

## ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора медицинских наук, руководителя лаборатории медицинской генетики Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации Собенина Игоря Александровича на диссертационную работу Богданова Льва Александровича на тему «Роль кровоснабжения сосудистой стенки в патогенезе васкулита, формирования неоинтимы и прогрессирования атеросклероза крупных сосудов (экспериментально-клиническое исследование)», представленную на соискание Ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3. – патологическая физиология

Диссертационная работа Богданова Льва Александровича посвящена изучению связи нарушений кровоснабжения сосудистой стенки с развитием васкулита, формированием неоинтимы и прогрессированием атеросклеротического поражения крупных сосудов и выполнена в дизайне экспериментально-клинического исследования.

### **Актуальность выполненного исследования**

Атеросклероз является глобально распространенной и клинически значимой патологией, вносящей наиболее заметный вклад в показатели заболеваемости и смертности в современном обществе. Изучение тонких механизмов атерогенеза – важная медико-социальная задача, любой из аспектов решения которой заслуживает внимания. Эндотелиальная дисфункция, представляющая собой локальное патологическое изменение проницаемости эндотелиального барьера, является одним из

патогенетических факторов развития атеросклероза. Последствиями эндотелиальной дисфункции являются моноцитарно-макрофагальная инфильтрация, локальное хроническое воспаление и гиперплазия интимы, то есть формирование морфологического субстрата для возникновения и развития атеросклеротических поражений. При этом наблюдается также неоваскуляризация участков адвентиции и меди, подлежащих под атеросклеротическими поражениями интимы. Новообразованные *vasa vasorum* могут служить анатомическими путями транспортировки иммунных клеток в очаг локального хронического воспаления, участвуя таким образом в атерогенезе. Остается неясным, в какой степени изменения количественных параметров неоваскуляризации могут быть связаны с воспалительными изменениями артериальной стенки и гиперплазией интимы, а также в какой степени дисфункция эндотелия может быть ассоциирована с процессами неоваскуляризации. В данном исследовании высказано предположение, что неоваскуляризация может потенцировать развитие васкулита и атеросклеротического поражения сосудов, при этом объем кровоснабжения может отражать активность патологических процессов.

Все вышеизложенное указывает на несомненную актуальность проведенного соискателем исследования.

### **Новизна исследования и полученных результатов, их достоверность**

Соискателем проведено оригинальное экспериментально-клиническое исследование, в результате которого охарактеризована возможность использования маркерных белков гладкомышечных клеток для анализа состояния кровоснабжения сосудистой стенки, использования плотности миелопероксидаза-положительных клеточных кластеров для оценки воспалительных изменений. На животной модели выявлены статистические связи интенсивности кровоснабжения, активности васкулита и формирования неоинтимы; сходные ассоциации обнаружены при анализе клинического

материала при ишемической болезни сердца и атеросклерозе сонных артерий. Также установлено, что на животной модели индуцированная *in vivo* дисфункция эндотелия стимулирует процессы неоваскуляризации в аспекте повышения кровоснабжения сосудистой стенки и развития васкулита. Научная новизна полученных результатов несомненна; их достоверность определяется качественным и адекватным использованием комплекса современных способов моделирования повреждения сосудистой стенки у лабораторных животных, методов гистологических, иммуногистохимических и электронно-микроскопических исследований.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Положения, выносимые на защиту, и выводы по результатам диссертационного исследования в целом корректно сформулированы и основаны на достаточном объеме экспериментальных данных. Полнота и глубина анализа собственного материала в достаточной мере обосновывает выводы и рекомендации, вытекающие из полученных автором диссертации результатов. Основные результаты исследования в достаточной степени прошли апробацию и обсуждение на научных и научно-практических конференциях различного уровня.

### **Значимость для науки и практики результатов диссертации, возможные конкретные пути их использования**

Теоретическая значимость работы состоит в выявлении основных связей показателей неоваскуляризации, локального воспаления и гиперплазии интимы, а также в демонстрации влияния индуцированной дисфункции эндотелия на процессы неоваскуляризации и кровоснабжения артериальной стенки. Новые знания могут быть использованы в дальнейших

экспериментальных исследованиях с целью качественного и количественного анализа показателей кровоснабжения и воспаления сосудистой стенки. Тем не менее, возможные конкретные пути практического использования результатов диссертации неочевидны.

### **Оценка содержания диссертации**

Диссертационная работа Богданова Льва Александровича написана в традиционном формате и изложена на 136 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав собственных исследований, заключения, общих выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа хорошо и наглядно проиллюстрирована, содержит 45 рисунков и 3 таблицы. Список цитируемой литературы включает 178 библиографических источников, среди которых, к сожалению, нет статей из российских журналов, и есть только 4 статьи от российских научных коллективов, опубликованные в международных научных изданиях, что отчасти отражает доминирование работ зарубежных авторов в мировом публикационном потоке.

Во введении сформулированы актуальность, степень разработанности темы исследования, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, ключевые характеристики методологии и методов исследования с указанием личного вклада соискателя, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов, а также представлены сведения о публикациях по теме исследования, об объеме и структуре диссертации, об апробации материалов диссертации.

Обзор литературы (первая глава) состоит из 4 частей, написан вполне качественно и обобщает современные представления о физиологическом значении *vasa vasorum*, их морфофункциональных особенностях, патогенетической роли кровоснабжения сосудистой стенки в развитии

васкулита, атеросклероза, сосудистого стеноза после операции коронарного шунтирования и при аневризме аорты, а также о подходах к ингибированию внутрисосудистого неоангиогенеза.

Во второй главе описаны материалы и методы исследований, используемые в диссертационной работе.

В третьей главе представлены собственные результаты разработки методических подходов к анализу кровоснабжения и воспаления сосудистой стенки. В частности, подробно описан оптимизированный протокол окрашивания сосудов микроциркуляторного русла с дифференцировкой различных типов *vasa vasorum*; обосновано окрашивание ткани антителами к гладкомышечному альфа-актину и тяжелым цепям миозина гладких мышц для объективной оценки сосудистой геометрии вне зависимости от вазоспазма или артефактов гистологической пробоподготовки; экспериментально установлено, что миелопероксидаза-положительные кластеры допустимо использовать в качестве маркеров локального воспаления; представлены данные о принципиальном отличии таких кластеров от структурных компонентов симпатического нервного ствола, обеспечивающего сосудистую иннервацию.

В четвертой главе представлены собственные результаты исследований параметров кровоснабжения, формирования неоинтимы и адвентициального и периваскулярного воспаления при повреждении артерии путем баллонной ангиопластики на животной модели у крыс линии Wistar. Установлено, что механическое повреждение артерии приводит к увеличению количественных метрик воспаления сосудистой стенки, количества и плотности CD45-положительных клеток в адвентиции. Корреляция данных показателей демонстрирует их патогенетическую значимость в развитии воспаления в адвентиции. Показано, что сочетание баллонного повреждения с дисфункцией эндотелия, индуцированной с помощью кальций-фосфатных бионов, приводит к увеличению количества и площади миелопероксидаза-положительных кластеров в адвентиции и периваскулярной жировой ткани,

неоваскуляризации адвентиции и повышением интенсивности кровоснабжения.

В пятой главе представлены собственные результаты изучения связи интенсивности кровоснабжения сосудистой стенки с гиперплазией интимы в кондуитах для коронарного шунтирования, а также электронно-микроскопического анализа атеросклеротических бляшек, иссеченных из сонных артерий больных с каротидным атеросклерозом. Выявлено, что предсуществующая гипертрофия интимы более характерна для большой подкожной вены, чем для внутренней грудной артерии, что может свидетельствовать о склонности вены к адвентициальному воспалению и последующему формированию интимальной гиперплазии. При этом показатели количества и плотности *vasa vasorum* коррелировали с диффузным интимальным утолщением в обоих типах кондуитов, что может указывать на возможный риск развития воспаления сосудистой стенки и формирования гиперплазии интимы. Изучение взаимного расположения *vasa plaquorum* и кальцификатов в атеросклеротических бляшках позволило сделать вывод о том, что для стабильного фенотипа атеросклеротической бляшки характерно развитие кальцификации с замедлением роста бляшки и активным местным кровоснабжением вокруг кальцификатов, а активное общее кровоснабжение бляшки ассоциировано со стенозом сосудистого просвета. То есть активное общее кровоснабжение атеросклеротического поражения связано с нестабильным фенотипом бляшки, стенозом и повышенным риском неблагоприятных сосудистых событий.

Каждая глава диссертации завершается резюме, вкратце отражающими наиболее значимые результаты данной части исследования.

Заключение и выводы соответствуют основным результатам проведенных автором исследований и раскрывают поставленные в диссертационном исследовании задачи и цель.

Основные результаты исследования представлены в 11 опубликованных работах, в том числе, в 7 статьях в изданиях, входящих в перечень

рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России. Среди статей стоит отметить 5 публикаций в рецензируемых изданиях, индексируемых в международной базе данных Scopus, 2 – в международной базе данных Web of Science. В 2 статьях соискатель является первым автором. Автореферат и опубликованные работы отражают основное содержание диссертации.

Диссертационная работа выполнена на хорошем научном уровне, представленные результаты изложены последовательно, логично и грамотно. Обращает на себя внимание качественное оформление диссертации с практическим отсутствием опечаток, орфографических, грамматических и стилистических ошибок.

В процессе ознакомления с работой возникли некоторые замечания и требующие пояснения вопросы, в целом носящие дискуссионный характер.

1. В диссертации недостаточно четко сформулирована рабочая гипотеза, ради проверки которой и было запланировано и выполнено данное исследование. Приходится предполагать, как отмечено выше, что ключевым является предположение о том, что неоваскуляризация может потенцировать развитие васкулита и атеросклеротического поражения сосудов, и при этом объем кровоснабжения может отражать активность патологических процессов. Недостаточные научные познания в той или иной области науки не могут являться полноценным обоснованием для проведения исследования.

2. Использование термина «неоинтима» в ряде случаев не имеет достаточного обоснования. У лабораторных крыс, использованных в качестве животной модели, интимальный слой в интактных артериях чаще всего отсутствует – имеется лишь однослойная эндотелиальная выстилка на базальной эндотелиальной мембране, которая прилегает непосредственно к внутренней эластической мембране, за которой следует медия. Иногда между эндотелиальной выстилкой и внутренней эластической мембраной

встречаются одиночные гладкомышечные клетки, заключенные в соединительнотканый матрикс. Толщина интимы определяется расстоянием от базальной мембраны сосудистого эндотелия до внутренней эластической мембраны. Таким образом, говорить о формировании неоинтимы можно лишь в тех случаях, когда имеются результаты микроскопии и морфометрии (появление нескольких слоев клеток с измеряемой толщиной интимального слоя); такие данные в результатах не приведены. У взрослого человека интимальный слой артерий хорошо выражен, но использование термина «неоинтима» недопустимо, поскольку не существует анатомической границы между нормальными и гипертрофированными участками. Правильнее использовать термин «диффузное интимальное утолщение».

3. Следует отметить, что оценка интенсивности воспаления по наличию миелопероксидаза-положительных кластеров, их размеру и плотности расположения является своего рода суррогатным способом, поскольку присутствие других клеточных маркеров воспаления не подтверждается автором; при этом миелопероксидаза не является специфичным маркером воспаления.

4. В работе не приведены критерии оценки миелопероксидаза-положительных кластеров, например, их размера, интенсивности окраски и количества клеток, входящих в кластер.

5. Вызывает недоумение заявление от том, что «показана высокая чувствительность и специфичность маркерных белков сосудистых гладкомышечных клеток при анализе состояния кровоснабжения сосудистой стенки». Как таковая, оценка чувствительности и специфичности данных показателей классическими методами статистики в сравнении с другими маркерами не была проведена, или же эти результаты не приведены в диссертации.

6. Использование кальций-фосфатных бионов в качестве индукторов эндотелиальной дисфункции основано на многолетнем опыте работы научного коллектива, в котором состоит соискатель. Однако в работе оценка



эффективности индукции не проводилась (или данные не приведены в диссертации), то есть возникновение эндотелиальной дисфункции было принято *a priori*. Это может быть ограничением для интерпретации результатов исследования. Для сравнения, эффективность баллонной ангиопластики в отношении повреждения артерии с последующим формированием неоинтимы составляла только 50% (явно низкий показатель, и причины такого результата в обсуждении не рассматриваются).

7. Некоторым описанным в главе 4 корреляциям уделено избыточное внимание; ряд корреляций вполне очевидны и прогнозируемы (например, корреляции между количеством и общей площадью *vasa vasorum* на срез; между количеством миелопероксидаза-положительных кластеров и их общей площадью на срез – рисунок 18).

8. Непонятна методика пересчета общего количества и общей площади *vasa vasorum* и миелопероксидаза-положительных кластеров на сосуд (Рисунок 27). Исходя из подписей к осям координат, следует предполагать, что оценивали абсолютное количество *vasa vasorum* и миелопероксидаза-положительных кластеров в каждом сосуде.

9. Внесение в диссертацию результатов исследования о колокализации *vasa plaquorum* и кальцификатов в атеросклеротических бляшках избыточно: во-первых, это совершенно другой объект исследований; во-вторых, данный раздел воспринимается как самостоятельное отдельное исследование; в-третьих, объединение результатов с основным массивом данных выглядит искусственным.

10. Практические рекомендации применимы исключительно для фундаментальных лабораторных исследований; возможность их использования в рутинной лабораторной клинической практике неочевидна.

11. Результаты диссертационного исследования были представлены на российских и международных конгрессах и конференциях в 2019-2021 годах. Означает ли это, что исследование было завершено два года назад, или же в

последующие годы не было получено новых результатов для представления на научных мероприятиях?

Данные замечания и вопросы не снижают ценности большой и наукоемкой работы, выполненной на актуальную тему.

### **Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации**

Содержание автореферата соответствует основным положениям и выводам диссертации и в полной мере их отражает; диссертационная работа соответствует заявленной специальности 3.3.3 – патологическая физиология.

### **Заключение о соответствии диссертации требованиям «Положения о присуждении ученых степеней»**

Диссертационная работа Богданова Льва Александровича на тему «Роль кровоснабжения сосудистой стенки в патогенезе васкулита, формирования неоинтимы и прогрессирования атеросклероза крупных сосудов (экспериментально-клиническое исследование)», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3. – патологическая физиология, является завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной задачи современной патологической физиологии – экспериментально-клиническое обоснование связи внутрисосудистого неоангиогенеза и нарушений кровоснабжения сосудистой стенки с развитием васкулита, формированием неоинтимы и прогрессированием атеросклеротического поражения крупных сосудов.

По актуальности, методическому обеспечению, научной новизне и ценности полученных результатов диссертационная работа Богданова Льва Александровича полностью соответствует требованиям п. 9, 10, 11

«Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в ред. постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Богданов Лев Александрович - заслуживает присуждения Учёной степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3. – патологическая физиология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории медицинской генетики Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации»

26.09.23

Собенин Игорь Александрович

121552, Россия, г. Москва,  
ул. Академика Чазова, д. 15-а  
Телефон: +7(495) 414-65-89  
e-mail: igor.sobenin@gmail.com

Подпись И.А. Собенина удостоверяю:

Ученый секретарь Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

д.м.н.



О.С. Плеханова