

# Диагностика периферического атеросклероза на основании определения концентрации циркулирующих биомаркеров

Н. С. Синкевич<sup>1</sup>, М. А. Масленников<sup>2</sup>, О. С. Булкина<sup>1</sup>, Ю. А. Карпов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ, Москва

<sup>2</sup> ГКБ №1 им. Н. И. Пирогова, Москва

## Абстракт

*Атеросклероз артерий нижних конечностей — тяжелое инвалидизирующее заболевание, приводящее к ишемии конечностей и являющееся основной причиной нетравматических ампутаций. Ввиду не всегда характерной клинической картины заболевания на ранних стадиях или ее отсутствия зачастую лечение иницируется уже при тяжелом поражении, тогда, когда спасти конечность позволяет только хирургическое вмешательство. В настоящее время существует необходимость в выделении специфичных для периферического атеросклероза биомаркеров. Диагностика периферического атеросклероза на основании анализа крови на ранних стадиях проще и дешевле, чем проведение инструментальных исследований, и позволит вовремя принять необходимые меры, назначив адекватное лечение.*

**Ключевые слова:** периферический атеросклероз, циркулирующие биомаркеры, С-реактивный белок, интерлейкин-6, бета-2-микроглобулин.

## Peripheral atherosclerosis diagnostics by the circulating biomarkers determination

N. S. Sinkevich<sup>1</sup>, M. A. Maslennikov<sup>2</sup>, O. S. Bulkina<sup>1</sup>, Yu. A. Karpov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Russian Cardiologic Research Complex, Moscow, Russia

<sup>2</sup> City Clinical Hospital №1 named after N. I. Pirogov, Moscow, Russia

## Abstract

*Lower extremities atherosclerosis — severe disabling disease, which leads to ischemia of the extremities. Peripheral atherosclerosis is the main cause of non-traumatic amputations. Due to different clinical features or asymptomatic, the disease is often underdiagnosed at the early stages and the treatment is initiated already in severe defeat when only surgery allows the limb salvage. Currently there is a strong need for specific biomarkers of peripheral atherosclerosis determination. Diagnosis of peripheral atherosclerosis by analyzing blood in the early stages is easier and cheaper than instrumental examination and can help prescribe adequate treatment to prevent severe complications.*

**Keywords:** peripheral atherosclerosis, circulating biomarkers, C-reactive protein, interleukin-6, beta2-microglobulin.

## Актуальность проблемы

Сердечно-сосудистые заболевания уже несколько десятилетий занимают лидирующее место в структуре смертности в развитых странах. Прежде всего речь идет об осложнениях ишемической болезни сердца, однако атеросклеротическое поражение других артериальных бассейнов и сопутствующие им осложнения также ассоциированы с высоким уровнем смертности и инвалидизации

населения, нанося не только социальный, но и экономический ущерб [1].

Облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей — хроническое, медленно прогрессирующее заболевание. В зависимости от степени поражения и уровня скомпрометированного артериального сегмента заболевание может сопровождаться как клинической симптоматикой различной степени выраженности, так и протекать бессимптомно, часто манифестируя остро в виде

развития тромботической окклюзии, критической ишемии и угрозы потери конечности [2].

Согласно ряду европейских эпидемиологических исследований, отражающих ситуацию и в нашей стране, частота развития облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей в старшей возрастной группе (60–90 лет) достигает 18 %; клиника перемежающейся хромоты при этом регистрируется лишь у трети пациентов [3–4]. Распространенность заболеваемости составляет 1 000 случаев на миллион населения в год [5]. Наряду с болями в ногах при ходьбе и в покое атеросклероз артерий нижних конечностей приводит к появлению трофических дефектов кожи и мягких тканей и выраженному снижению качества жизни [6]. Периферическая артериальная недостаточность, в том числе бессимптомная, является независимым предиктором сердечно-сосудистой смерти и ассоциирована с повышенным риском острого инфаркта миокарда, острого нарушения мозгового кровообращения, разрыва аневризмы аорты [7].

Вовремя начатое медикаментозное лечение, направленное на коррекцию факторов риска (прекращение курения, антитромбоцитарная и гиполипидемическая терапия, строгий контроль уровня артериального давления, глюкозы крови при сопутствующем сахарном диабете) позволяет снизить риск прогрессирования заболевания и развития осложнений [8]. Однако в настоящее время первичная диагностика облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей проводится далеко не всегда, ввиду часто нечеткой клинической картины или ее отсутствия (только треть пациентов имеет классическую клинику перемежающейся хромоты) и большей ориентированности врача на сопутствующие заболевания [9].

Измерение лодыжечно-плечевого индекса давления (ЛПИД) – неинвазивный метод, позволяющий определять наличие гемодинамически значимых стенозов магистральных артерий нижних конечностей с чувствительностью до 90 % и специфичностью до 99 % [10]. Измеренный однократно ЛПИД менее 0,8 или средняя результирующая трех измерений менее 0,9 имеет 95%-ную прогностическую точность. Уровень ЛПИД также говорит о тяжести заболевания и ассоциирован с прогнозом заболевания – при ЛПИД менее 0,5 достоверно выше риск развития необходимости в ампутации конечности, а снижение ЛПИД более чем на 0,15 свидетельствует о снижении перфузии и прогрессировании атеросклеротического поражения [11]. Измерение ЛПИД в качестве скринингового метода у пациентов группы высокого риска рекомендовано Европейским обществом кардиологов [5].

Однако несмотря на рекомендации, в рутинную практику профилактических осмотров и диспансеризаций, особенно в нашей стране, метод так и не вошел по ряду причин, в том числе из-за необходимости оснащения первичного врачебного звена специальным оборудованием.

К тому же у ряда пациентов измерение и интерпретация ЛПИД бывает затруднена ввиду выраженного кальциноза стенки артерии, ее нежимаемости при нагнетании манжеты. В таких случаях приходится прибегать к дополнительным, более дорогостоящим методам исследования.

В настоящее время изучается возможность выделения особой панели биохимических маркеров, ассоциированных с периферическим атеросклерозом, что позволило бы отбирать пациентов высокого риска на ранних стадиях заболевания для проведения специализированного обследования и соответствующего лечения.

### **Факторы, ассоциированные с периферическим атеросклерозом**

В популяционных исследованиях был выделен целый ряд биохимических маркеров, ассоциированных с периферическим атеросклерозом, в частности медиаторы воспаления цитокины и хемокины [12], маркеры эндотелиальной дисфункции [13–14], факторы ангиогенеза [15], липопротеиды [16], регуляторы метаболических процессов, маркеры оксидативного стресса [17], ишемического и реперфузионного повреждения, факторы коагуляции [18–19]. Следует добавить, что ни один из исследуемых факторов не оказался строго специфичным для периферического атеросклероза, поскольку являлся ассоциированным с кардиоваскулярным риском в целом.

### **С-реактивный белок и провоспалительные цитокины**

В 90-е годы XX века был опубликован целый ряд работ, посвященных изучению медиаторов воспаления при периферическом атеросклерозе. Было доказано, что повышенный уровень С-реактивного белка у практически здоровых людей ассоциирован с повышенным риском развития в будущем атеросклероза артерий нижних конечностей, что подтверждало ключевую роль воспаления в развитии и прогрессировании атеросклероза [20]. Также существует большое количество работ об С-реактивном белке как предикторе общей сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности [21–23]. Помимо С-реактивного белка, широко исследовались другие маркеры воспаления, такие как провоспалительный цитокин интерлейкин-6, растворимые молекулы адгезии: внутриклеточная молекула адгезии – 1, сосудистая молекула адгезии – 1, Е-селектин.

Из всех цитокинов наиболее изучены провоспалительные и проатерогенные свойства интерлейкина-6. Эффекторные функции интерлейкина-6 заключаются в стимуляции дифференцировки моноцитов в макрофаги, регуляции экспрессии генов острофазных белков в гепатоцитах и макрофагах, стимуляции продукции макрофагами

фактора некроза опухоли – альфа, стимуляции пролиферации гладкомышечных клеток [24]. В небольшом исследовании у пациентов с перемежающейся хромотой уровень интерлейкина-6 был достоверно выше до и после физической нагрузки по сравнению с группой контроля [25]. В другом исследовании у пациентов с сахарным диабетом и атеросклерозом артерий нижних конечностей, по сравнению с группой диабета без атеросклероза, достоверно чаще встречался гомозиготный (GG) генотип гена интерлейкина-6 и также выше была концентрация свободного цитокина в плазме [26]. Исследователи предположили, что генотип GG гена интерлейкина-6 ассоциирован с развитием периферического атеросклероза у пациентов с сахарным диабетом, повышая синтез интерлейкина-6 и стимулируемых им белков острой фазы, например С-реактивного белка. Также повышенная концентрация интерлейкина-6 была обнаружена в группе пожилых пациентов со сниженным ЛПИД [27]. Интерлейкин-6 также является независимым предиктором развития сахарного диабета и артериальной гипертензии – заболеваний, ассоциированных с атеросклерозом. Кроме того, интерлейкин-6 можно отнести к цитокинам, связанным с повышенным риском общей сердечно-сосудистой заболеваемости. По результатам семилетнего проспективного когортного исследования Health ABC выявлена связь интерлейкина-6 со всеми конечными точками в группе пациентов старшего возраста (коронарная болезнь сердца, ишемический инсульт, застойная сердечная недостаточность) [28].

Фактор некроза опухоли (ФНО) альфа – провоспалительный цитокин, влияющий на клетки сосудистого эндотелия. Фактор реализует свой эффект через два основных рецептора клеточной мембраны – TNFR1 и TNFR2, причем проатерогенные свойства фактора реализуются через второй тип рецепторов [29]. ФНО-альфа опосредует индуцированное взаимодействие эндотелиальных клеток с лейкоцитами, что облегчает процессы адгезии и миграции последних. У пациентов с перемежающейся хромотой и критической ишемией конечности был продемонстрирован повышенный уровень рецептора ФНО второго типа по сравнению с контрольной группой [30].

### Факторы адгезии

Другие потенциальные маркеры периферического атеросклероза – это молекулы адгезии и селектины. Молекулы адгезии принимают участие в формировании атеросклеротического поражения и в последующем разрыве бляшки. Е-селектин участвует в первичной адгезии лейкоцитов в местах воспаления, тогда как внутриклеточная и сосудистая молекулы адгезии облегчают процесс миграции лейкоцитов в стенку сосуда [31]. Проведенные исследования по содержанию и активности молекул

адгезии у больных с периферическим атеросклерозом в основном небольшие или перекрестного характера [32].

В достаточно крупном Edinburg Artery Study было показано, что С-реактивный белок, интерлейкин-6 и внутриклеточная молекула адгезии – 1 являются независимыми предикторами развития и прогрессирования атеросклероза артерий нижних конечностей в течение двенадцати лет, причем более сильная связь установлена для интерлейкина-6 [33].

### Факторы коагуляции

Также в качестве предикторов развития периферического атеросклероза рассматривались факторы коагуляции, такие как фибриноген, Д-димер, фактор фон Виллебранда и тканевый активатор плазминогена. Фибриноген – маркер воспалительного ответа острой фазы, активатор тромбоцитов, один из основных факторов, определяющих вязкость крови, а также компонент атеросклеротической бляшки. У пациентов с нарушенным углеводным обменом концентрация фибриногена, Д-димера, фактора фон Виллебранда и тканевого активатора плазминогена достоверно выше в группе с сопутствующим периферическим атеросклерозом [34]. В ряде исследований было показано, что у пациентов с периферическим атеросклерозом и ишемией конечности нарушен каскад коагуляции, что выражается в повышенном уровне факторов свертывания крови. Повышенный уровень ингибитора активатора плазминогена – маркера, ассоциированного со всеми формами атеротромбоза [35], – приводит к накоплению фибрина, что, в свою очередь, активирует эндогенную систему антикоагуляции, это выражается в повышении уровня тканевого активатора плазминогена. У пациентов с хронической ишемией нижних конечностей достоверно выше уровень факторов гемостаза, причем физическая нагрузка у них стимулирует образование тромбина и комплекса тромбин-антитромбин-III [36].

### Факторы роста сосудов

Периферический атеросклероз ассоциирован с ишемией конечностей разной степени выраженности и, соответственно, с процессом коллатерального ангиогенеза. Степень выраженности ангиогенеза определяет клиническую картину заболевания. Недостаточный коллатеральный кровоток выражается в более тяжелом проявлении ишемии конечности. Способностью регулировать коллатеральный ангиогенез обладает целый ряд проангиогенных факторов и ингибиторов ангиогенеза [37].

Фактор роста сосудистого эндотелия А (VEGF-A) – вероятно, наиболее важный проангиогенный фактор, принимающий участие как в физиологическом [38], так и в патологическом

ангиогенезе (например, при опухолевом росте) [39]. Действие VEGF-A реализуется через ряд рецепторов, прежде всего рецептор типа 1 (VEGFR-1), а также косвенно через рецепторы тирозинкиназы 2 типа (Tie2). Лигандами последних является в частности ангиопоэтин-2, выработка которого регулируется VEGF [40]. Изоформа VEGF165 – основной эндотелиальный фактор роста в человеческих тканях, который стимулирует ангиогенез при гипоксии и увеличивает сосудистую проницаемость. Различные концентрации факторов ангиогенеза и их рецепторов могут служить маркерами периферической артериальной недостаточности и степени ее тяжести. У пациентов с периферическим атеросклерозом достоверно выше концентрация в плазме крови ангиопоэтина-2, VEGF и растворимого Tie2 по сравнению с контрольной группой, причем по уровню VEGF можно отличить пациентов с критической ишемией конечности от больных с перемежающейся хромотой [41].

### Поиск специфических биомаркеров. Бета-2-микроглобулин

Как было упомянуто ранее, большинство маркеров являются предикторами сердечно-сосудистой заболеваемости в целом, ввиду общности патогенеза атеросклероза в различных сосудистых бассейнах, однако особенности периферического кровообращения и различия в экспрессии генов сосудистого эндотелия и гладкомышечных клеток сосудов наводят на мысли о существовании специфического биомаркера или панели биомаркеров. Как было показано, эндотелийзависимая вазодилатация и спазм гладкомышечных клеток в ответ на ряд медиаторов различаются в артериях нижних конечностей и сердце [42–43]. Кроме того, существуют данные об отличиях в экспрессии генов в эндотелиальных клетках различной локализации и их гетерогенности [44].

Одним из недавно обнаруженных маркеров периферического атеросклероза является бета-2-микроглобулин, который, по имеющимся данным, может претендовать на роль селективного предиктора развития и степени тяжести заболевания.

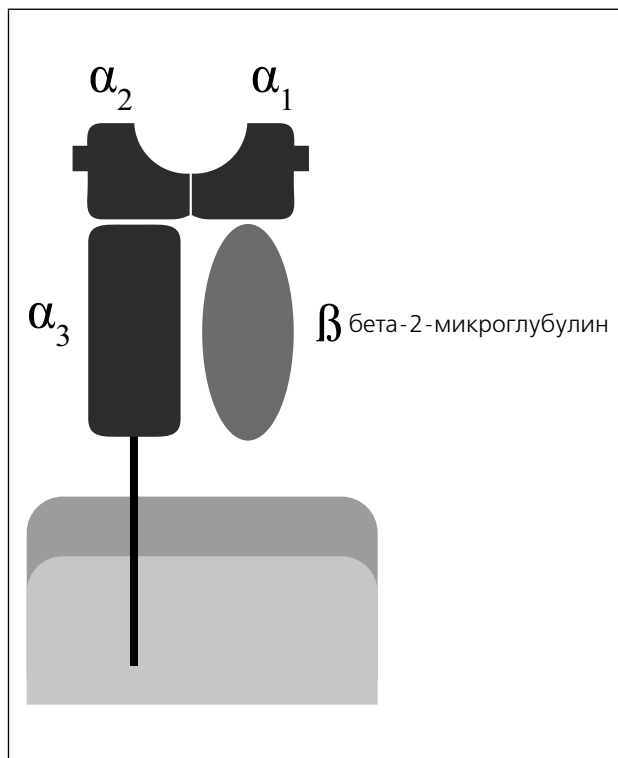
Бета-2-микроглобулин (B2M) представляет собой негликозилированный полипептид с молекулярной массой 11,7 кДа, состоящий из 99 аминокислотных остатков (рис. 1).

B2M относится к первому классу молекул главного комплекса гистосовместимости клеточной мембраны всех эукариотических клеток, взаимодействуя с альфа-цепью главного комплекса гистосовместимости и стабилизируя ее третичную структуру (рис. 2) [45]. Поскольку B2M нековалентно связан с альфа-цепью и не имеет прямой связи с клеточной мембраной, свободная его форма высвобождается в кровотоки, а затем элиминируется почками. В норме концентрация B2M обычно ниже 2 нг/мл, суточная экскреция с мочой не превышает 400 нг.

**Рис. 1.** Структура человеческого бета-2-микроглобулина



**Рис. 2.** Бета-2-микроглобулин в структуре главного комплекса гистосовместимости



Уровень B2M в плазме повышен у пациентов с почечной недостаточностью, амилоидозом почек, находящихся на гемодиализе, при различных

аутоиммунных, неопластических и инфекционных заболеваниях [46–47]. Поскольку В2М, вероятно, играет роль в воспалительном и иммунном ответе, этим может объясняться его повышение при периферическом атеросклерозе. В исследовании Wilson et al. было показано, что измеренная методом иммуноферментного анализа концентрация В2М в плазме и сыворотке достоверно выше у пациентов с периферическим атеросклерозом по сравнению с сопоставимой группой контроля. Плазменный уровень В2М показал отрицательную корреляцию с уровнем ЛПИД. Логарифмически измененный уровень В2М и курение оказались независимыми предикторами уровня ЛПИД в данном исследовании. Также была выявлена связь В2М с расчетной скоростью клубочковой фильтрации, сахарным диабетом 2 типа, гиперлипидемией и индексом массы тела [48]. В работе Kals et al. выявлена прямая значимая связь уровня В2М у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей с показателями артериальной жесткости (максимальная скорость пульсовой волны на аорте, индекс аугментации на аорте) независимо от других сердечно-сосудистых факторов риска [49].

В исследовании Cook et al. выявлены повышение уровня В2М у пациентов с периферическим атеросклерозом и выраженная обратная связь с проходимой дистанцией по данным нагрузочного теста на тредмиле. Среди пациентов с документированной ишемической болезнью сердца уровень В2М был повышен у больных со сниженным ЛПИД, что говорит о бета-2-микроглобулине как о селективном маркере периферического атеросклероза, не связанном с поражением другого сосудистого бассейна [50].

Ряд исследований последних лет направлен на выделение панели биомаркеров, максимально ассоциированных с периферическим атеросклерозом. Downing et al. показали, что совокупность таких биомаркеров, как В2М, цистатин-С и С-реактивный белок, в сочетании с определением связанных с сердечно-сосудистой заболеваемостью однонуклеотидных полиморфизмов хромосомы 9p21 ассоциированы с периферическим атеросклерозом и дают возможность стратифицировать риск при данном заболевании [51]. Исследованные в данной работе маркеры с разных сторон отражают процесс периферического атерогенеза: биохимические факторы отражают степень ишемического и реперфузионного повреждения тканей, воспалительной реакции в стенке сосуда, тогда как генетический анализ позволяет оценить

отдаленный прогноз и, возможно, ожидаемую продолжительность жизни.

В 2014 году были опубликованы результаты крупного исследования по типу случай-контроль, в котором принимали участие около 50 000 человек без сердечно-сосудистого и почечного анамнеза, предоставивших образцы крови в период с 1990 по 1994 год. Данное исследование показало проспективную связь уровня бета-2-микроглобулина с развитием в течение 15 лет хронической ишемии нижних конечностей как у мужчин, так и у женщин [52].

## Заключение

Атеросклероз артерий нижних конечностей – тяжелое заболевание, приводящее к ишемии конечности и являющееся основной причиной нетравматических ампутаций. Ввиду не всегда характерной клинической картины заболевания на ранних стадиях или ее отсутствия зачастую лечение начинается уже при тяжелом поражении, тогда, когда спасти конечность позволяет только хирургическое вмешательство.

В настоящее время существует необходимость в выделении биомаркеров, специфичных для периферического атеросклероза. Диагностика периферического атеросклероза на основании анализа крови на ранних стадиях проще и дешевле, чем проведение инструментальных исследований, и позволяет вовремя принять необходимые меры, назначив адекватное лечение.

Вероятнее всего, это будут биомаркеры, циркулирующие системно, но отражающие активность локальных патофизиологических процессов. Биомаркер должен быть стабильным, относительно недорогим и простым в измерении, а также иметь достаточную диагностическую и/или прогностическую точность. В современных условиях поиск биомаркеров облегчается быстрым развитием технологического прогресса, биоинформатики и биоинженерии, что позволяет анализировать большое количество образцов крови из различных клинических исследований, определяя множество различных факторов. Применение этих технологий для поиска маркера периферического атеросклероза крайне оправдано, так как они помогут более глубоко понять патофизиологический процесс периферического атеросклероза и усовершенствовать подходы к диагностике и лечению этого тяжелого заболевания.

## Список литературы

1. *Rational pharmacotherapy of cardiovascular diseases. Guidelines for clinicians ed. Chazov EI, Karpov YA. 2nd ed, M.: Litterra; 2014. Russian (Рациональная фармакотерапия сердечно-сосудистых заболеваний. Руководство для практикующих врачей под ред. Чазова Е.И., Карпова Ю.А., 2-е издание, М.: Литтерра; 2014).*
2. *National guidelines for management of patients with vascular arterial pathology (Russian consensus document). Part 1: Peripheral artery. Ed. Bakulev national surgery centre; 2010. Russian (Национальные рекомендации по ведению пациентов с сосудистой артериальной патологией (Российский согласительный документ). Часть 1. Периферические артерии. – М.: Изд-во НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН; 2010).*
3. *Sigvant B, Wiberg-Hedman K, Bergqvist D, Rolandsson O, Andersson B, Persson E, Wahlberg E. A population-based study of peripheral arterial disease prevalence with special focus on critical limb ischemia and sex differences. J Vasc Surg 2007;45:1185-91.*
4. *Brevetti G, Oliva G, Silvestro A, Scopacasa F, Chiariello M. Prevalence, risk factors and cardiovascular comorbidity of symptomatic peripheral arterial disease in Italy. Atherosclerosis. 2004;175:131-8.*
5. *ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases. Eur Heart J. 2011; 32:2851-906.*
6. *McDermott MM, Liu K, Greenland P, Guralnik JM, Criqui MH, Chan C, Pearce WH, Schneider JR, Ferrucci L, Celis L, Taylor LM, Vonesh E, Martin GJ, Clark E. Functional decline in peripheral arterial disease: associations with the ankle brachial index and leg symptoms. Jama. 2004;292:453-61.*
7. *Newman AB, Shemanski L, Manolio TA, Cushman M, Mittelmark M, Polak JF, Powe NR, Siscovick D. Ankle-arm index as a predictor of cardiovascular disease and mortality in the Cardiovascular Health Study. The Cardiovascular Health Study Group. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19:538-45.*
8. *Gornik HL, Creager MA. Contemporary management of peripheral arterial disease: I. Cardiovascular risk-factor modification. Cleve Clin J Med. 2006;73 (4):30-7.*
9. *Hirsch AT, Murphy TP, Lovell MB, Twillman G, Treat-Jacobson D, Harwood EM, Mobler ER 3rd, Creager MA, Hobson RW 2nd, Robertson RM, Howard WJ, Schroeder P, Criqui MH; Peripheral Arterial Disease Coalition. Gaps in public knowledge of peripheral arterial disease: the first national PAD public awareness survey. Circulation 2007;116:2086-94.*
10. *Dachun Xu, Jue Li, Liling Zou, Yawei Xu, Dayi Hu, Pagoto SL, Yunsheng Ma. Sensitivity and specificity of the ankle-brachial index to diagnose peripheral artery disease: a structured review. Vasc Med. 2010;15(5):361-9.*
11. *Schroder F, Diehm N, Kareem S, Ames M, Pira A, Zwettler U, Lawall H, Diehm CA. A modified calculation of ankle-brachial pressure index is far more sensitive in the detection of peripheral arterial disease. J Vasc Surg 2006;44: 531-6*
12. *Murabito JM, Keyes MJ, Guo CY, Keaney JF Jr, Vasani RS, D'Agostino RB Sr, Benjamin EJ. Cross-sectional relations of multiple inflammatory biomarkers to peripheral arterial disease: The Framingham Offspring Study. Atherosclerosis 2009;203(2):509-14.*
13. *Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. Circulation. 1999;99:1141-6.*
14. *Brevetti G, Schiano V, Chiariello M. Cellular adhesion molecules and peripheral arterial disease. Vasc Med. 2006;11:39-47.*
15. *Findley CM, Mitchell RG, Duscha BD, Annex BH, Kontos CD. Plasma levels of soluble Tie2 and vascular endothelial growth factor distinguish critical limb ischemia from intermittent claudication in patients with peripheral arterial disease. J Am Coll Cardiol. 2008;52:387-93.*
16. *Tsimikas S, Kiechl S, Willeit J, Mayr M, Miller ER, Kronenberg F, Xu Q, Bergmark C, Weger S, Oberhollenzer F, Witztum JL. Oxidized phospholipids predict the presence and progression of carotid and femoral atherosclerosis and symptomatic cardiovascular disease: five-year prospective results from the Bruneck study. J Am Coll Cardiol. 2006;47:2219-28.*
17. *Lofredo L, Marcocchia A, Pignatelli P, Andreozzi P, Borgia MC, Cangemi R, Chiarotti F, Violi F. Oxidative-stress-mediated arterial dysfunction in patients with peripheral arterial disease. Eur Heart J. 2007;28:608-12.*
18. *Vidula H, Tian L, Liu K, Criqui MH, Ferrucci L, Pearce WH, Greenland P, Green D, Tan J, Garside DB, Guralnik J, Ridker PM, Rifai N, McDermott MM. Biomarkers of inflammation and thrombosis as predictors of near-term mortality in patients with peripheral arterial disease: a cohort study. Ann Intern Med. 2008;148:85-93.*
19. *Lee AJ, MacGregor AS, Hau CM, Price JF, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG. The role of haematological factors in diabetic peripheral arterial disease: the Edinburgh artery study. Br J Haematol. 1999;105:648-54.*
20. *Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Andreozzi P, Borgia MC, Cangemi R, Chiarotti F, Violi F. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. Circulation. 1998;97:425-8.*
21. *Folsom AR, Aleksic N, Catellier D, Juneja HS, Wu KK. C-reactive protein and incident coronary heart disease in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. Am Heart J. 2002; 144: 233-8.*
22. *Danes J, Wheeler JG, Hirschfeld GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V. C-reactive*

- protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2004; 350: 1387-97.
23. Paniugova EV, Aleksandrova EN, Nasonov EL, Karpov IuA. Atherosclerotic lesion of the vessels in patients with stable coronary artery disease: relations with concentration of C-reactive protein. *Kardiologiya* 2009;49(4):40-5. Russian (Паниугова ЕВ, Александрова ЕН, Насонов ЕЛ, Карпов ЮА. Атеросклеротическое поражение сосудов у больных со стабильным течением ишемической болезни сердца: связь с С-реактивным белком. *Кардиология* 2009;49(4):40-5).
  24. Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol.* 2000; 1:510-4.
  25. Signorelli SS, Mazzarino MC, Di Pino L, Malaponte G, Porto C, Pennisi G, Marchese G, Costa MP, Digrandi D, Celotta G, Virgilio V. High circulating levels of cytokines (IL-6 and TNF $\alpha$ ), adhesion molecules (VCAM-1 and ICAM-1) and selectins in patients with peripheral arterial disease at rest and after a treadmill test. *Vasc Med.* 2003;8(1):15-9.
  26. Libra M, Signorelli SS, Bevelacqua Y, Navolanic PM, Bevelacqua V, Polesel J, Talamini R, Stivala F, Mazzarino MC, Malaponte G. Analysis of G(-174)C IL-6 polymorphism and plasma concentrations of inflammatory markers in patients with type 2 diabetes and peripheral arterial disease. *J Clin Pathol.* 2006;59(2):211-5.
  27. McDermott MM, Guralnik JM, Corsi A, Albay M, Macchi C, Bandinelli S, Ferrucci L. Patterns of inflammation associated with peripheral arterial disease: the InCHIANTI study. *Am Heart J.* 2005;150(2):276-81.
  28. Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, Rubin SM, Ding J, Simonsick EM, Harris TB, Pabor M. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation.* 2003;108(19):2317-22.
  29. Chandrasekharan UM, Mavrakis L, Bonfield TL, Smith JD, DiCorleto PE. Decreased atherosclerosis in mice deficient in tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor-II (p75). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(3):16-7.
  30. Fiotti N, Giansante C, Ponte E, Delbello C, Calabrese S, Zacchi T, Dobrina A, Guarnieri G. Atherosclerosis and inflammation. Patterns of cytokine regulation in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis.* 1999;145(1):51-60.
  31. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and Atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2003;170:191-203.
  32. De Caterina R, Basta G, Lazzerini G, Dell'Omo G, Dell'Omo G, Petrucci R, Morale M, Carmassi F, Pedrinelli R. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 as a bihumoral correlate of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2646-54.
  33. Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG. C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh Artery Study. *Circulation.* 2005;112:976-83.
  34. Lee AJ, MacGregor AS, Hau CM, Price JF, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG. The role of haematological factors in diabetic peripheral arterial disease: the Edinburgh artery study. *Br J Haematol.* 1999;105(3):648-54.
  35. Dawson S, Henney A. The status of PAI-1 as a risk factor for arterial and thrombotic disease: a review. *Atherosclerosis.* 1992;95:105-17.
  36. Mustonen P, Lepöntalo M, Lassila R. Physical exertion induces thrombin formation and fibrin degradation in patients with peripheral atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(2):244-9.
  37. Starostin IV, Talitski KA, Bulkina OS, Parfenova EV, Karpov IuA. Collateral blood flow in the myocardium: the role of endothelial growth factor. *Kardiologiya.* 2012;52(11):49-55. Russian (Старостин ИВ, Талицкий КА, Булкина ОС, Карпов ЮА. Коллатеральный кровоток в миокарде: роль фактора роста эндотелия сосудов. *Кардиология* 2012;52(11):49-55).
  38. Talitski KA, Karpov IuA, Parfenova EV. Therapeutic angiogenesis in the treatment of ischemia of lower extremities. *Kardiologiya.* 2007;47(12):81-5. Russian (Талицкий КА, Карпов ЮА, Парфенова ЕВ. Терапевтический ангиогенез в лечении ишемии нижних конечностей. *Кардиология.* 2007;47(12):81-5).
  39. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004;25:581-611.
  40. Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M, Honda Y. Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1999;274:15732-9.
  41. Findley CM, Mitchell RG, Duschka BD, Annex BH, Kontos CD. Plasma Levels of Soluble Tie2 and VEGF Distinguish Critical Limb Ischemia from Intermittent Claudication in Patients with Peripheral Arterial Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(5):387-93.
  42. Vanhoutte PM, Miller VM. Heterogeneity of endothelium-dependent responses in mammalian blood vessels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1985;7(3):S12-23.
  43. Luscher TF, Cooke JP, Houston DS, Neves RJ, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent relaxations in human arteries. *Mayo Clin Proc.* 1987;62:601-6.

44. Aird WC. *Endothelial Cell Heterogeneity*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012;2(1):a006429. doi:10.1101/csbperspect.a006429.
  45. Braciale TJ. *Antigen processing for presentation by MHC class I molecules*. *Curr Opin Immunol*. 1992;4:59-62.
  46. Alexanian R, Barlogie B, Fritsche H. *Beta-2-microglobulin in multiple myeloma*. *Am J Hematol*. 1985;20:345-51.
  47. Cooper EH, Plesner T. *Beta-2-microglobulin review: its relevance in clinical oncology*. *Med Pediatr Oncol*. 1980;8:323-34.
  48. Wilson AM, Kimura E, Harada RK, Nair N, Narasimhan B, Meng XY, Zhan F, Beck KR, Olin JW, Fung ET, Cooke JP.  *$\beta$ 2-Microglobulin as a Biomarker in Peripheral Arterial Disease*. *Proteomic Profiling and Clinical Studies*. *Circulation*. 2007;116:1396-403.
  49. Kals J, Zagura M, Serg M, Kampus P, Zilmer K, Unt E, Lieberg J, Eha J, Peetsalu A, Zilmer M. *2-microglobulin, a novel biomarker of peripheral arterial disease, independently predicts aortic stiffness in these patients*. *Scand J Clin Lab Invest*. 2011;71(4):257-63.
  50. Cooke JP, Wilson AM. *Biomarkers of Peripheral Arterial Disease* *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(19):2017-23.
  51. Downing KP, Nead KT, Kojima Y, Assimes T, Maegdefessel L, Quertermous T, Cooke JP, Leeper NJ. *The combination of 9p21.3 genotype and biomarker profile improves a peripheral artery disease risk prediction model*. *Vasc Med*. 2014;19(1):3-8.
  52. Joosten MM, Pai JK, Bertola ML, Gansevoort RT, Bakker SJ, Cooke JP, Rimm EB, Mukamal KJ. *2-microglobulin, cystatin C, and creatinine and risk of symptomatic peripheral artery disease*. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(3):e00144.
-