравнении с артериальными ЭК и с HUVES эндотелиального морфотипа. В соответствии с этим в HUVES мезенхимального морфотипа также наблюдалось выраженное повышение экспрессии генов мезенхимальных маркеров *FAP* и *S100A4*, а также гена сосудистого гладкомышечного маркера *ACTA2* (кодирующего альфа-актин гладких мышц). Помимо этого, в данных клетках также наблюдалось повышение экспрессии гена *VIM*, кодирующего цитоскелетный белок клеток мезенхимального ряда виментин, однако стоит отметить достаточно высокую базовую экспрессию этого гена в ЭК и обоснованные сомнения в отношении его специфичности как специфического мезенхимального маркера. Следует отметить отсутствие повышения экспрессии в HUVES мезенхимального морфотипа гена *CDH2*, кодирующего N-кадгерин, который зачастую упоминается в литературе как специфичный мезенхимальный белок и маркер ЭндоМТ, а также отсутствие повышения экспрессии генов иных маркеров сосудистого гладкомышечного фенотипа – *SMTN* и *MYH11*. Функциональная значимость ЭндоМТ в HUVES была подтверждена повышением экспрессии генов *COL1A1* и *COL1A2*, кодирующих различные субъединицы основного белка внеклеточного матрикса коллагена I типа, при этом экспрессии генов *COL4A1* и *COL4A2*, кодирующих субъединицы основного белка базальной мембраны коллагена IV типа, не наблюдалось.

По аналогии с первой серией экспериментов, экспрессия генов транскрипционных факторов и маркеров венозно-лимфатической дифференцировки также не различалась между различными линиями ЭК (а относительно высоким уровнем экспрессии все так же характеризовался лишь ген транскрипционного фактора венозной дифференцировки *NR2F2*). В то же время было обнаружено существенное снижение активности транскрипции генов общесосудистой дифференцировки *HES1* и *HEY1* (при этом транскрипция гена рецепторного убиквитарного белка сосудистых клеток *NRP1* не снижалась). Не было выявлено существенных различий касательно экспрессии гена эндотелиальной NO-синтазы (*NOS3*) и генов, ответственных за провоспалительную активацию эндотелия, хотя в отношении экспрессии последних в HUVEC мезенхимального морфотипа наблюдался некоторый сдвиг, характеризовавшийся резким снижением экспрессии гена моноцитарного хемоаттрактантного белка *CCL2* и выраженным повышением экспрессии гена фактора ингибирования миграции макрофагов *MIF*. Кроме того, в HUVEC мезенхимального морфотипа наблюдалось многократное повышение экспрессии гена тканевого активатора плазминогена *PLAT* (эндотелиальное звено гемостаза) и генов атеропротективных транскрипционных факторов эндотелиальной механотрансдукции *KLF4* и *NFE2L2* как в сравнении с артериальными ЭК, так и по сравнению с первой серией экспериментов.

Таблица 7. Измерение генной экспрессии в первичных эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC) в различном функциональном состоянии по сравнению с положительным контролем (первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии человека (HCAEC) и внутренней грудной артерии человека (HITAEC)) методом ОТ-кПЦР. Значения ΔC_t (после нормализации на экспрессию генов «домашнего хозяйства» *ACTB*, *GAPDH*, *B2M*).

Класс молекул / Molecules	Ген / Gene	HCAEC	HITAEC	HUVEC (Эндо) (Endo)	HCAEC	HITAEC	HUVEC (ЭндоMT) (EndoMT)
		HUVEC эндотелиального морфотипа			HUVEC в состоянии эндотелиально-мезенхимального перехода		
	<i>PECAM1</i>	0,1220	0,1965	0,1292	1,2842	0,7204	0,0053

Маркеры и транскрипционные факторы эндотелиальной дифференцировки	<i>CDH5</i>	0,4247	0,5115	0,3053	0,5351	0,6237	0,0020
	<i>VWF</i>	0,1397	0,4895	0,1756	0,1884	0,6831	0,0035
	<i>ERG</i>	0,3770	0,1966	0,2447	0,1811	0,3351	0,002
Маркеры и транскрипционные факторы общесосудистой дифференцировки	<i>HES1</i>	0,0301	0,0295	0,0243	0,0112	0,0171	0,0005
	<i>HEY1</i>	0,0021	0,0050	0,0016	0,0005	0,0356	-
	<i>HEY2</i>	0,0053	0,0003	0,0001	0,0014	-	-
	<i>NRP1</i>	0,4580	0,4196	0,3691	0,3390	0,0848	0,6487
Маркеры и транскрипционные факторы венозно-лимфатической дифференцировки	<i>NR2F2</i>	0,2462	0,1627	0,2752	0,0617	0,0328	0,0654
	<i>PROX1</i>	0,0007	0,0130	0,0036	0,0002	0,0031	0,0004
	<i>LYVE1</i>	0,0016	0,0231	0,0166	0,0005	0,0527	0,0004
	<i>FLT4</i>	0,0025	0,0304	0,0099	0,0015	0,0342	0,0204
	<i>NRP2</i>	0,0036	0,0086	0,0036	0,0014	0,0099	0,0085
Синтез монооксида азота (NO)	<i>NOS3</i>	0,0066	0,0020	0,0015	0,0003	0,0082	0,0009
Рецепторы адгезии лейкоцитов к эндотелию	<i>VCAM1</i>	0,0015	0,0098	0,0002	0,0007	0,0004	0,0003
	<i>ICAM1</i>	0,0050	0,0407	0,0115	0,0117	0,4316	0,0106
	<i>SELE</i>	0,0011	0,0481	0,0038	0,0017	0,1006	0,0002
	<i>SELP</i>	0,0025	0,0044	0,0001	0,0047	0,0003	0,0002
Эндотелиальные провоспалительные цитокины	<i>IL6</i>	0,0029	0,0007	0,0031	0,0033	0,0016	0,0011
	<i>CXCL8</i>	0,0701	0,0557	0,0219	0,0499	0,3480	0,0541
	<i>CCL2</i>	0,0279	0,2563	0,1098	0,1543	2,8119	0,0031
	<i>CXCL1</i>	0,0763	0,0651	0,0292	0,0925	0,1213	0,1106
	<i>MIF</i>	0,2152	0,0812	0,2155	0,0980	0,1547	1,1136
Эндотелиальное звено гемостаза	<i>SERPINE1</i>	3,6637	2,1609	3,6921	1,5035	4,4012	4,1249
	<i>PLAU</i>	0,0028	0,0010	0,0015	0,0047	0,0040	0,0005
	<i>PLAT</i>	0,0120	0,0032	0,0041	0,0018	0,0025	0,1317
Транскрипционные факторы эндотелиальной механотрансдукции	<i>KLF2</i>	0,0018	0,0004	0,0032	0,0007	0,0012	0,0011
	<i>KLF4</i>	0,0010	0,0005	0,0008	0,0014	0,0005	0,0167
	<i>NFE2L2</i>	0,0866	0,0523	0,0860	0,0188	0,0193	0,1436
Транскрипционные факторы эндотелиально-мезенхимального перехода	<i>SNAI1</i>	0,0071	0,0121	0,0110	0,0190	0,0203	0,0055
	<i>SNAI2</i>	0,0002	0,0001	0,0022	0,0225	0,0013	0,5898
	<i>TWIST1</i>	0,0004	0,00001	0,0001	0,0001	0,0002	0,0883
	<i>ZEB1</i>	0,0350	0,0343	0,0503	0,0224	0,0213	0,0420
Маркеры клеток мезенхимального ряда	<i>CDH2</i>	0,0108	0,0028	0,0289	0,0721	0,0010	0,0151
	<i>VIM</i>	11,3684	2,9464	2,4013	2,8573	5,3552	15,1165
	<i>FAP</i>	0,00018	0,000019	0,000022	0,0008	-	0,0260

	<i>SI00A4</i>	0,0005	0,00054	0,0006	0,00067	0,0027	0,0671
Маркеры гладкомышечной дифференцировки	<i>ACTA2</i>	0,0078	0,0016	0,0030	0,0028	0,0020	0,1090
	<i>SMTN</i>	0,0035	0,0016	0,0015	0,00088	0,0032	0,0080
	<i>MYH11</i>	0,00025	0,00013	0,000033	-	-	0,000012
Компоненты внеклеточного матрикса	<i>COL1A1</i>	0,0008	0,000041	0,00152	0,0001	0,0001	0,9703
	<i>COL1A2</i>	0,0018	0,00034	0,00228	0,000082	0,0024	2,6371
Компоненты базальной мембраны	<i>COL4A1</i>	0,1201	0,1460	0,0188	0,0243	0,3731	0,1190
	<i>COL4A2</i>	0,0007	0,0072	0,0008	0,0001	0,0130	-

Результаты скрининга генной экспрессии (табл. 7) подтвердились при анализе экспрессии соответствующих белков методом иммуноблоттинга (рис. 13). В частности, в лизате HUVEC мезенхимального морфотипа не наблюдалось экспрессии эндотелиальных маркеров CD31/PECAM1 и VE-кадгерина, а также транскрипционного фактора эндотелиальной дифференцировки ERG. Вместе с тем в данных клетках наблюдалась сохранная экспрессия убиквитарного сосудистого транскрипционного фактора HES1 и убиквитарного сосудистого белка NRP1, являющегося ко-рецептором к фактору роста сосудистого эндотелия (VEGF). В соответствии с результатами анализа генной экспрессии, экспрессия рецептора ЭК для лейкоцитов ICAM1 была значительно выше в HITAEC, что в совокупности с равной загрузкой (отсутствие различий в экспрессии убиквитарного ядерного белка YY1) подтверждает техническую валидность полученных результатов.

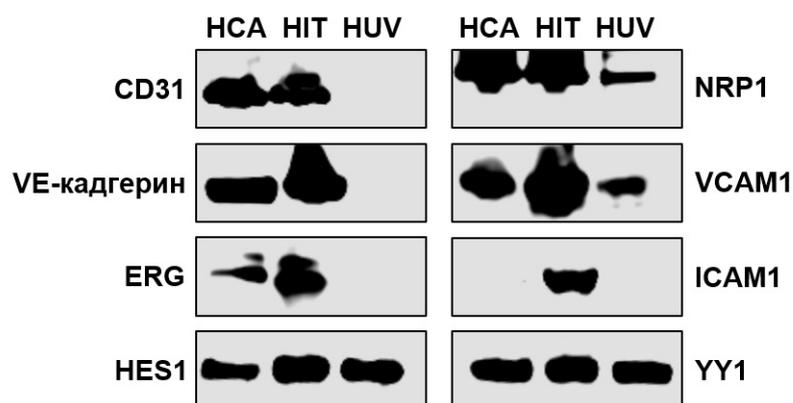


Рисунок 13. Определение экспрессии эндотелиальных маркеров (CD31 и VE-кадгерин), транскрипционного фактора эндотелиальной дифференцировки ERG, транскрипционного фактора (HES1) и убиквитарного рецепторного белка (NRP1)

общесосудистой дифференцировки, рецепторов адгезии эндотелиальных клеток для лейкоцитов (VCAM1 и ICAM1) и ядерного белка «домашнего хозяйства» (YY1, контроль загрузки). Иммуноблоттинг.

С целью наглядной визуализации различий между артериальными эндотелиальными клетками (среди культур которых не было отмечено случаев ЭндоМТ за несколько лет активной работы), HUVEC эндотелиального фенотипа и HUVEC мезенхимального морфотипа было проведено иммунофлюоресцентное окрашивание на ряд специфичных маркеров и транскрипционных факторов эндотелиального фенотипа, мезенхимального фенотипа и ЭндоМТ. Сочетанное окрашивание на эндотелиальный маркер CD31/PESAM1 и маркер сосудистых гладкомышечных клеток (также относящихся к клеткам мезенхимального ряда) альфа-актин гладких мышц (α -SMA) выявило потерю экспрессии CD31/PESAM1 в HUVEC мезенхимального морфотипа, однако экспрессии α -SMA также не отмечалось (рис. 14А). Последующие окрашивания на эндотелиальный белок межклеточных контактов VE-кадгерин (кодируемый геном *CDH5*) и транскрипционный фактор эндотелиальной дифференцировки ERG в сочетании со специфичными маркерами сосудистой гладкомышечной дифференцировки тяжелой цепью миозина гладких мышц (SM-MHC) и смузелина (smoothelin) не обнаружили данных молекул в HUVEC мезенхимального морфотипа (рис. 14Б и 14В), что подтверждает окончательную потерю ими эндотелиального фенотипа, при этом не свидетельствуя в пользу сосудистой гладкомышечной дифференцировки. Положительное окрашивание на коллаген I типа продемонстрировало мезенхимальный фенотип спонтанно трансформированных HUVEC и приобретение ими способности к синтезу компонентов внеклеточного матрикса (рис. 14Г). Окрашивание вторичными антителами в отсутствие каких-либо первичных антител подтвердило высокую специфичность иммунофлюоресцентного сигнала (рис. 14Д).

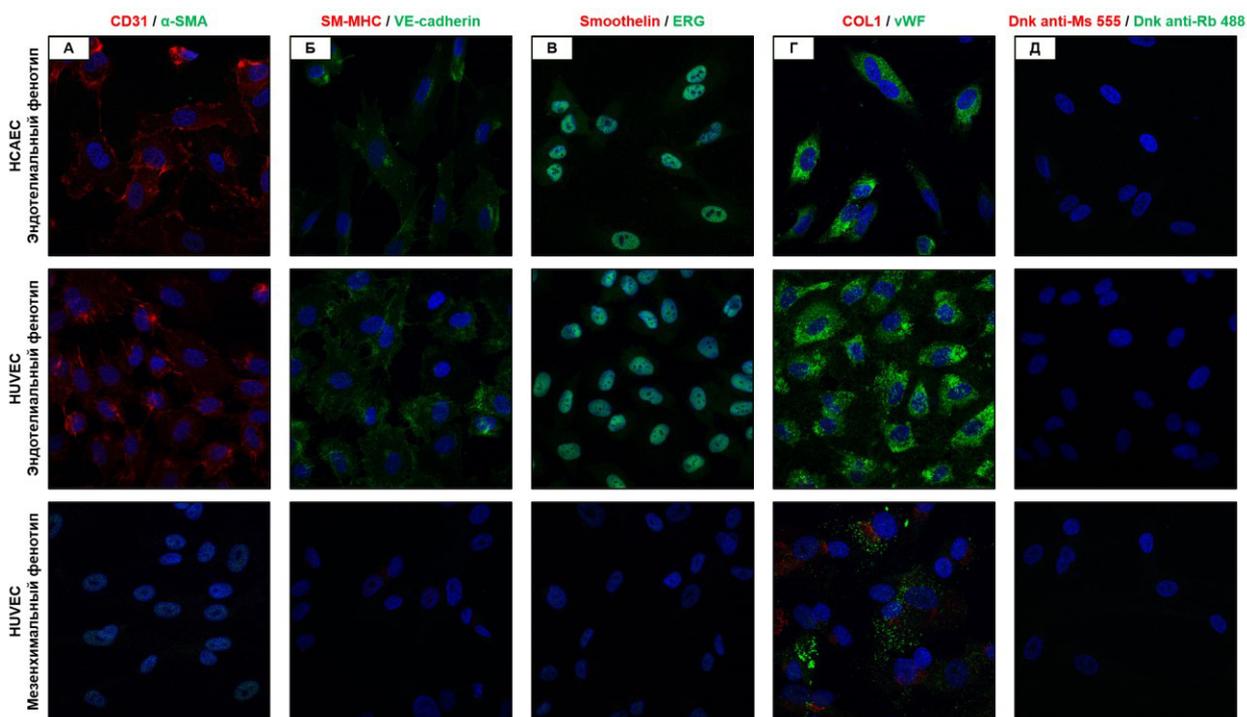


Рисунок 14. Иммунофлуоресцентное окрашивание HCAEC и HUVEC на маркеры эндотелиального и мезенхимального фенотипов: А. CD31 и альфа-актин гладких мышц (α -SMA). Б. VE-кадгерин и тяжелые цепи миозина гладких мышц (SM-MHC). В. Транскрипционный фактор ERG и смузелин (smoothelin). Г. Фактор фон Виллебранда (vWF) и основной компонент межклеточного матрикса коллаген I типа (COL1). Д. Отрицательный контроль.

Таким образом, результаты анализа белковой экспрессии различными методами подтвердили результаты анализа генной экспрессии, в совокупности свидетельствуя о: 1) потере эндотелиального фенотипа на уровне как транскрипционных факторов, так и рецепторных маркеров; 2) приобретении основного функционального признака мезенхимального фенотипа – высокой активности синтеза компонентов внеклеточного матрикса. Вероятнее всего, трансдифференцировка HUVEC в процессе ЭндоМТ постепенно шла в направлении миофибробластного фенотипа (что подтверждается отсутствием экспрессии генов двух специфичных сократительных маркеров – SM-MHC и смузелина в сочетании с одновременной высокой экспрессией генов, кодирующих α -SMA и фибробласт-специфичный белок (S100A4), а также активным синтезом

коллагена I типа). В дополнение к этому, сохранность экспрессии убиквитарных сосудистых маркеров HES1 и NRP1 также позволяет говорить о схожести подвергшихся ЭндоМТ HUVEC с миофибробластами или сосудистыми гладкомышечными клетками синтетического фенотипа внутри неоинтимы.

Результаты анализа генной экспрессии позволили прийти к нескольким интересным с практической точки зрения выводам. Первым из них стало явное очерчивание набора эндотелиальных маркеров (CD31/PESCAM1, CDH5, VWF, ERG), включающих в себя два рецептора (CD31/PESCAM1 и VE-кадгерин/CDH5), запасаемый в тельцах Вайбеля-Паладе цитозольный белок (фактор фон Виллебранда, VWF) и транскрипционный фактор эндотелиальной дифференцировки (ERG). При этом стоит подчеркнуть принципиальную важность дифференцировки специфичных эндотелиальных маркеров (CD31/PESCAM1, CDH5, VWF, ERG) от общесосудистых маркеров, к которым на основании данного исследования целесообразно отнести NRP1 (как убиквитарный рецепторный белок), а также HES1 и HEY1 (транскрипционные факторы сигнального пути Notch).

Вторым значимым выводом стало подтверждение отсутствия специфичности маркеров артериальной и венозно-лимфатической дифференцировки во взрослом возрасте. Согласно данным литературы, к маркерам артериальной дифференцировки относят транскрипционные факторы сигнального пути Notch (HES1, HEY1, HEY2), транскрипционный фактор ERG (также регулирующий программу сигнального пути Notch) и NRP1, являющийся ко-рецептором к VEGF, а к маркерам венозно-лимфатической дифференцировки – транскрипционный фактор COUP-TFII (кодируемый геном *NR2F2* и часто рассматриваемый как специфичный транскрипционный фактор венозной дифференцировки), ко-рецептор к фактору роста сосудистого эндотелия NRP2 (также считаемый более специфичным для вен), транскрипционный фактор PROX1 (рассматриваемый как специфичный транскрипционный фактор лимфатической дифференцировки), рецепторный белок VEGFR3 и мембранный белок LYVE1 (также считаемые более специфичными для лимфатических сосудов). Анализ генной экспрессии показал,

что практически все гены, кодирующие указанные молекулы (*HES1*, *HEY1*, *ERG*, *NRP1*, *NRP2*, *NR2F2*, *PROX1*, *FLT4* и *LYVE1*), экспрессируются во всех линиях артериальных клеток без существенных различий в величине экспрессии.

Третьим выводом стало отсутствие явно выраженной провоспалительной активации при ЭндоМТ, которое часто описывается в литературе. Анализ рецепторов ЭК для лейкоцитов (в первую очередь *VCAM1* и *ICAM1*) не выявил повышения их экспрессии как на генном, так и на белковом уровне при ЭндоМТ в HUVEC. Аналогичные результаты были получены при сравнении экспрессии генов основных эндотелиальных провоспалительных цитокинов (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*); хотя HUVEC в состоянии ЭндоМТ характеризовались сниженным уровнем экспрессии гена *CCL2* и повышенным уровнем экспрессии гена *MIF* в сравнении как с HUVEC вне ЭндоМТ, так и в сравнении с параллельно культивируемыми артериальными эндотелиальными клетками, такой сдвиг сложно однозначно назвать провоспалительным. Безусловно, ЭндоМТ имеет значимые функциональные последствия (о которых пойдет речь ниже), однако данный эксперимент не позволяет отнести к ним провоспалительную активацию подвергшихся ЭндоМТ клеток. Результаты в отношении эндотелиального звена гемостаза и транскрипционных факторов механотрансдукции не вполне однозначны (скорее они говорят в пользу анти-тромботического и анти-атерогенного фенотипа подвергшихся ЭндоМТ клеток), однако основаны исключительно на данных анализа генной экспрессии и поэтому не обладают достаточной доказательностью.

Более важной является идентификация конкретных транскрипционных факторов, ответственных за ЭндоМТ в эндотелиальных клетках. Всего в литературе выделяют пять основных транскрипционных факторов, ответственных за ЭндоМТ: Snail (кодируемый геном *SNAIL1*), Slug (кодируемый геном *SNAIL2*), а также Twist1, Zeb1 и Gata4 (кодируемые одноименными генами) [1-5, 20-24]. Ранние исследования нашей группы показали, что транскрипционный фактор Gata4 не экспрессируется ЭК (данные не показаны), поэтому в молекулярную панель для профилирования генной экспрессии были включены лишь первые

четыре транскрипционных фактора, из которых гиперэкспрессированы при ЭндомТ в HUVEC были два – Slug (*SNAI2*) и Twist1 (*TWIST1*). Анализ белкового лизата ЭК методом иммуноблоттинга не показал присутствия Snail, Slug и Twist1 независимо от линии ЭК, однако кратность различий при измерении генной экспрессии позволяет с уверенностью говорить об идентификации Slug и Twist1 как ключевых транскрипционных факторов ЭндомТ.

Оптимальными маркерами клеток мезенхимального ряда и конкретно ЭндомТ следует считать фибробласт-ассоциированный белок (FAP) и фибробласт-специфичный белок (FSP-1), гены которых (*FAP* и *S100A4*) были гиперэкспрессированы при ЭндомТ в HUVEC и также являются наиболее специфичными маркерами клеток мезенхимального ряда по данным литературы. Большой интерес представляют различия в экспрессии маркеров сосудистого гладкомышечного дифферона – α -SMA, ген которого (*ACTA2*) характеризовался выраженной гиперэкспрессией при ЭндомТ в HUVEC, и смузелина с тяжелой цепью миозина гладких мышц (SM-MHC), гены которых (*SMTN* и *MYH11*) не экспрессировались при ЭндомТ и являются специфическими маркерами сосудистых гладкомышечных клеток сократительного фенотипа по данным литературы. В сочетании с на порядок большей экспрессией генов компонентов внеклеточного матрикса (*COL1A1* и *COL1A2*) и сохранностью экспрессии генов общесосудистых маркеров (*HES1* и *NRP1*) при ЭндомТ в HUVEC это указывает на принципиальную схожесть подвергшихся ЭндомТ HUVEC с миофибробластами неинтимы, которые также характеризуются сочетанной экспрессией α -SMA (ген *ACTA2*), FAP/FSP-1 (гены *FAP* и *S100A4*), коллагена I типа (гены субъединиц *COL1A1* и *COL1A2*) и общесосудистых маркеров (*HES1* и *NRP1*) в сочетании с отсутствием экспрессии специфических сократительных белков смузелина (ген *SMTN*) и SM-MHC (ген *MYH11*), а также эндотелиальных маркеров (*CD31/PECAM1*, VE-кадгерина/*CDH5*, *VWF* и *ERG*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана принципиальная возможность снижать молярную концентрацию общего и ионизированного кальция в пределах физиологической нормы у ApoE-нокаутных мышей путем перорального приема комбинированного препарата – цитрата магния, одновременно обладающего хелатирующим действием и являющегося донором ионов магния. Таким образом, правомерно говорить об успешной коррекции фактора риска развития атеросклероза – уровня кальция, при этом его снижение происходит от верхнего до среднего квартиля физиологической нормы (в пределах 0,05 ммоль/л), что также свидетельствует в пользу безопасности данного экспериментально-терапевтического режима. Успешно проведенная первая очередь доклинических испытаний экспериментальной терапии по коррекции нарушений минерального гомеостаза у ApoE-нокаутных мышей открывает возможности для проведения расширенной второй очереди, которая, помимо цитрата магния, также будет включать пероральный прием протеиногенных аминокислот с разветвлённым строением алифатической боковой цепи (лейцин, изолейцин и валин) как биоматериала для синтеза альбумина. Кроме того, в первую очередь доклинических испытаний вошли пожилые ApoE-нокаутные мыши, в то время как вторая очередь должна в первую очередь включить молодых мышей, профилактика развития атеросклероза у которых будет успешной с большей вероятностью.

Определены факторы риска летального исхода при тяжелом течении COVID-19 – кардиологическая коморбидность (ишемическая болезнь сердца, хроническая сердечная недостаточность) и почечная коморбидность (хроническая болезнь почек 3-5 стадии) в анамнезе, молярная концентрация мочевины в сыворотке крови, уровень С-реактивного белка в сыворотке крови. Проведенный скрининг различных инструментов искусственного интеллекта позволил выделить нейронные сети как инструмент с наибольшей чувствительностью, специфичностью и надежностью (устойчивостью к гетерогенности выборок между различными центрами), а также сгенерировать нейронные сети с точностью

прогнозирования 87% без учета возраста (который сам по себе является независимым фактором риска). Следующим шагом, который уже реализуется, является ретроспективный набор историй болезни с целью формирования сплошной выборки пациентов, на которой будет возможна независимая валидация разработанных нейронных сетей, дополненных возрастом и, вероятно, индексом массы тела либо иным показателем избыточного веса, отраженным в литературе как существенный фактор риска летального исхода при COVID-19.

Разработанный способ детекции сосудов микроциркуляторного русла путем их окрашивания на маркеры сосудистых гладкомышечных клеток (к примеру, α -SMA или SM-MHC) предоставляет возможность адекватной оценки сосудистой геометрии (в частности, площади сосудов, являющейся важной характеристикой при анализе сосудистого воспаления и воспалительного ремоделирования тканеинженерных сосудистых протезов малого диаметра) даже в условиях вазоспазма, которому часто подвергаются капилляры. Указанный способ окрашивания отличается стабильностью (в частности, не зависит от вида сосуда микроциркуляторного русла, происхождения антитела или выбранной флюоресцентной или иммуногистохимической метки) и высоким соотношением «сигнал-шум» в сравнении с классически используемыми для окрашивания сосудов микроциркуляторного русла маркерами эндотелиальных клеток.

Представленный алгоритм детекции эндотелиально-мезенхимального перехода, а также разработанная в целом генная панель для определения дисфункции эндотелия *in vitro* и *in situ*, определяют список молекул для скрининга дисфункции эндотелия. Помимо патофизиологических изысканий, данная разработка имеет непосредственную ценность для анализа актуальности широко обсуждаемого на данный момент феномена эндотелиально-мезенхимального перехода при длительном функционировании искусственных элементов системы кровообращения, а также для анализа культур аутологичных эндотелиальных клеток с точки зрения заселения ими тканеинженерных сосудистых протезов малого диаметра в условиях проточного биореактора.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, Barengo NC, Beaton AZ, Benjamin EJ, Benziger CP, Bonny A, Brauer M, Brodmann M, Cahill TJ, Carapetis J, Catapano AL, Chugh SS, Cooper LT, Coresh J, Criqui M, DeCleene N, Eagle KA, Emmons-Bell S, Feigin VL, Fernández-Solà J, Fowkes G, Gakidou E, Grundy SM, He FJ, Howard G, Hu F, Inker L, Karthikeyan G, Kassebaum N, Koroshetz W, Lavie C, Lloyd-Jones D, Lu HS, Mirijello A, Temesgen AM, Mokdad A, Moran AE, Muntner P, Narula J, Neal B, Ntsekhe M, Moraes de Oliveira G, Otto C, Owolabi M, Pratt M, Rajagopalan S, Reitsma M, Ribeiro ALP, Rigotti N, Rodgers A, Sable C, Shakil S, Sliwa-Hahnle K, Stark B, Sundström J, Timpel P, Tleyjeh IM, Valgimigli M, Vos T, Whelton PK, Yacoub M, Zuhlke L, Murray C, Fuster V; GBD-NHLBI-JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol.* 2020;76(25):2982-3021. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.010.
2. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* 2018;392(10159):1736-1788. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
3. Buddeke J, Bots ML, van Dis I, Liem A, Visseren FLJ, Vaartjes I. Trends in comorbidity in patients hospitalised for cardiovascular disease. *Int J Cardiol.* 2017;248:382-388. doi:10.1016/j.ijcard.2017.06.106.
4. Rahimi K, Lam CSP, Steinhubl S. Cardiovascular disease and multimorbidity: A call for interdisciplinary research and personalized cardiovascular care. *PLoS Med.* 2018;15(3):e1002545. doi: 10.1371/journal.pmed.1002545.
5. Crowe F, Zemedikun DT, Okoth K, Adderley NJ, Rudge G, Sheldon M, Nirantharakumar K, Marshall T. Comorbidity phenotypes and risk of mortality in patients with ischaemic heart disease in the UK. *Heart.* 2020;106(11):810-816. doi: 10.1136/heartjnl-2019-316091.

6. Cruz-Ávila HA, Vallejo M, Martínez-García M, Hernández-Lemus E. Comorbidity Networks in Cardiovascular Diseases. *Front Physiol.* 2020;11:1009. doi: 10.3389/fphys.2020.01009.
7. Lind L, Skarfors E, Berglund L, Lithell H, Ljunghall S. Serum calcium: a new, independent, prospective risk factor for myocardial infarction in middle-aged men followed for 18 years. *J Clin Epidemiol.* 1997;50(8):967-73. doi: 10.1016/s0895-4356(97)00104-2.
8. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Gao Z, Curhan G; Cholesterol And Recurrent Events Trial Investigators. Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation.* 2005;112(17):2627-33. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.553198.
9. Foley RN, Collins AJ, Ishani A, Kalra PA. Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart J.* 2008;156(3):556-63. doi: 10.1016/j.ahj.2008.05.016.
10. Larsson TE, Olauson H, Hagstrom E, Ingelsson E, Arnlov J, Lind L, Sundstrom J. Conjoint effects of serum calcium and phosphate on risk of total, cardiovascular, and noncardiovascular mortality in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(2):333-9. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.196675.
11. McGovern AP, de Lusignan S, van Vlymen J, Liyanage H, Tomson CR, Gallagher H, Rafiq M, Jones S. Serum phosphate as a risk factor for cardiovascular events in people with and without chronic kidney disease: a large community based cohort study. *PLoS One.* 2013;8(9):e74996. doi: 10.1371/journal.pone.0074996.
12. Lutsey PL, Alonso A, Michos ED, Loehr LR, Astor BC, Coresh J, Folsom AR. Serum magnesium, phosphorus, and calcium are associated with risk of incident heart failure: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr.* 2014;100(3):756-64. doi: 10.3945/ajcn.114.085167.
13. Rohrmann S, Garmo H, Malmstrom H, Hammar N, Jungner I, Walldius G, Van Hemelrijck M. Association between serum calcium concentration and risk of

- incident and fatal cardiovascular disease in the prospective AMORIS study. *Atherosclerosis*. 2016;251:85-93. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.004.
- 14.Reid IR, Gamble GD, Bolland MJ. Circulating calcium concentrations, vascular disease and mortality: a systematic review. *J Intern Med*. 2016;279(6):524-40. doi: 10.1111/joim.12464.
- 15.Campos-Obando N, Lahousse L, Brusselle G, Stricker BH, Hofman A, Franco OH, Uitterlinden AG, Zillikens MC. Serum phosphate levels are related to all-cause, cardiovascular and COPD mortality in men. *Eur J Epidemiol*. 2018;33(9):859-871. doi: 10.1007/s10654-018-0407-7.
- 16.Liao F, Folsom AR, Brancati FL. Is low magnesium concentration a risk factor for coronary heart disease? The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart J*. 1998;136(3):480-90. doi: 10.1016/s0002-8703(98)70224-8.
- 17.Reffelmann T, Ittermann T, Dorr M, Volzke H, Reinthaler M, Petersmann A, Felix SB. Low serum magnesium concentrations predict cardiovascular and all-cause mortality. *Atherosclerosis*. 2011;219(1):280-4. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.05.038.
- 18.Joosten MM, Gansevoort RT, Mukamal KJ, van der Harst P, Geleijnse JM, Feskens EJ, Navis G, Bakker SJ; PREVEND Study Group. Urinary and plasma magnesium and risk of ischemic heart disease. *Am J Clin Nutr*. 2013;97(6):1299-306. doi: 10.3945/ajcn.112.054114.
- 19.Qu X, Jin F, Hao Y, Li H, Tang T, Wang H, Yan W, Dai K. Magnesium and the risk of cardiovascular events: a meta-analysis of prospective cohort studies. *PLoS One*. 2013;8(3):e57720. doi: 10.1371/journal.pone.0057720.
- 20.Adebamowo SN, Jimenez MC, Chiuve SE, Spiegelman D, Willett WC, Rexrode KM. Plasma magnesium and risk of ischemic stroke among women. *Stroke*. 2014;45(10):2881-6. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.005917.
- 21.Kunutsor SK, Khan H, Laukkanen JA. Serum magnesium and risk of new onset heart failure in men: the Kuopio Ischemic Heart Disease Study. *Eur J Epidemiol*. 2016;31(10):1035-1043. doi: 10.1007/s10654-016-0164-4.

22. Kieboom BC, Niemeijer MN, Leening MJ, van den Berg ME, Franco OH, Deckers JW, Hofman A, Zietse R, Stricker BH, Hoorn EJ. Serum Magnesium and the Risk of Death From Coronary Heart Disease and Sudden Cardiac Death. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(1):e002707. doi: 10.1161/JAHA.115.002707.
23. Wannamethee SG, Papacosta O, Lennon L, Whincup PH. Serum magnesium and risk of incident heart failure in older men: The British Regional Heart Study. *Eur J Epidemiol.* 2018;33(9):873-882. doi: 10.1007/s10654-018-0388-6.
24. Rodriguez-Ortiz ME, Gomez-Delgado F, Arenas de Larriva AP, Canalejo A, Gomez-Luna P, Herencia C, Lopez-Moreno J, Rodriguez M, Lopez-Miranda J, Almaden Y. Serum Magnesium is associated with Carotid Atherosclerosis in patients with high cardiovascular risk (CORDIOPREV Study). *Sci Rep.* 2019;9(1):8013. doi: 10.1038/s41598-019-44322-z.
25. Rooney MR, Alonso A, Folsom AR, Michos ED, Rebholz CM, Misialek JR, Chen LY, Dudley S, Lutsey PL. Serum magnesium and the incidence of coronary artery disease over a median 27 years of follow-up in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study and a meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2020;111(1):52-60. doi: 10.1093/ajcn/nqz256.
26. Li Q, Chen Q, Zhang H, Xu Z, Wang X, Pang J, Ma J, Ling W, Li D. Associations of serum magnesium levels and calcium-magnesium ratios with mortality in patients with coronary artery disease. *Diabetes Metab.* 2020;46(5):384-391. doi: 10.1016/j.diabet.2019.12.003.
27. Chen X, Zhang Y, Chen Q, Li Q, Li Y, Ling W. Lower Plasma Fetuin-A Levels Are Associated With a Higher Mortality Risk in Patients With Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(11):2213-2219. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309700.
28. Peng W, Zhang C, Wang Z, Yang W. Prediction of all-cause mortality with hypoalbuminemia in patients with heart failure: a meta-analysis. *Biomarkers.* 2019;24(7):631-637. doi: 10.1080/1354750X.2019.1652686.

29. Xie WM, Ran LS, Jiang J, Chen YS, Ji HY, Quan XQ. Association between fetuin-A and prognosis of CAD: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest*. 2019;49(5):e13091. doi: 10.1111/eci.13091.
30. Ronit A, Kirkegaard-Klitbo DM, Dohlmann TL, Lundgren J, Sabin CA, Phillips AN, Nordestgaard BG, Afzal S. Plasma Albumin and Incident Cardiovascular Disease: Results From the CGPS and an Updated Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(2):473-482. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.313681.
31. Seidu S, Kunutsor SK, Khunti K. Serum albumin, cardiometabolic and other adverse outcomes: systematic review and meta-analyses of 48 published observational cohort studies involving 1,492,237 participants. *Scand Cardiovasc J*. 2020;54(5):280-293. doi: 10.1080/14017431.2020.1762918.
32. Pignatelli P, Farcomeni A, Menichelli D, Pastori D, Violi F. Serum albumin and risk of cardiovascular events in primary and secondary prevention: a systematic review of observational studies and Bayesian meta-regression analysis. *Intern Emerg Med*. 2020;15(1):135-143. doi: 10.1007/s11739-019-02204-2.
33. Шишкова Д.К., Матвеева В.Г., Маркова В.Е., Хрячкова О.Н., Индукаева Е.В., Шабает А.Р., Фролов А.В., Кутихин А.Г. Количественная оценка исходной концентрации кальций-фосфатных бионов как скринингового маркера минерального гомеостаза крови у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и у пациентов с хронической болезнью почек. *Российский кардиологический журнал*. 2022. Т. 27. № 12. С. 20-31. DOI: 10.15829/1560-4071-2022-5064.
34. <https://covid19.who.int/> (дата доступа: 27 November 2022).
35. Kamran, F.; Tang, S.; Otles, E.; McEvoy, D.S.; Saleh, S.N.; Gong, J.; Li, BY.; Dutta, S.; Liu, X.; Medford, R.J.; Valley, T.S.; West, L.R.; Singh, K.; Blumberg, S.; Donnelly, J.P.; Shenoy, E.S.; Ayanian, J.Z.; Nallamotheu, B.K.; Sjoding, M.W.; Wiens, J. Early identification of patients admitted to hospital for covid-19 at risk of clinical deterioration: model development and multisite external validation study. *BMJ*. 2022, 376, e068576. <https://doi.org/10.1136/bmj-2021-068576>.

36. Yadaw, A.S.; Li, Y.C.; Bose, S.; Iyengar, R.; Bunyavanich, S.; Pandey, G. Clinical features of COVID-19 mortality: development and validation of a clinical prediction model. *Lancet Digit. Health* 2020, 2, e516–e525. [https://doi.org/10.1016/S2589-7500\(20\)30217-X](https://doi.org/10.1016/S2589-7500(20)30217-X).
37. Rasmy, L.; Nigo, M.; Kannadath, B.S.; Xie, Z.; Mao, B.; Patel, K.; Zhou, Y.; Zhang, W.; Ross, A.; Xu, H.; Zhi, D. Recurrent neural network models (CovRNN) for predicting outcomes of patients with COVID-19 on admission to hospital: model development and validation using electronic health record data. *Lancet Digit. Health* 2022, 4, e415–e425. [https://doi.org/10.1016/S2589-7500\(22\)00049-8](https://doi.org/10.1016/S2589-7500(22)00049-8).
38. Jiao, Z.; Choi, J.W.; Halsey, K.; Tran, T.M.L.; Hsieh, B.; Wang, D.; Eweje, F.; Wang, R.; Chang, K.; Wu, J.; Collins, S.A.; Yi, T.Y.; Delworth, A.T.; Liu, T.; Healey, T.T.; Lu, S.; Wang, J.; Feng, X.; Atalay, M.K.; Yang, L.; Feldman, M.; Zhang, P.J.L.; Liao, W.H.; Fan, Y.; Bai, H.X. Prognostication of patients with COVID-19 using artificial intelligence based on chest x-rays and clinical data: a retrospective study. *Lancet Digit. Health* 2021, 3, e286–e294. [https://doi.org/10.1016/S2589-7500\(21\)00039-X](https://doi.org/10.1016/S2589-7500(21)00039-X).
39. Mei, X.; Lee, H.C.; Diao, K.Y.; Huang, M.; Lin, B.; Liu, C.; Xie, Z.; Ma, Y.; Robson, P.M.; Chung, M.; Bernheim, A.; Mani, V.; Calcagno, C.; Li, K.; Li, S.; Shan, H.; Lv, J.; Zhao, T.; Xia, J.; Long, Q.; Steinberger, S.; Jacobi, A.; Deyer, T.; Luksza, M.; Liu, F.; Little, B.P.; Fayad, Z.A.; Yang, Y. Artificial intelligence-enabled rapid diagnosis of patients with COVID-19. *Nat. Med.* 2020, 26, 1224–1228. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0931-3>.
40. Meraihi, Y.; Gabis, A.B.; Mirjalili, S.; Ramdane-Cherif, A.; Alsaadi, F.E. Machine Learning-Based Research for COVID-19 Detection, Diagnosis, and Prediction: A Survey. *SN Comput. Sci.* 2022, 3, 286. <https://doi.org/10.1007/s42979-022-01184-z>.
41. Ustebay, S.; Sarmis, A.; Kaya, G.K.; Sujan, M. A comparison of machine learning algorithms in predicting COVID-19 prognostics. *Intern. Emerg. Med.* 2022, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11739-022-03101-x>.

42. Fernandes, F.T.; de Oliveira, T.A.; Teixeira, C.E.; Batista, A.F.M.; Dalla Costa, G.; Chiavegatto Filho, A.D.P. A multipurpose machine learning approach to predict COVID-19 negative prognosis in São Paulo, Brazil. *Sci. Rep.* 2021, 11, 3343. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82885-y>.
43. Jimenez-Solem, E.; Petersen, T.S.; Hansen, C.; Hansen, C.; Lioma, C.; Igel, C.; Boomsma, W.; Krause, O.; Lorenzen, S.; Selvan, R.; Petersen, J.; Nyeland, M.E.; Ankarfeldt, M.Z.; Virenfeldt, G.M.; Winther-Jensen, M.; Linneberg, A.; Ghazi, M.M.; Detlefsen, N.; Lauritzen, A.D.; Smith, A.G.; de Bruijne, M.; Ibragimov, B.; Petersen, J.; Lillholm, M.; Middleton, J.; Mogensen, S.H.; Thorsen-Meyer, H.C.; Perner, A.; Helleberg, M.; Kaas-Hansen, B.S.; Bonde, M.; Bonde, A.; Pai, A.; Nielsen, M.; Sillesen, M. Developing and validating COVID-19 adverse outcome risk prediction models from a bi-national European cohort of 5594 patients. *Sci. Rep.* 2021, 11, 3246. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81844-x>.
44. Guan, X.; Zhang, B.; Fu, M.; Li, M.; Yuan, X.; Zhu, Y.; Peng, J.; Guo, H.; Lu, Y. Clinical and inflammatory features based machine learning model for fatal risk prediction of hospitalized COVID-19 patients: results from a retrospective cohort study. *Ann. Med.* 2021, 53, 257–266. <https://doi.org/10.1080/07853890.2020.1868564>.
45. An, C.; Lim, H.; Kim, D.W.; Chang, J.H.; Choi, Y.J.; Kim, S.W. Machine learning prediction for mortality of patients diagnosed with COVID-19: a nationwide Korean cohort study. *Sci. Rep.* 2020, 10, 18716. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75767-2>.
46. Kukar, M.; Gunčar, G.; Vovko, T.; Podnar, S.; Černelč, P.; Brvar, M.; Zalaznik, M.; Notar, M.; Moškon, S.; Notar, M. COVID-19 diagnosis by routine blood tests using machine learning. *Sci. Rep.* 2021, 11, 10738. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90265-9>.
47. Thell, R.; Zimmermann, J.; Szell, M.; Tomez, S.; Eisenburger, P.; Haugk, M.; Kreil, A.; Spiel, A.; Blaschke, A.; Klicpera, A.; Janata, O.; Krugluger, W.; Sebesta, C.; Herkner, H.; Laky, B. Standard blood laboratory values as a clinical support

- tool to distinguish between SARS-CoV-2 positive and negative patients. *Sci. Rep.* 2021, 11, 9365. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88844-x>.
48. AlJame, M.; Imtiaz, A.; Ahmad, I.; Mohammed, A. Deep forest model for diagnosing COVID-19 from routine blood tests. *Sci. Rep.* 2021, 11, 16682. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95957-w>.
49. Abayomi-Alli, O.O.; Damaševičius, R.; Maskeliūnas, R.; Misra, S. An Ensemble Learning Model for COVID-19 Detection from Blood Test Samples. *Sensors (Basel)* 2022, 22, 2224. <https://doi.org/10.3390/s22062224>.
50. Zuin, G.; Araujo, D.; Ribeiro, V.; Seiler, M.G.; Prieto, W.H.; Pintão, M.C.; Dos Santos Lazari, C.; Granato, C.F.H.; Veloso, A. Prediction of SARS-CoV-2-positivity from million-scale complete blood counts using machine learning. *Commun. Med (Lond)*. 2022, 2, 72. <https://doi.org/10.1038/s43856-022-00129-0>.
51. Bottino, F.; Tagliente, E.; Pasquini, L.; Napoli, A.D.; Lucignani, M.; Figà-Talamanca, L.; Napolitano, A. COVID Mortality Prediction with Machine Learning Methods: A Systematic Review and Critical Appraisal. *J. Pers. Med.* 2021, 11, 893. <https://doi.org/10.3390/jpm11090893>.
52. Araújo, D.C, Veloso, A.A, Borges, K.B.G, Carvalho, M.D.G. Prognosing the risk of COVID-19 death through a machine learning-based routine blood panel: A retrospective study in Brazil. *Int. J. Med. Inform.* 2022, 165, 104835. <https://doi.org/10.1016/j.ijmedinf.2022.104835>.
53. Hu, C.; Liu, Z.; Jiang, Y.; Shi, O.; Zhang, X.; Xu, K.; Suo, C.; Wang, Q.; Song, Y.; Yu, K.; Mao, X.; Wu, X.; Wu, M.; Shi, T.; Jiang, W.; Mu, L.; Tully, D.C.; Xu, L.; Jin, L.; Li, S.; Tao, X.; Zhang, T.; Chen, X. Early prediction of mortality risk among patients with severe COVID-19, using machine learning. *Int. J. Epidemiol.* 2021, 49, 1918–1929. <https://doi.org/10.1093/ije/dyaa171>.
54. Vaid, A.; Somani, S.; Russak, A.J.; De Freitas, J.K.; Chaudhry, F.F.; Paranjpe, I.; Johnson, K.W.; Lee, S.J.; Miotto, R.; Richter, F.; Zhao, S.; Beckmann, N.D.; Naik, N.; Kia, A.; Timsina, P.; Lala, A.; Paranjpe, M.; Golden, E.; Danieleto, M.; Singh, M.; Meyer, D.; O'Reilly PF.; Huckins L.; Kovatch P.; Finkelstein J.; Freeman RM.; Argulian E.; Kasarskis A.; Percha B.; Aberg JA.; Bagiella E.; Horowitz, C.R.;

- Murphy, B.; Nestler, E.J.; Schadt, E.E.; Cho, J.H.; Cordon-Cardo, C.; Fuster, V.; Charney, D.S.; Reich, D.L.; Bottinger, E.P.; Levin, M.A.; Narula, J.; Fayad, Z.A.; Just, A.C.; Charney, A.W.; Nadkarni, G.N.; Glicksberg, B.S. Machine Learning to Predict Mortality and Critical Events in a Cohort of Patients With COVID-19 in New York City: Model Development and Validation. *J. Med. Internet Res.* 2020, 22, e24018. <https://doi.org/10.2196/24018>.
55. Bertsimas, D.; Lukin, G.; Mingardi, L.; Nohadani, O.; Orfanoudaki, A.; Stellato, B.; Wiberg, H.; Gonzalez-Garcia, S.; Parra-Calderón, C.L.; Robinson, K.; Schneider, M.; Stein, B.; Estirado, A.; A Beccara, L.; Canino, R.; Dal Bello, M.; Pezzetti, F.; Pan, A; Hellenic COVID-19 Study Group. COVID-19 mortality risk assessment: An international multi-center study. *PLoS One* 2020, 15, e0243262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243262>.
56. Booth, A.L.; Abels, E.; McCaffrey, P. Development of a prognostic model for mortality in COVID-19 infection using machine learning. *Mod. Pathol.* 2021, 34, 522–531. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-00700-x>.
57. Ko, H.; Chung, H.; Kang, W.S.; Park, C.; Kim, D.W.; Kim, S.E.; Chung, C.R.; Ko, R.E.; Lee, H.; Seo, J.H.; Choi, T.Y.; Jaimes, R.; Kim, K.W.; Lee, J. An Artificial Intelligence Model to Predict the Mortality of COVID-19 Patients at Hospital Admission Time Using Routine Blood Samples: Development and Validation of an Ensemble Model. *J. Med. Internet Res.* 2020, 22, e25442. <https://doi.org/10.2196/25442>.
58. Jamshidi, E.; Asgary, A.; Tavakoli, N.; Zali, A.; Setareh, S.; Esmaily, H.; Jamaldini, S.H.; Daaee, A.; Babajani, A.; Sendani Kashi, M.A.; Jamshidi, M.; Jamal Rahi, S.; Mansouri, N. Using Machine Learning to Predict Mortality for COVID-19 Patients on Day 0 in the ICU. *Front. Digit. Health* 2022, 3, 681608. <https://doi.org/10.3389/fdgth.2021.681608>.
59. Guan, X.; Zhang, B.; Fu, M.; Li, M.; Yuan, X.; Zhu, Y.; Peng, J.; Guo, H.; Lu, Y. Clinical and inflammatory features based machine learning model for fatal risk prediction of hospitalized COVID-19 patients: results from a retrospective cohort

- study. *Ann. Med.* 2021, 53, 257–266.
<https://doi.org/10.1080/07853890.2020.1868564>.
60. Li, S.; Lin, Y.; Zhu, T.; Fan, M.; Xu, S.; Qiu, W.; Chen, C.; Li, L.; Wang, Y.; Yan, J.; Wong, J.; Naing, L.; Xu, S. Development and external evaluation of predictions models for mortality of COVID-19 patients using machine learning method. *Neural Comput. Appl.* 2021, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00521-020-05592-1>.
61. Farr, R.J.; Rootes, C.L.; Rowntree, L.C.; Nguyen, T.H.O.; Hensen, L.; Kedzierski, L.; Cheng, A.C.; Kedzierska, K.; Au, G.G.; Marsh, G.A.; Vasan, S.S.; Foo, C.H.; Cowled, C.; Stewart, C.R. Altered microRNA expression in COVID-19 patients enables identification of SARS-CoV-2 infection. *PLoS Pathog.* 2021, 17, e1009759. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009759>.
62. Fraser, D.D.; Patterson, E.K.; Slessarev, M.; Gill, S.E.; Martin, C.; Daley, M.; Miller, M.R.; Patel, M.A.; Dos Santos, C.C.; Bosma, K.J.; O'Gorman, D.B.; Cepinskas, G. Endothelial Injury and Glycocalyx Degradation in Critically Ill Coronavirus Disease 2019 Patients: Implications for Microvascular Platelet Aggregation. *Crit. Care Explor.* 2020, 2, e0194. <https://doi.org/10.1097/CCE.0000000000000194>.
63. Fraser, D.D.; Cepinskas, G.; Slessarev, M.; Martin, C.; Daley, M.; Miller, M.R.; O'Gorman, D.B.; Gill, S.E.; Patterson, E.K.; Dos Santos, C.C. Inflammation Profiling of Critically Ill Coronavirus Disease 2019 Patients. *Crit. Care Explor.* 2020, 2, e0144. <https://doi.org/10.1097/CCE.0000000000000144>.
64. Fraser, D.D.; Slessarev, M.; Martin, C.M.; Daley, M.; Patel, M.A.; Miller, M.R.; Patterson, E.K.; O'Gorman, D.B.; Gill, S.E.; Wishart, D.S.; Mandal, R.; Cepinskas, G. Metabolomics Profiling of Critically Ill Coronavirus Disease 2019 Patients: Identification of Diagnostic and Prognostic Biomarkers. *Crit. Care Explor.* 2020, 2, e0272. <https://doi.org/10.1097/CCE.0000000000000272>.
65. Fraser, D.D.; Cepinskas, G.; Patterson, E.K.; Slessarev, M.; Martin, C.; Daley, M.; Patel, M.A.; Miller, M.R.; O'Gorman, D.B.; Gill, S.E.; Pare, G.; Prassas, I.; Diamandis, E. Novel Outcome Biomarkers Identified With Targeted Proteomic

- Analyses of Plasma From Critically Ill Coronavirus Disease 2019 Patients. *Crit. Care Explor.* 2020, 2, e0189. <https://doi.org/10.1097/CCE.0000000000000189>.
66. Byeon, S.K.; Madugundu, A.K.; Garapati, K.; Ramarajan, M.G.; Saraswat, M.; Kumar-M, P.; Hughes, T.; Shah, R.; Patnaik, M.M.; Chia, N.; Ashrafzadeh-Kian, S.; Yao, J.D.; Pritt, B.S.; Cattaneo, R.; Salama, M.E.; Zenka, R.M.; Kipp, B.R.; Grebe, S.K.G.; Singh, R.J.; Sadighi Akha, A.A.; Algeciras-Schimmich, A.; Dasari, S.; Olson, J.E.; Walsh, J.R.; Venkatakrisnan, A.J.; Jenkinson, G.; O'Horo, J.C.; Badley, A.D.; Pandey, A. Development of a multiomics model for identification of predictive biomarkers for COVID-19 severity: a retrospective cohort study. *Lancet Digit. Health* 2022, 4, e632–e645. [https://doi.org/10.1016/S2589-7500\(22\)00112-1](https://doi.org/10.1016/S2589-7500(22)00112-1).
67. Fraser, D.D.; Cepinskas, G.; Slessarev, M.; Martin, C.M.; Daley, M.; Patel, M.A.; Miller, M.R.; Patterson, E.K.; O'Gorman, D.B.; Gill, S.E.; Oehler, S.; Miholits, M.; Webb, B. Detection and Profiling of Human Coronavirus Immunoglobulins in Critically Ill Coronavirus Disease 2019 Patients. *Crit. Care Explor.* 2021, 3, e0369. <https://doi.org/10.1097/CCE.0000000000000369>.
68. Hahm, C.R.; Lee, Y.K.; Oh, D.H.; Ahn, M.Y.; Choi, J.P.; Kang, N.R.; Oh, J.; Choi, H.; Kim, S. Factors Associated with Worsening Oxygenation in Patients with Non-severe COVID-19 Pneumonia. *Tuberc. Respir. Dis (Seoul)*. 2021, 84, 115–124. <https://doi.org/10.4046/trd.2020.0139>.
69. Juneja, G.K.; Castelo, M.; Yeh, C.H.; Cerroni, S.E.; Hansen, B.E.; Chessum, J.E.; Abraham, J.; Cani, E.; Dwivedi, D.J.; Fraser, D.D.; Slessarev, M.; Martin, C.; McGilvray, S.; Gross, P.L.; Liaw, P.C.; Weitz, J.I.; Kim, P.Y.; COVID-BEACONS investigators. Biomarkers of coagulation, endothelial function, and fibrinolysis in critically ill patients with COVID-19: A single-center prospective longitudinal study. *J. Thromb. Haemost.* 2021, 19, 1546–1557. <https://doi.org/10.1111/jth.15327>.
70. Soya, E.; Ekenel, N.; Savas, R.; Toprak, T.; Bewes, J.; Doganay, O. Pixel-based analysis of pulmonary changes on CT lung images due to COVID-19 pneumonia. *J. Clin. Imaging Sci.* 2022, 12, 6. https://doi.org/10.25259/JCIS_172_2021.

71. Attia, Z.I.; Kapa, S.; Dugan, J.; Pereira, N.; Noseworthy, P.A.; Jimenez, F.L.; Cruz, J.; Carter, R.E.; DeSimone, D.C.; Signorino, J.; Halamka, J.; Chennaiah Gari, N.R.; Madathala, R.S.; Platonov, P.G.; Gul, F.; Janssens, S.P.; Narayan, S.; Upadhyay, G.A.; Alenghat, F.J.; Lahiri, M.K.; Dujardin, K.; Hermel, M.; Dominic, P.; Turk-Adawi, K.; Asaad, N.; Svensson, A.; Fernandez-Aviles, F.; Esakof, D.D.; Bartunek, J.; Noheria, A.; Sridhar, A.R.; Lanza, G.A.; Cohoon, K.; Padmanabhan, D.; Pardo Gutierrez, J.A.; Sinagra, G.; Merlo, M.; Zagari, D.; Rodriguez Escenaro, B.D.; Pahlajani, D.B.; Loncar, G.; Vukomanovic, V.; Jensen, H.K.; Farkouh, M.E.; Luescher, T.F.; Su Ping, C.L.; Peters, N.S.; Friedman, P.A; Discover Consortium (Digital and Noninvasive Screening for COVID-19 with AI ECG Repository). Rapid Exclusion of COVID Infection With the Artificial Intelligence Electrocardiogram. *Mayo Clin. Proc.* 2021, 96, 2081–2094. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2021.05.027>.
72. Boyle EC, Sedding DG, Haverich A. Targeting vasa vasorum dysfunction to prevent atherosclerosis. *Vascul Pharmacol.* 2017; 96–98: 5-10. doi: 10.1016/j.vph.2017.08.003.
73. Mulligan-Kehoe MJ, Simons M. Vasa vasorum in normal and diseased arteries. *Circulation.* 2014; 129(24): 2557–2566. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007189.
74. Xu J, Lu X, Shi GP. Vasa vasorum in atherosclerosis and clinical significance. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(5): 11574-11608. doi: 10.3390/ijms160511574.
75. Herbst M, Holzenbein TJ, Minnich B. Characterization of the vasa vasorum in the human great saphenous vein: a scanning electron microscopy and 3D-morphometry study using vascular corrosion casts. *Microsc Microanal.* 2014; 20(4): 1120–1133. doi: 10.1017/S1431927614001287.
76. Lametschwandtner A, Minnich B, Kachlik D, Setina M, Stingl J. Three-dimensional arrangement of the vasa vasorum in explanted segments of the aged human great saphenous vein: scanning electron microscopy and three-dimensional morphometry of vascular corrosion casts. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004; 281(2): 1372–1382. doi: 10.1002/ar.a.20098.

- 77.Lim C.S., Kiriakidis S., Sandison A., Paleolog E.M., Davies A.H. Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall. *J. Vasc. Surg.* 2013; 58: 219–230. doi: 10.1016/j.jvs.2013.02.240.
- 78.Mollmark JI, Park AJ, Kim J, Wang TZ, Katzenell S, Shipman SL, Zagorchev LG, Simons M, Mulligan-Kehoe MJ. Fibroblast growth factor-2 is required for vasa vasorum plexus stability in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 2644–2651.
- 79.Shi Y, O'Brien JE, Fard A, Mannion JD, Wang D, Zalewski A. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation.* 1996; 94: 1655–1664.
- 80.Shi Y, Pieniek M, Fard A, O'Brien J, Mannion JD, Zalewski A. Adventitial remodeling after coronary arterial injury. *Circulation.* 1996; 93: 340–348.
- 81.Jabs A, Okamoto E, Vinten-Johansen J, Bauriedel G, Wilcox JN. Sequential patterns of chemokine- and chemokine receptor-synthesis following vessel wall injury in porcine coronary arteries. *Atherosclerosis.* 2007; 192: 75–84.
- 82.Moos MP, John N, Gräbner R, Nossmann S, Günther B, Vollandt R, Funk CD, Kaiser B, Habenicht AJ. The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 2386–2391.
- 83.Bäck M, Yurdagul A Jr, Tabas I, Öörni K, Kovanen PT. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol.* 2019; 16(7): 389–406. doi: 10.1038/s41569-019-0169-2.
- 84.Herrmann J, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M, Holmes DR Jr, Richardson DM, Ritman EL, Lerman A. Coronary vasa vasorum neovascularization precedes epicardial endothelial dysfunction in experimental hypercholesterolemia. *Cardiovasc Res.* 2001; 51: 762–766.
- 85.Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, McKenna C, Holmes DR Jr, Schwartz RS, Lerman A. Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 1998; 101: 1551–1556.

86. Ramani P, Dungwa JV, May MT. LYVE1 upregulation and lymphatic invasion correlate with adverse prognostic factors and lymph node metastasis in neuroblastoma. *Virchows Arch.* 2012; 460(2): 183–191. doi: 10.1007/s00428-011-1190-y.
87. Jackson DG, Prevo R, Clasper S, Banerji S. LYVE1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis. *Trends Immunol.* 2001; 22(6): 317–321.
88. Kong LL, Yang NZ, Shi LH, Zhao GH, Zhou W, Ding Q, Wang MH, Zhang YS. The optimum marker for the detection of lymphatic vessels. *Mol Clin Oncol.* 2017 Oct; 7(4): 515–520. doi: 10.3892/mco.2017.1356.
89. Scavelli C, Weber E, Aglianò M, Cirulli T, Nico B, Vacca A, Ribatti D. Lymphatics at the crossroads of angiogenesis and lymphangiogenesis. *J Anat.* 2004; 204(6): 433–449. doi: 10.1111/j.0021-8782.2004.00293.x.
90. Hong YK, Harvey N, Noh YH, Schacht V, Hirakawa S, Detmar M, Oliver G. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn.* 2002; 225: 351–357. doi: 10.1002/dvdy.10163.
91. Schwager S, Detmar M. Inflammation and Lymphatic Function. *Front Immunol.* 2019; 10: 308. doi: 10.3389/fimmu.2019.00308.
92. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 2006; 54(4): 385–395. doi: 10.1369/jhc.4A6514.2005.
93. Müller AM, Hermanns MI, Skrzynski C, Nesslinger M, Müller KM, Kirkpatrick CJ. Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. *Exp Mol Pathol.* 2002; 72(3): 221–229. doi: 10.1006/exmp.2002.2424.
94. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol.* 2016; 23(3): 253–259. doi: 10.1097/MOH.0000000000000239.
95. Kalagara T, Moutsis T, Yang Y, Pappelbaum KI, Farken A, Cladder-Micus L, Vidal-Y-Sy S, John A, Bauer AT, Moerschbacher BM, Schneider SW, Gorzelanny C. The endothelial glycocalyx anchors von Willebrand factor fibers to the vascular

- endothelium. *Blood Adv.* 2018;2(18):2347-2357. doi: 10.1182/bloodadvances.2017013995.
96. Frolov A.V., Terekhov A.A., Bogdanov L.A., Mukhamadiyarov R.A., Kutikhin A.G. Comparative study of vasa vasorum and neointima in conduits for coronary artery bypass grafting. *Angiology and Vascular Surgery.* 2021. Vol. 27. № 2. P. 121–126. doi:10.33529/ANGIO2021218.
97. Li Y, Lui KO, Zhou B. Reassessing endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(8):445-456. doi: 10.1038/s41569-018-0023-y.
98. Kovacic JC, Dimmeler S, Harvey RP, Finkel T, Aikawa E, Krenning G, Baker AH. Endothelial to Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73(2):190-209. doi: 10.1016/j.jacc.2018.09.089.
99. Chen PY, Schwartz MA, Simons M. Endothelial-to-Mesenchymal Transition, Vascular Inflammation, and Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med.* 2020;7:53. doi: 10.3389/fcvm.2020.00053.
100. Alvandi Z, Bischoff J. Endothelial-Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(9):2357-2369. doi: 10.1161/ATVBAHA.121.313788.
101. Peng Q, Shan D, Cui K, Li K, Zhu B, Wu H, Wang B, Wong S, Norton V, Dong Y, Lu YW, Zhou C, Chen H. The Role of Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease. *Cells.* 2022;11(11):1834. doi: 10.3390/cells11111834.
102. Kutikhin AG, Tupikin AE, Matveeva VG, Shishkova DK, Antonova LV, Kabilov MR, Velikanova EA. Human Peripheral Blood-Derived Endothelial Colony-Forming Cells Are Highly Similar to Mature Vascular Endothelial Cells yet Demonstrate a Transitional Transcriptomic Signature. *Cells.* 2020;9(4):876. doi: 10.3390/cells9040876.
103. Ханова М.Ю., Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Кривкина Е.О., Глушкова Т.В., Севостьянова В.В., Кутихин А.Г., Антонова Л.В. Формирование монослоя эндотелиальных клеток на поверхности сосудистого протеза

- малого диаметра в условиях потока. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2021. Т. 23. № 3. С. 101-114.
104. Mukhamadiyarov RA, Bogdanov LA, Glushkova TV, Shishkova DK, Kostyunin AE, Koshelev VA, Shabaev AR, Frolov AV, Stasev AN, Lyapin AA, Kutikhin AG. Embedding and Backscattered Scanning Electron Microscopy: A Detailed Protocol for the Whole-Specimen, High-Resolution Analysis of Cardiovascular Tissues. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:739549. doi: 10.3389/fcvm.2021.739549.
105. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm.* 2016;7(2):27-31. doi: 10.4103/0976-0105.177703.
106. Antonova L, Kutikhin A, Sevostianova V, Velikanova E, Matveeva V, Glushkova T, Mironov A, Krivkina E, Shabaev A, Senokosova E, Barbarash L. bFGF and SDF-1 α Improve In Vivo Performance of VEGF-Incorporating Small-Diameter Vascular Grafts. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021; 14(4): 302. doi: 10.3390/ph14040302.
107. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells.* 2014; 32(6): 1380–9. doi: 10.1002/stem.1661.
108. Thachil J. Dual origins and dual roles for von Willebrand factor. *J Thromb Haemost.* 2021; 19(1): 308–309. doi: 10.1111/jth.15152.
109. Jackson DG. The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. *Trends Cardiovasc Med.* 2003; 13(1): 1–7. doi: 10.1016/s1050-1738(02)00189-5.
110. Heinolainen K, Karaman S, D'Amico G, Tammela T, Sormunen R, Eklund L, Alitalo K, Zarkada G. VEGFR3 Modulates Vascular Permeability by Controlling VEGF/VEGFR2 Signaling. *Circ Res.* 2017; 120(9): 1414–1425. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310477.
111. Alghamdi AAA, Benwell CJ, Atkinson SJ, Lambert J, Johnson RT, Robinson SD. NRP2 as an Emerging Angiogenic Player; Promoting Endothelial Cell

Adhesion and Migration by Regulating Recycling of $\alpha 5$ Integrin. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 395. doi: 10.3389/fcell.2020.00395.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
СПИСОК НАУЧНЫХ ТРУДОВ ПО ТЕМЕ НИР

1. Bogdanov L. Excessive Adventitial and Perivascular Vascularisation Correlates with Vascular Inflammation and Intimal Hyperplasia / L. Bogdanov, D. Shishkova, R. Mukhamadiyarov, E. Velikanova, A. Tsepokina, A. Terekhov, V. Koshelev, A. Kanonykina, A. Shabaev, A. Frolov, N. Zagorodnikov, A. Kutikhin // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – № 20. – P. 12156. DOI: 10.3390/ijms232012156.
2. Frolov A.V. Paracrine Effects of Conditioned Medium during Its Cross-Addition to Arterial and Venous Endothelial Cells / A.V. Frolov, D.K. Shishkova, V.E. Markova, M.Yu. Sinitsky, A.V. Sinitskaya, A.O. Poddubnyak, A.Yu. Kanonykina, N.I. Zagorodnikov, E.V. Grigoriev, A.G. Kutikhin // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2022. – Vol. 58 – № 4. – P. 1180-1192. DOI: 10.1134/S0022093022040214.
3. Kutikhin A.G. Endothelial Dysfunction in the Context of Blood–Brain Barrier Modeling / A.G. Kutikhin, D.K. Shishkova, E.A. Velikanova, M.Yu. Sinitsky, A.V. Sinitskaya, V.E. Markova // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2022 – Vol. 58. – № 3. – P. 781-806. DOI: 10.1134/S0022093022030139.
4. Богданов Л.А. Сократительные белки сосудистых гладкомышечных клеток являются универсальными маркерами сосудов микроциркуляторного русла / Л.А. Богданов, Е.А. Великанова, А.Ю. Каноныкина, А.В. Фролов, Д.К. Шишкова, А.И. Лазебная, А.Г. Кутихин // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2022. – Т. 11. – № 3. – С. 162-176. DOI: 10.17802/2306-1278-2022-11-3-162-176.
5. Мухамадияров Р.А. Возрастное ремоделирование внеклеточного матрикса внутренней грудной артерии у пациентов с сочетанием двух и более факторов сердечно-сосудистого риска / Р.А. Мухамадияров, А.В. Фролов, А.Г. Кутихин // Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика

Б.В. Петровского. – 2022. – Т. 10. - № 2. – С. 33-45. DOI: 10.33029/2308-1198-2022-10-2-33-45.

6. Мухамадияров Р.А. Полиморфизм эндотелиальных клеток на поверхности створок митрального клапана и сосудов микроциркуляторного русла при инфекционном эндокардите / Р.А. Мухамадияров, А.Г. Кутихин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2022. – Т. 66. – № 1. – С. 68-77. DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.68-77.

7. Мухамадияров Р.А. Различия структуры неоинтимы на голометаллическом стенте и заплате из политетрафторэтилена у детей после двухэтапной хирургической коррекции тетрады Фалло / Р.А. Мухамадияров, А.В. Евтушенко, Р.С. Тарасов, И.К. Халивопуло, А.А. Ляпин, А.Г. Кутихин // Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского. – 2022. – Т. 10. – № 3. – С. 64-75. DOI: 10.33029/2308-1198-2022-10-3-64-75.

8. Шишкова Д.К. Случай спонтанного эндотелиально-мезенхимального перехода в культуре первичных эндотелиальных клеток пупочной вены человека / Д.К. Шишкова, А.В. Синицкая, М.Ю. Синицкий, В.Г. Матвеева, Е.А. Великанова, В.Е. Маркова, А.Г. Кутихин // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2022. – Т. 11. – № 3. – С. 97-114. DOI: 10.17802/2306-1278-2022-11-3-97-114.

9. Кутихин А.Г. Концепция и механизмы патогенного действия кальций-фосфатных бионов на систему кровообращения: автореф. дис. ... д-ра мед.наук. /А.Г. Кутихин. Омск - 2022. - 48 с.

10. Гаситель белковой и липидной аутофлюоресценции и способ его получения и применения при иммунофлюоресцентном окрашивании тканей и клеток / Богданов Л. А., Великанова Е. А., Кутихин А. Г.; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Науч.-исслед. ин-т комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (RU). - № 2022131330; заявл. 30.11.2022.