

На правах рукописи

Богданов Лев Александрович

**РОЛЬ НАРУШЕНИЙ КРОВΟΣНАБЖЕНИЯ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ
В ПАТОГЕНЕЗЕ ВАСКУЛИТА, ФОРМИРОВАНИЯ НЕОИНТИМЫ
И ПРОГРЕССИРОВАНИЯ АТЕРОСКЛЕРОЗА КРУПНЫХ СОСУДОВ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.3.3. Патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Иркутск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук **Кутихин Антон Геннадьевич**

Официальные оппоненты:

Собенин Игорь Александрович, доктор медицинских наук, Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии им. академика В.Н. Смирнова Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный научный сотрудник, и.о. руководителя лаборатории медицинской генетики

Полонская Яна Владимировна, доктор биологических наук, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», лаборатория клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, старший научный сотрудник

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» октября 2023 года ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.187.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, д. 16

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» и на сайте: <http://health-family.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Гребенкина
Людмила Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Vasa vasorum (ВВ) представляют собой микрососуды адвентиции и периваскулярной жировой ткани (ПВЖТ) крупных сосудов, снабжающие кислородом сосудистую стенку. Дисфункция эндотелия крупных сосудов сопровождается патологическим повышением его проницаемости и провоспалительной активацией эндотелиальных клеток (ЭК), что вызывает адгезию моноцитов к эндотелию, моноцитарно-макрофагальную инфильтрацию интимы и развитие воспаления. Данные процессы приводят к формированию неоинтимы, увеличению толщины сосудистой стенки и к гипоксии, результатом которой является гипертрофия ВВ (Kampschulte M. с соавт., 2010).

Считается, что ВВ служат одним из анатомических путей транспортировки иммунных клеток в очаг васкулита и могут играть важную роль в патогенезе атеросклероза и иных патологий сосудистой стенки, сопровождающихся хроническим воспалением (Sedding D. G. с соавт., 2018). Было показано, что увеличение количества ВВ в адвентиции и ПВЖТ напрямую коррелирует с активностью протекающего в неоинтимае воспаления (Tanaka K. с соавт., 2011). Одновременно с ВВ в адвентиции и ПВЖТ обнаруживаются предположительно состоящие из иммунокомпетентных клеток МПО⁺ кластеры, генез которых неясен (Bénézech C. с соавт., 2014). В пораженных атеросклерозом коронарных артериях ВВ встречаются не только в адвентиции, но также в меди и интимае, свидетельствуя о связи неоваскуляризации и атеросклероза (Mulligan-Kehoe M. J. с соавт., 2014). При этом новообразованные сосуды бляшек классифицируют как *vasa plaquorum* (ВП), так как они кровоснабжают именно патологическую ткань – неоинтиму (Galis Z. S. с соавт., 2009).

Можно заключить, что неоваскуляризация может потенцировать развитие васкулита и атеросклеротического поражения сосудов, а объем кровоснабжения может отражать активность этих патологических процессов. В то же время остается неясным, как именно изменения количественных характеристик сосудистого русла (количество, общая площадь, плотность ВВ) связаны с характеристиками отражающих воспаление сосудистой стенки МПО⁺ кластеров и количественными характеристиками формирующейся неоинтимы. Также не изучено, влияет ли на неоваскуляризацию дисфункция эндотелия, что представляет важность в контексте конвергенции двух теорий развития

атеросклеротического поражения сосудов – “inside-out” (от интимы к адвентиции) и “outside-in” (от адвентиции к интимае).

Степень разработанности темы исследования

Ранее была показана связь повреждения сосудистой стенки с формированием неоинтимы и неоваскуляризацией адвентиции (Khurana R. с соавт., 2004). После баллонного повреждения сонных артерий крыс площадь неоинтимы и объем ВВ линейно увеличивались с момента оперативного вмешательства до 16-й недели наблюдения (Edelman E. R. с соавт., 1992). Последовательное повреждение проволокой и баллоном приводило к более выраженной неоваскуляризации в сравнении с изолированным баллонным повреждением (Ye M. с соавт., 2015). В то же время в данных работах исследовались только адвентициальные, но не периваскулярные ВВ. В качестве приоритетных количественных метрик рассматривались плотность и количество ВВ (Gabeler E. E. с соавт., 2002), однако не была исследована связь этих метрик с воспалением сосудистой стенки. Несмотря на доказанную роль дисфункции эндотелия в развитии патологий сосудистой стенки, не было проведено экспериментов, сочетающих баллонное повреждение и внутривенное введение триггеров дисфункции эндотелия.

Известно, что бимаммарное коронарное шунтирование (КШ), при котором в качестве кондуитов используется исключительно внутренняя грудная артерия (ВГА), характеризуется повышенной проходимостью в сравнении с сочетанным использованием венозных (большая подкожная вена, БПВ) и артериальных (ВГА) шунтов вследствие устойчивости к атеросклерозу, рестенозу и тромбозу (Gaudino M. с соавт., 2017), при этом ВГА характеризуется малым количеством и плотностью ВВ в сравнении с другими артериями (Galili O. с соавт., 2004) и БПВ (Dreifaldt M. с соавт., 2013). Поэтому представляется важным исследовать связь интенсивности кровоснабжения с формированием неоинтимы в кондуитах для КШ. Стоит отметить недостаточную изученность связи неоваскуляризации неоинтимы и кальцификации бляшки, что не позволяет сделать вывода о патогенетической роли ВП в прогрессировании атеросклероза сонных артерий и развитии разрыва бляшки, ведущего к инфаркту мозга (Nicoll R. с соавт., 2017).

Цель исследования – определение роли нарушений кровоснабжения сосудистой стенки в патогенезе васкулита, формирования неоинтимы и прогрессирования атеросклеротического поражения крупных сосудов в эксперименте и у пациентов с болезнями системы кровообращения для

установления возможности использования параметров кровоснабжения сосудистой стенки в оценке состояния кровеносных сосудов.

Задачи исследования:

1. Разработать чувствительные и специфичные методические подходы к анализу кровоснабжения сосудистой стенки и выраженности васкулита.
2. Определить связь между количественными характеристиками кровоснабжения и воспаления сосудистой стенки и формированием неоинтимы при искусственном повреждении аорты крыс Wistar.
3. Оценить влияние триггеров дисфункции эндотелия на интенсивность кровоснабжения и воспаления сосудистой стенки на модели искусственного повреждения аорты крыс Wistar.
4. Исследовать связь интенсивности кровоснабжения сосудистой стенки с формированием неоинтимы у пациентов с ишемической болезнью сердца в условиях коронарного шунтирования.
5. Выявить роль неоваскуляризации бляшки в прогрессировании атеросклероза сонных артерий у пациентов с ишемией головного мозга.
6. Установить возможность использования параметров кровоснабжения сосудистой стенки в оценке состояния кровеносных сосудов.

Научная новизна исследования

Впервые показана высокая чувствительность и специфичность маркерных белков сосудистых гладкомышечных клеток (СГМК) при анализе состояния кровоснабжения сосудистой стенки, впервые доказано, что плотность МПО⁺ кластеров отражает выраженность васкулита.

Впервые продемонстрированы прямые ассоциативные и корреляционные связи между интенсивностью кровоснабжения сосудистой стенки, активностью васкулита и формированием неоинтимы при искусственном повреждении аорты крыс Wistar, в большой подкожной вене пациентов с ишемической болезнью сердца и у пациентов с атеросклерозом сонных артерий.

Впервые доказано, что внутривенное введение триггеров дисфункции эндотелия стимулирует кровоснабжение сосудистой стенки и развитие васкулита при искусственном повреждении аорты крыс Wistar.

Теоретическая и практическая значимость работы

Доказана прямая связь между интенсивностью кровоснабжения сосудистой стенки и активностью протекающих в ней воспалительных процессов. В экспериментальную практику внедрены лабораторные протоколы

иммуноокрашивания на маркеры СГМК для идентификации ВВ с целью анализа кровоснабжения сосудистой стенки и иммуноокрашивания МПО⁺ кластеров в адвентиции и ПВЖТ для оценки выраженности васкулита. Предложен и обоснован алгоритм качественного и количественного анализа кровоснабжения и воспаления сосудистой стенки, что позволяет осуществлять объективную оценку состояния кровеносных сосудов.

Методология и методы исследования

В работе использованы классические подходы и методы патологической физиологии: моделирование повреждения сосудистой стенки на лабораторных крысах при помощи баллонной ангиопластики брюшной аорты (n = 50), моделирование дисфункции эндотелия у части подвергшихся ангиопластике крыс посредством внутривенного введения кальций-фосфатных бионон (n = 10), гистологическое, иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследование аорт крыс, ультраструктурное исследование кондуитов для КШ (парные БПВ и ВГА, n = 30 для каждого вида) и извлеченных при каротидной эндартерэктомии атеросклеротических бляшек (n = 48; 21 бляшка от пациентов с инфарктом мозга и 27 бляшек от пациентов со стабильной хронической ишемией головного мозга), количественная оценка метрик кровоснабжения (количество, общая площадь и плотность ВВ) и воспаления сосудистой стенки (количество, общая площадь и плотность МПО⁺ кластеров) и формирования неоинтимы (отношение неоинтимы к интиме и процент стеноза сосудистого просвета) при помощи анализа изображений в программе ImageJ, а также анализ данных с использованием критериев непараметрической статистики.

Анализ литературы по теме диссертации, определение цели и задач исследования, разработка дизайна исследования, протоколов экспериментов, анализ и интерпретация результатов экспериментов, статистическая обработка данных, подготовка статей по теме диссертации, доклады по результатам исследования и написание диссертационной работы выполнены лично автором. Операции на лабораторных животных были выполнены совместно с сотрудницей Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (НИИ КПССЗ, г. Кемерово) канд. биол. наук Д. К. Шишковой. Лабораторные животные были получены из сертифицированного вивария отдела экспериментальной медицины НИИ КПССЗ. Все эксперименты с лабораторными животными были выполнены в соответствии с Европейской

конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986), и были одобрены Локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (номер протокола заседания № 06234-ЛБ). Кондуиты для КШ и атеросклеротические бляшки были получены совместно с сотрудником кардиохирургического отделения НИИ КПССЗ канд. мед. наук А. В. Фроловым и сотрудником нейрохирургического отделения НИИ КПССЗ мл. науч. сотр. А.Р. Шабаевым. Протокол исследования и сбор клинических образцов были одобрены Локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (номера протоколов заседаний № 06217-АФ и № 100920180-ЛФАА). Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации (2013).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Наиболее чувствительным и специфичным методом анализа кровоснабжения сосудистой стенки (состояния сети ВВ) является детекция сократительных белков СГМК (α -SMA и SM-MHC), а методом анализа воспаления сосудистой стенки – детекция МПО⁺ кластеров.

2. Интенсивность васкулита напрямую коррелирует с объемом кровоснабжения сосудистой стенки, при этом данные процессы усиливаются при воздействии триггеров дисфункции эндотелия и ассоциированы с формированием неоинтимы при механическом повреждении аорт крыс.

3. Интенсивность кровоснабжения сосудистой стенки ассоциирована с формированием неоинтимы у пациентов с ишемической болезнью сердца (артериальные и венозные кондуиты для КШ) и атеросклерозом сонных артерий.

Степень достоверности результатов

О достоверности результатов диссертационного исследования свидетельствуют большой объем материала, широкий спектр выполненных исследований, многократные повторы экспериментов, использование современных методов исследования и статистической обработки результатов.

Публикации

Соискатель имеет по теме диссертации 11 опубликованных научных работ, из них 7 – в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ, в том числе 5 работ в рецензируемых изданиях,

индексируемых в международной базе данных Scopus, 2 – в международной базе данных Web of Science.

Объём и структура работы

Диссертация изложена на 136 страницах, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 178 источника. Работа иллюстрирована 3 таблицами и 45 рисунками.

Апробация материалов диссертации

Результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на I Всероссийском Конгрессе с международным участием «Физиология и тканевая инженерия сердца и сосудов: от клеточной биологии до протезирования» (5-7 ноября 2019, г. Кемерово), Российском национальном конгрессе кардиологов (29 сентября – 1 октября 2020, г. Казань), 88-м Конгрессе Европейского общества атеросклероза (4-7 октября 2020, г. Женева, Швейцария), 21-й Международной конференции по сосудистой биологии (9-12 сентября 2020, г. Сеул, Южная Корея), Всероссийском Конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (19-20 ноября 2020, г. Томск), Втором Всероссийском научно-образовательном форуме с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» (28-29 апреля 2021, г. Томск) и 89-м Конгрессе Европейского общества атеросклероза (30 мая – 2 июня 2021, г. Хельсинки, Финляндия).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Задача 1

Для оптимизации анализа кровоснабжения сосудистой стенки проанализирован ряд протоколов прогрессивного окрашивания различными видами гематоксилинов (Майера, Джилла и Карацци) и эозином. Для анализа кровоснабжения сосудистой стенки путем иммуноокрашивания ВВ использованы антитела к маркерам СГМК (α -SMA и SM-MHC) и ЭК (CD31 и VE-кадгерин), для анализа васкулита путем иммунофенотипирования МПО⁺ кластеров – антитела к миелопероксидазе (МПО), панлейкоцитарному маркеру CD45, маркеру миелоидных клеток CD11b, маркерам макрофагов CD68 и F4/80, маркеру Т-лимфоцитов CD3, маркеру В-лимфоцитов CD19, маркеру астроцитов, олигодендроцитов и Шванновских клеток S100B и маркеру нейронов NeuN. Визуализация проведена методами световой и конфокальной микроскопии.

Задача 2

Для изучения связей между количественными характеристиками кровоснабжения сосудистой стенки (количество, общая площадь и плотность ВВ), воспаления сосудистой стенки (количество, общая площадь и плотность МПО⁺ кластеров) и формирования неоинтимы (отношение неоинтимы к интиме и процент стеноза сосудистого просвета) при искусственном повреждении сосудистой стенки были использованы следующие животные модели:

Модель 1: нормолипидемические крысы Wistar (n = 40), подвергшиеся баллонной ангиопластике инфраренального отдела брюшной аорты, с выводом из эксперимента через 5 недель после операции и оценкой в поврежденном сегменте аорты (при окрашивании гематоксилином и эозином по оптимизированному в ходе Задачи 1 протоколу):

- Признаков гипертрофии интимы (стеноз $\geq 10\%$ или отношение неоинтимы к интиме ≥ 5);
- Количества, площади и плотности ВВ;
- Количества, площади и плотности МПО⁺ кластеров адвентиции и ПВЖТ.

Модель 2: нормолипидемические крысы Wistar (n = 10), подвергшиеся баллонной ангиопластике брюшной аорты, с опциональным ежедневным внутривенным введением кальций-фосфатных бионов в течение 5 дней (всего 5 инъекций), выводом из эксперимента через 5 недель после операции и оценкой в поврежденном сегменте аорты (при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах):

- Количества, площади и плотности ВВ;
- Количества, площади и плотности МПО⁺ кластеров адвентиции и ПВЖТ.

Задача 3

Для анализа влияния триггеров дисфункции эндотелия на интенсивность кровоснабжения сосудистой стенки и развитие васкулита в эксперименте использована модель 2 из Задачи 2. В качестве триггера эндотелиальной дисфункции использованы кальций-фосфатные бионы, синтезированные по оригинальному протоколу А.Г. Кутихина и Д.К. Шишковой, представленному в докторской диссертации А.Г. Кутихина «Концепция и механизмы патогенного действия кальций-фосфатных бионов на систему кровообращения» (Омск, 2022).

Задача 4

Для изучения связи интенсивности кровоснабжения сосудистой стенки с формированием неоинтимы в клиничко-патофизиологическом сценарии КШ использованы артериальные кондуиты (ВГА, n = 30) и венозные кондуиты (БПВ,

n = 30), попарно забранные у одних и тех же пациентов с ишемической болезнью сердца в течение КШ и исследованные при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах после заливки в эпоксидную смолу на предмет:

- Признаков гипертрофии интимы (стеноз $\geq 10\%$ или отношение неоинтимы к интимае ≥ 5);
- Количества, площади и плотности ВВ.

Задача 5

С целью детализации роли неоваскуляризации атеросклеротической бляшки в прогрессировании каротидного атеросклероза проанализированы атеросклеротические бляшки (n = 48), эксплантированные из сонных артерий пациентов без инфаркта мозга (стабильный фенотип, n = 27) или с острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу (нестабильный фенотип, n = 21) и исследованные при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах на предмет количества, площади и плотности новообразованных сосудов.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов осуществляли в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). Данные были представлены в виде долей, медианы, межквартильного интервала (25-го и 75-го перцентилей), а также минимального и максимального значений. Сравнения между двумя группами проводили по критерию χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса на непрерывность при анализе качественных признаков и по критериям Манна-Уитни и Уилкоксона при анализе независимых и парных количественных признаков соответственно. Корреляционный анализ выполняли с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Значения p менее 0,05 (вероятность отвергнуть верную нулевую гипотезу в менее чем 5%) признавали статистически значимыми. Количественный анализ изображений проводили с использованием программы ImageJ.

Результаты исследования и их обсуждение

Поскольку надлежащая оценка метрик кровоснабжения сосудистой стенки (количество, общая площадь и плотность ВВ) и воспаления сосудистой стенки (количество, общая площадь и плотность МПО⁺ кластеров) требует наличия верифицированных методов детекции указанных структур, в первую очередь было решено разработать соответствующие методические подходы с высокой чувствительностью и специфичностью.

Конфокальная микроскопия показала, что антителами к ЭК и СГМК окрашивались все виды ВВ (артериолы, венулы и капилляры). Окрашивание СГМК флюоресцентно мечеными антителами к их сократительным белкам характеризовалось высокой интенсивностью. Независимо от выбранного маркера (SM-МНС или α -SMA), видового происхождения первичного антитела (кролик или мышь) или конъюгированной с вторичным антителом флюоресцентной метки (Alexa Fluor 555 или Alexa Fluor 488), окрашивание на маркеры СГМК в силу больших размеров и многослойности расположения СГМК позволяло получить кратно более высокое соотношение сигнал/шум в сравнении с окрашиванием антителами к маркерам ЭК (CD31 и VE-кадгерину), ясно сигнализируя о наличии ВВ внутри определенной области (Рисунок 1).

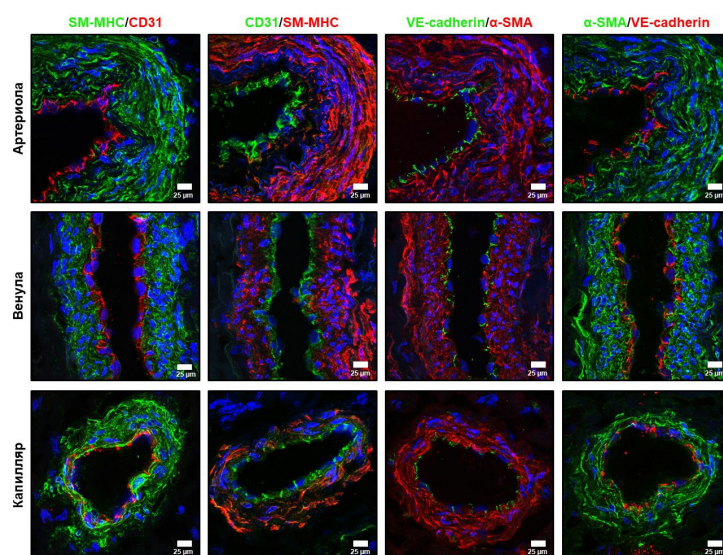


Рисунок 1 – Иммунофлюоресцентное окрашивание различных видов ВВ БПВ человека на маркеры СГМК и ЭК. Увеличение $\times 400$.

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 вазоспазме и подготовке гистологических срезов, закрывая просвет сосуда и не позволяя провести полуколичественный анализ его площади и толщины сосудистой стенки (Рисунок 2). Результаты проведенных экспериментов позволили предложить окрашивание на маркеры СГМК (к примеру, SM-МНС и α -SMA) в качестве альтернативного и более эффективного способа детекции сосудов микроциркуляторного русла (в частности, ВВ) в сравнении с окрашиванием антителами к ЭК независимо от экспериментальных условий.

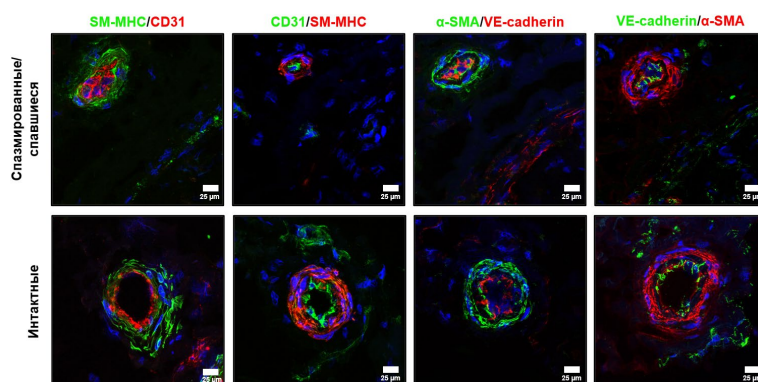


Рисунок 2 – Иммунофлюоресцентное окрашивание спазмированных или спавшихся капилляров и неспавшихся капилляров (с сохраненным сосудистым просветом) БПВ человека на маркеры СГМК и ЭК. Увеличение $\times 400$.

С целью детекции отражающих воспаление сосудистой стенки МПО⁺ кластеров в адвентиции и ПВЖТ аорты крыс было выполнено ее иммуногистохимическое окрашивание антителами к панлейкоцитарному маркеру CD45, маркерам миелоидных клеток CD11b и МПО, маркерам макрофагов CD68 и F4/80 и маркеру В-лимфоцитов CD19. МПО⁺ кластеры, изначально выявленные как эмпирическая находка в адвентиции и ПВЖТ стенозированных аорт крыс, положительно окрашивались на МПО, однако не на остальные маркеры иммунокомпетентных клеток (Рисунок 3).

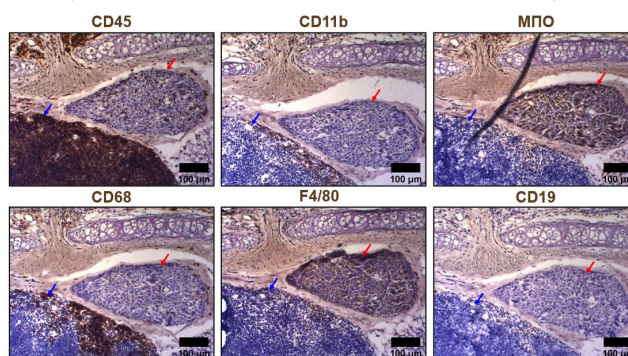


Рисунок 3 – Иммуногистохимическое окрашивание отражающих воспаление сосудистой стенки МПО⁺ кластеров (отмечены красной стрелкой) и лимфоузлов ПВЖТ аорты крысы. Увеличение $\times 200$.

Отражающие развитие васкулита МПО⁺ кластеры не были окрашены на маркер макрофагов CD68, маркер астроцитов, олигодендроцитов и Шванновских клеток S100B и маркер нейронов NeuN, что в совокупности с отсутствием их окрашивания на CD45 и CD11b свидетельствовало об отсутствии в их составе характерных для нервной ткани клеточных популяций и позволяло дифференцировать их от обеспечивающего иннервацию сосудистой стенки симпатического нервного ствола (Рисунок 4).

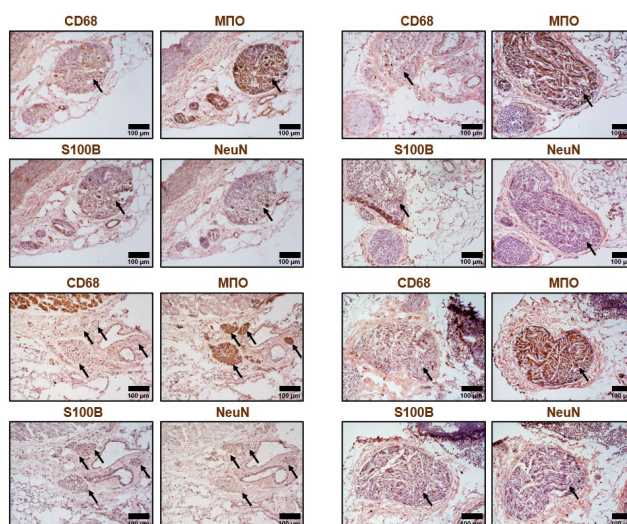


Рисунок 4 – Иммуногистохимическое окрашивание отражающих развитие васкулита МПО⁺ кластеров адвентиции и ПВЖТ аорты крысы антителами к иммунным клеткам, нейронам и клеткам нейроглии. Увеличение $\times 200$.

Гистологическое исследование показало, что через 5 недель после выполнения баллонной ангиопластики аорты неointима сформировалась у 20 из 40 (50%) крыс. Обе количественные метрики (количество и общая площадь) выражено коррелировали друг с другом при анализе как ВВ ($r = 0,58$), так и МПО⁺ кластеров ($r = 0,72$) (Рисунок 5). Количество ВВ и МПО⁺ кластеров также продемонстрировало значимую корреляционную связь ($r = 0,35$), предполагая связь кровоснабжения и воспаления в адвентиции и ПВЖТ (Рисунок 5).

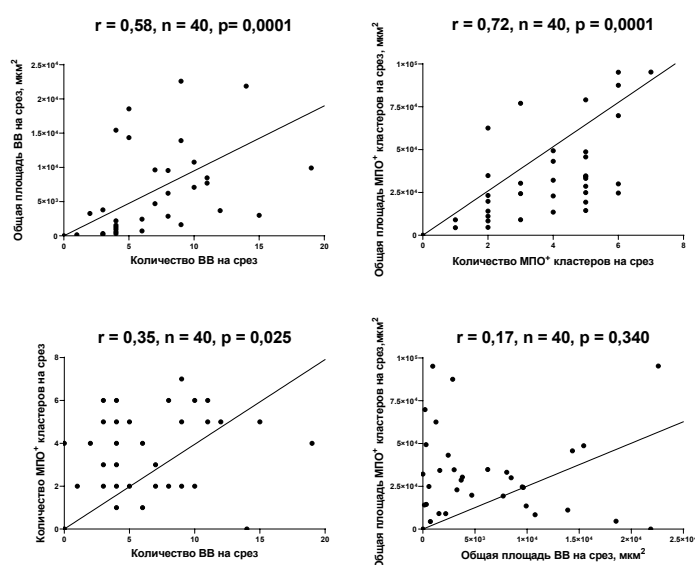


Рисунок 5 – Корреляция количества и общей площади ВВ и МПО⁺ кластеров в адвентиции и ПВЖТ аорт крыс после баллонной ангиопластики.

Адвентиция и ПВЖТ аорт крыс, в которых отмечалось формирование неointимы через 5 недель после баллонной ангиопластики, характеризовались

повышенным количеством ВВ и МПО⁺ кластеров в сравнении с адвентицией и ПВЖТ аорт крыс без формирования неоинтимы (Рисунок 6).

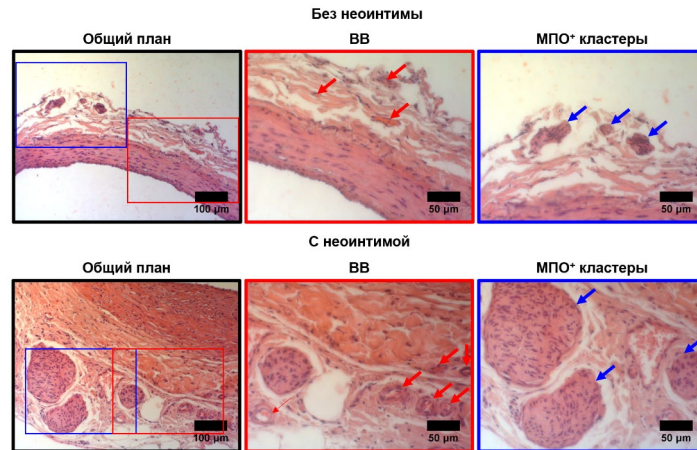


Рисунок 6 – Репрезентативные микрофотографии аорт крыс без формирования неоинтимы или с формированием неоинтимы после баллонной ангиопластики. Увеличение $\times 200$ и $\times 400$.

Все метрики воспаления сосудистой стенки (количество, общая площадь, количественная и площадная плотность ВВ) были ассоциированы с формированием неоинтимы (Рисунок 7).

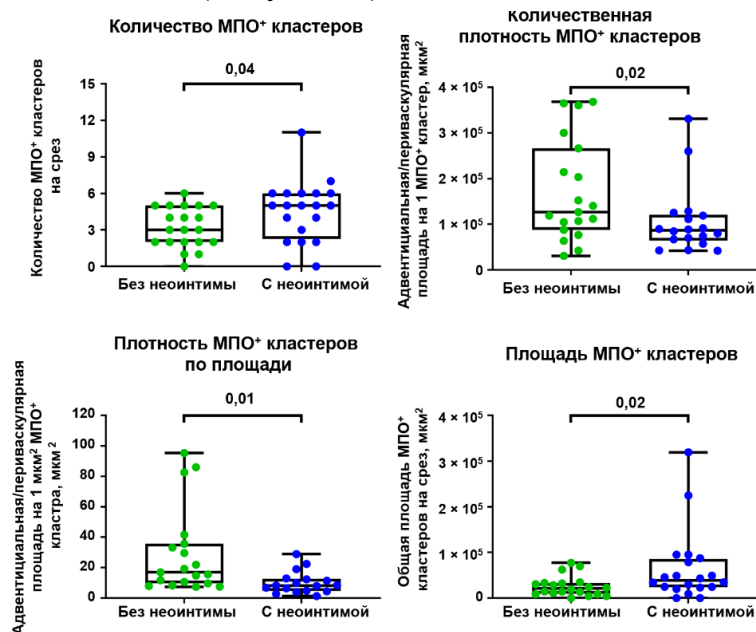


Рисунок 7 – Анализ связи метрик воспаления сосудистой стенки с формированием неоинтимы после ангиопластики аорт крыс.

Количество и плотность CD45⁺ клеток в адвентиции были значительно выше у крыс с гипертрофией интимы и хорошо коррелировали с соотношением неоинтимы к интимае и процентом стеноза (Рисунок 8).

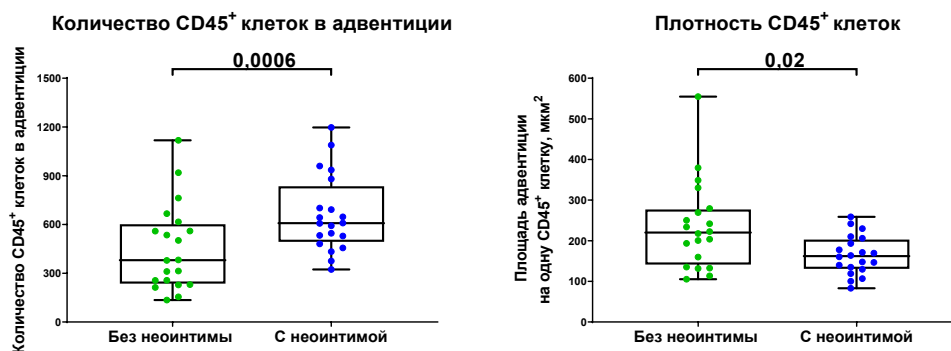


Рисунок 8 – Анализ связи количества и плотности CD45⁺ клеток в адвентиции с формированием неинтимы после ангиопластики аорт крыс.

При дополнении баллонной ангиопластики ежедневными внутривенными инъекциями триггера эндотелиальной дисфункции (кальций-фосфатными бионами) либо контрольного физиологического раствора в течение 5 дней количество и площадь ВВ и МПО⁺ кластеров также показали выраженную корреляцию ($r = 0,66$ и $r = 0,47$ соответственно), подтверждая связь кровоснабжения и воспаления в адвентиции и ПВЖТ (Рисунок 9).

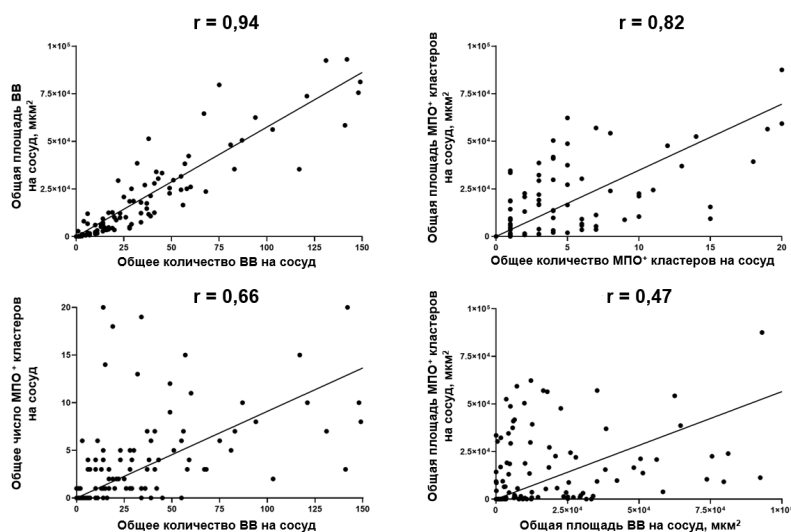


Рисунок 9 – Корреляция количества и общей площади ВВ и МПО⁺ кластеров в адвентиции и ПВЖТ аорт крыс после ангиопластики и 5-дневного введения кальций-фосфатных бионов или физиологического раствора.

В сравнении с адвентицией контрольных крыс адвентиция крыс, которым внутривенно вводили триггер дисфункции эндотелия, характеризовалась статистически значимо большей общей площадью ВВ и статистически значимо большим количеством отражающих воспаление МПО⁺ кластеров (Рисунок 10).

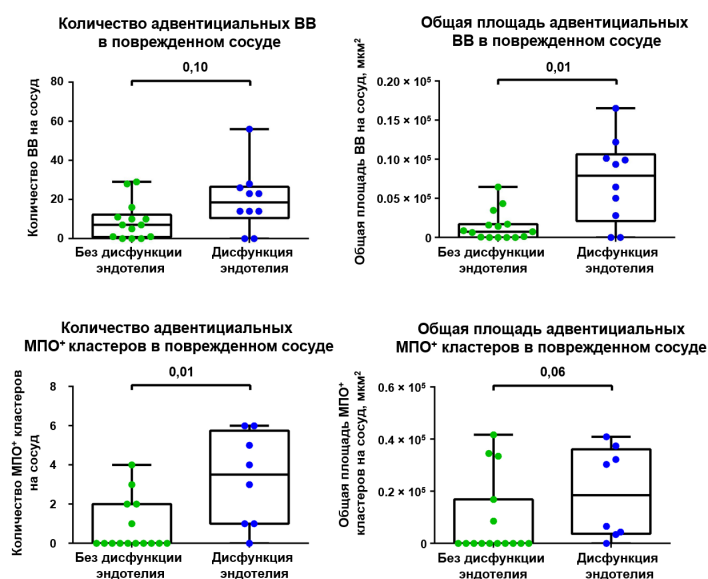


Рисунок 10 – Анализ связи дисфункции эндотелия с метриками кровоснабжения и воспаления сосудистой стенки в аортах крыс после ангиопластики и 5-дневного введения кальций-фосфатных бионов или физиологического раствора.

В ПВЖТ крыс, которым внутривенно вводили триггер дисфункции эндотелия, в сравнении с ПВЖТ контрольных крыс статистически значимо были повышены исключительно метрики, связанные с воспалением (Рисунок 11).

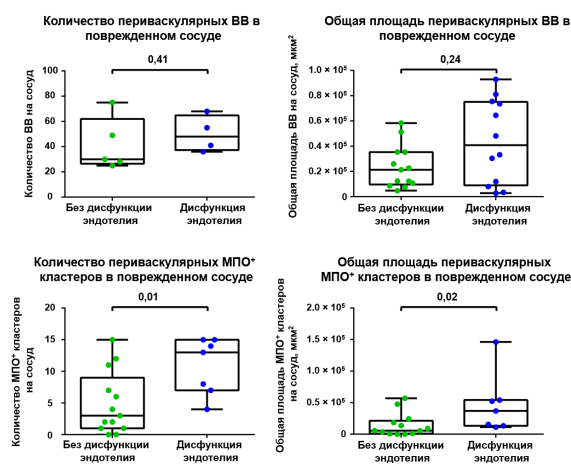


Рисунок 11 – Анализ связи дисфункции эндотелия с метриками кровоснабжения и воспаления ПВЖТ аорты крысы после ангиопластики и 5-дневного введения кальций-фосфатных бионов или физиологического раствора.

Таким образом, повреждение стенки аорты крыс путем ангиопластики было ассоциировано с увеличением всех метрик ее воспаления. Дополнение баллонного повреждения внутривенным введением триггера дисфункции эндотелия приводило к увеличению количества и площади МПО⁺ кластеров в адвентиции и ПВЖТ, а также к повышению интенсивности кровоснабжения

адвентиции. Прямая и выраженная корреляция количества и площади ВВ и МПО⁺ кластеров при повреждении сосудистой стенки указывала на связь между объемом кровоснабжения и интенсивностью воспаления в адвентиции и ПВЖТ.

Анализ неоинтимы кондуитов для КШ на предоперационном этапе позволил выявить, что формирование неоинтимы чаще детектировалось в БПВ, чем в ВГА (21/30 (70%) и 11/30 (36,7%) соответственно при подсчете отношения наибольшей толщины неоинтимы к наименьшей > 5 , 22/30 (73,3%) и 12/30 (40%) соответственно при подсчете сосудов с $\geq 5\%$ стенозом, 18/30 (60%) и 9/30 (30%) соответственно при подсчете сосудов с $\geq 10\%$ стенозом, Рисунок 12).

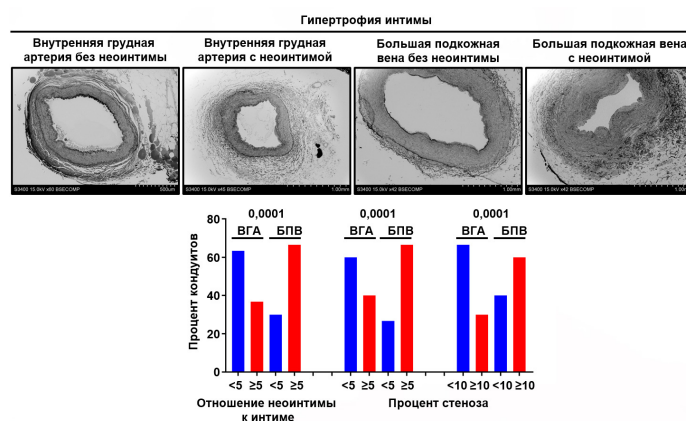


Рисунок 12 – Анализ неоинтимы артериальных (ВГА) и венозных кондуитов (БПВ) пациентов с ишемической болезнью сердца на этапе КШ.

Отношение неоинтимы к интима и процент стеноза сосудистого просвета в БПВ значительно превышали таковые в ВГА; кроме того, количество ВВ в БПВ также превышало таковое в ВГА (Рисунок 13).

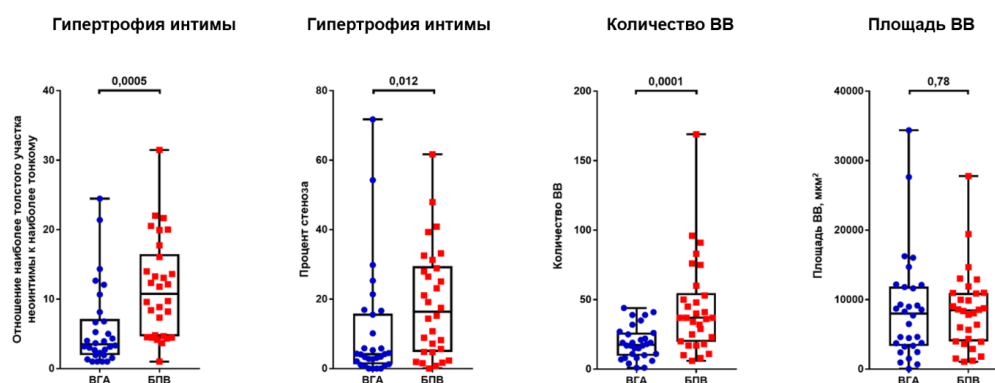


Рисунок 13 – Анализ неоинтимы артериальных кондуитов (ВГА) и венозных кондуитов (БПВ), полученных от пациентов с ишемической болезнью сердца на этапе КШ.

Для увеличения доказательности связи между объемом кровоснабжения сосудистой стенки и формированием неоинтимы в клинико-патофизиологическом сценарии КШ был проведен корреляционный анализ,

который показал, что количество ($r = 0,44$) и плотность ВВ ($r = -0,32$) коррелировали с отношением неоинтимы к интима (Рисунок 14).

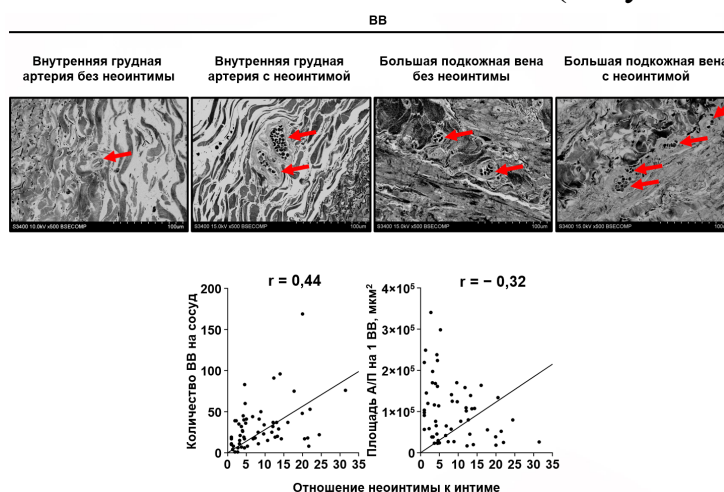


Рисунок 14 – Анализ связи кровоснабжения стенки ВГА и БПВ, полученных от пациентов с ишемической болезнью сердца на этапе КШ, с формированием неоинтимы.

В результате анализа возрастных изменений артериальных и венозных кондуитов для КШ было выявлено, что предоперационная гипертрофия интимы является более характерной для БПВ в сравнении с ВГА. Медианы количества и плотности ВВ в БПВ в 2 и 1,5 раза соответственно превышали таковые в парных ВГА, указывая на склонность БПВ к воспалению в адвентиции. Количество и плотность ВВ в кондуитах для КШ коррелировали с объемом неоинтимы, что свидетельствует о патогенетической значимости микроциркуляции адвентиции и ПВЖТ в развитии воспаления сосудистой стенки и формировании неоинтимы.

Объем неоинтимального кровоснабжения, отражаемый количеством ВП, выраженно коррелировал с процентом стеноза брахиоцефальных артерий ($r = 0,41$). При электронно-микроскопическом исследовании было выявлено, что увеличение общей площади, но не количества кальцификатов оказывало стабилизирующее действие на бляшку (Рисунок 15).

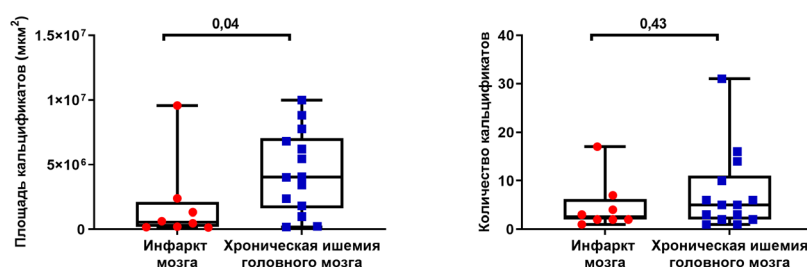


Рисунок 15 – Общая площадь и общее количество кальцификатов в стабильных и нестабильных атеросклеротических бляшках сонных артерий.

Количество и площадь кальцификатов независимо от фенотипа бляшки коррелировали с общим кровоснабжением неоинтимы ($r = 0,53-0,60$) и с непосредственным кровоснабжением вблизи кальцификатов ($r = 0,52-0,63$). Таким образом, наблюдался парадокс: стабилизирующая бляшку кальцификация прогрессировала за счет васкуляризации, ассоциированной с нестабильным фенотипом бляшки. Однако было выявлено, что активное кровоснабжение непосредственно вблизи кальцификатов ассоциировано со стабильным фенотипом бляшки, в отличие от общего кровоснабжения, связанного с приводящим к разрыву фиброзной покрышки ростом бляшки (Рисунок 16).

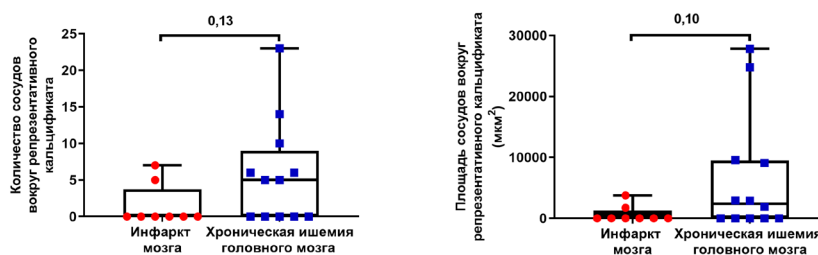


Рисунок 16 – Общее количество ВП вокруг репрезентативного кальцификата и общая площадь ВП вокруг репрезентативного кальцификата в стабильных и нестабильных атеросклеротических бляшках сонных артерий.

Таким образом, для стабильного фенотипа атеросклеротической бляшки было характерно развитие кальцификации неоинтимы. Хотя процесс кальцификации был напрямую связан с выраженностью и общего, и локального кровоснабжения бляшки, со стабильным фенотипом атеросклеротической бляшки было ассоциировано именно активное локальное кровоснабжение вокруг кальцификатов (которое играло положительную роль), а общее кровоснабжение бляшки, напротив, было ассоциировано с приводящим к развитию инфаркта мозга увеличением стеноза сосудистого просвета, играя отрицательную роль в патогенезе атеросклероза.

Патогенетическая схема, отражающая закономерности регуляции кровоснабжения и воспаления сосудистой стенки, а также формирования неоинтимы, представлена на Рисунке 17. Триггерную роль в развитии нарушений кровоснабжения сосудистой стенки могут играть хроническое системное воспаление низкой интенсивности (отражаемое повышением концентрации циркулирующих в крови цитокинов) и провоспалительная дисфункция эндотелия, которые способствуют привлечению моноцитов в интиму и в совокупности с гипоксией приводят к активации фибробластов адвентиции и переходу СГМК с сократительного на синтетический фенотип.

Активированные фибробласты и СГМК постепенно мигрируют из адвентиции и меди в неоинтиму и синтезируют большое количество внеклеточного матрикса, усугубляя гипоксию, а также выделяют собственные провоспалительные цитокины. Действуя синергично, гипоксия и воспаление ускоряют неоваскуляризацию неоинтимы, адвентиции и ПВЖТ вследствие активации ангиогенеза (сборки новых сосудов циркулирующими ЭК и их резидентными клетками-предшественниками, а также клетками-предшественниками СГМК) и вносят вклад в развитие васкулита за счет миграции макрофагов в адвентицию и ПВЖТ через ВВ и пролиферации активированных макрофагов внутри адвентиции. В свою очередь, интенсивное кровоснабжение неоинтимы ассоциировано с ее кальцификацией и ростом атеросклеротической бляшки, при этом в зависимости от своего характера кровоснабжение неоинтимы может иметь как отрицательный эффект (в том случае, если оно равномерно распространено по всей неоинтимае, оно способствует ее росту, приводит к сужению сосудистого просвета и в конечном счете провоцирует разрыв атеросклеротической бляшки), так и протективный эффект (в том случае, если кровоснабжение неоинтимы сконцентрировано возле кальцификатов, оно способствует увеличению их объема и стабилизации атеросклеротической бляшки, предотвращая ее разрыв).

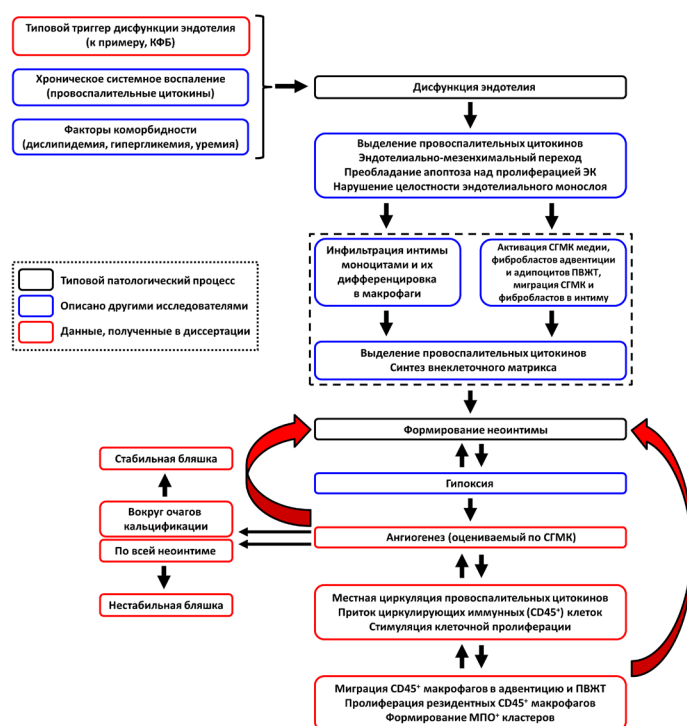


Рисунок 17 – Схема, отражающая роль нарушений кровоснабжения сосудистой стенки в патогенезе васкулита, формирования неоинтимы и прогрессирования атеросклеротического поражения крупных сосудов.

ВЫВОДЫ

1. Наилучшими инструментами для анализа кровоснабжения сосудистой стенки (детекции ВВ) являются антитела к маркерам СГМК (α -SMA и SM-MHC), которые, в отличие от антител к маркерам ЭК (CD31 и VE-кадгерину), позволяют детектировать сосуды в состоянии вазоспазма и осуществлять объективный анализ сосудистой геометрии независимо от тонуса ВВ. Надежным инструментом для оценки васкулита служит окрашивающее МПО⁺ кластеры антитело к миелопероксидазе.

2. Между объемом кровоснабжения сосудистой стенки и выраженностью васкулита, отражаемого гипертрофией МПО⁺ кластеров и инфильтрацией адвентиции иммунными клетками, наблюдается прямая корреляционная связь средней силы ($r = 0,35-0,66$). При этом как избыточная васкуляризация, так и воспаление сосудистой стенки статистически значимо ассоциированы с формированием неоинтимы при искусственном механическом повреждении аорты крыс Wistar.

3. На модели искусственного механического повреждения аорты крыс Wistar выявлены статистически значимые ассоциативные связи между внутривенным введением триггеров дисфункции эндотелия, увеличением интенсивности кровоснабжения сосудистой стенки и выраженностью васкулита.

4. Предоперационная гипертрофия интимы перед КШ и интенсивное адвентициальное кровоснабжение в два раза чаще встречаются в БПВ по сравнению с ВГА. Обнаружена прямая корреляционная связь средней силы ($r = 0,32-0,44$) между количеством и плотностью ВВ и предоперационной гипертрофией интимы в кондуитах для КШ, что указывает на патогенетическую значимость избыточного кровоснабжения сосудистой стенки у пациентов с ишемической болезнью сердца.

5. У пациентов с атеросклерозом сонных артерий наблюдается прямая корреляционная связь средней силы ($r = 0,41$) между объемом васкуляризации каротидных атеросклеротических бляшек и стенозом брахиоцефальных артерий. Васкуляризация неоинтимы сонных артерий также выражено коррелирует с ее кальцификацией ($r = 0,52-0,63$), предотвращая разрыв бляшки при формировании сосудов возле кальцификатов и способствуя ее разрыву при равномерном формировании сосудов по всей неоинтимае.

6. В оценке состояния кровеносных сосудов целесообразно применять плотность ВВ, которая отражает интенсивность кровоснабжения сосудистой стенки и напрямую коррелирует с развитием васкулита, и плотность МПО⁺ кластеров, ассоциированных с развитием воспаления сосудистой стенки.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для оценки состояния сосудов микроциркуляторного русла, в том числе ВВ, рекомендуется использовать прогрессивное окрашивание гематоксилином Джилла или Карацци с инкубацией в течение 10-15 минут, что позволяет достичь высокой контрастности ядер. В случае наличия технической возможности следует производить иммунодетекцию ВВ путем их окрашивания на маркеры СГМК (белки их сократительного фенотипа, среди которых можно выделить α -SMA и SM-MHC), которые позволяют провести объективный анализ сосудистой геометрии вне зависимости от их тонуса (в частности, при вазоспазме) и

артефактов подготовки срезов, а также обеспечивают более высокое соотношение сигнал/шум ввиду многослойности мышечной оболочки ВВ и больших размеров СГМК в сравнении с ЭК. Дифференцировку артериол от венул и капилляров рекомендуется осуществлять посредством пентахромного окрашивания по Мовату в модификации Расселла.

Основной метрикой количественного анализа интенсивности кровоснабжения сосудистой стенки является плотность ВВ, для вычисления которой также требуется подсчет их количества, измерение их площади, а также измерение площади адвентиции и ПВЖТ. Расчет плотности ВВ производится следующим образом: площадь адвентиции (и/или ПВЖТ в зависимости от задач и дизайна исследования) делится на количество или суммарную площадь ВВ. Результатом такого расчета является количественная плотность ВВ (площадь адвентиции и/или ПВЖТ на один сосуд микроциркуляторного русла) или площадная плотность ВВ (площадь адвентиции и/или ПВЖТ на 1 мкм² сосудов микроциркуляторного русла). Интенсивность воспаления сосудистой стенки следует оценивать аналогично, рассчитывая по такой же методике плотность МПО⁺ кластеров. Для анализа объема неоинтимы рекомендуется сочетать использование двух метрик: отношение неоинтимы к интиме (определяемое посредством деления максимальной толщины неоинтимы на толщину интактной интимы, которая представляет собой нормальное расстояние от апикальной поверхности эндотелиальных клеток до внутренней эластической мембраны) и процент стеноза сосудистого просвета (определяемый как отношение площади неоинтимы к общей площади просвета сосуда). Количественный анализ кровоснабжения и воспаления сосудистой стенки, а также формирования неоинтимы целесообразно проводить в программе ImageJ.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в журналах перечня рецензируемых научных изданий

(ВАК Минобрнауки РФ, Scopus, Web of Science)

1. **Богданов, Л. А.** Сравнение различных видов прогрессивных гематоксилинов при окрашивании элементов системы кровообращения и гепатолиенальной системы // Л. А. Богданов, Д. К. Шишкова, А. Г. Кутихин // Сибирский научный медицинский журнал. – 2019. – Т. 39, № 6. – С. 46-54. **Индексируется базой данных RSCI, Scopus. Категория К-2. Импакт-фактор РИНЦ 0,343**
2. Особенности анатомии адвентициального и периваскулярного микрососудистого русла как фактор долговременной эффективности аутоартериальной реваскуляризации миокарда / А. В. Фролов, Н. И. Загородников, **Л. А. Богданов**, Р. А. Мухамадияров, А. А. Терехов, А. Г. Кутихин // Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б. В. Петровского. – 2020. – Т. 8, № 4 (30). – С. 65-73. **Индексируется базой данных Scopus. Категория К-2. Импакт-фактор РИНЦ 0,500.**
3. Сравнительное изучение vasa vasorum и неоинтимы в кондуитах для коронарного шунтирования / А. В. Фролов, А. А. Терехов, **Л. А. Богданов**, Р. А. Мухамадияров, А. Г. Кутихин // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2021. – Т. 27, № 2. – С. 121-126. **Индексируется базой данных Scopus. Импакт-фактор РИНЦ 1,069.**
4. Закономерности стабилизации атеросклеротической бляшки при различных сценариях кальцификации и васкуляризации неоинтимы / Н. Ю. Осяев, **Л. А. Богданов**, Р. А. Мухамадияров, А. Р. Шабаев, Д. К. Шишкова, В. Е. Маркова, О. В. Груздева, А. Г. Кутихин //

Российский кардиологический журнал. – 2021. – Т. 26, № 6. – С. 34-42. **Индексируется базой данных RSCI, Scopus. Импакт-фактор РИНЦ 1,583.**

5. Сократительные белки сосудистых гладкомышечных клеток – универсальные маркеры 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. **Импакт-фактор РИНЦ 0,897.**

6. 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 // Int. J. Mol. Sci. 2022. – Vol. 23, № 20. – 12156. **Индексируется базой данных Scopus, Web of Science. Импакт-фактор 6,208.**

7. Endothelial Cell Markers Are Inferior to Vascular Smooth Muscle Cells Markers in Staining Vasa Vasorum and Are Non-Specific for Distinct Endothelial Cell Lineages in Clinical Samples / V. Markova, **L. Bogdanov**, E. Velikanova, A. Kanonykina, A. Frolov, D. Shishkova, A. Lazebnaya, A. Kutikhin // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – Vol. 24, № 3. – 1959. **Индексируется базой данных Scopus, Web of Science. Импакт-фактор 6,208.**

Материалы конференций

8. Патогенетическая значимость vasa vasorum и макрофагальных скоплений в развитии сосудистого воспаления при внутривенном введении триггера дисфункции эндотелия / **Богданов Л.А.**, Шишкова Д.К., Шабаетв А.Р., Мухамадияров Р.А., Кутихин А.Г. – Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2020 – Т. 9, № S1. – С. 11.

9. Increased number of vasa vasorum correlates with intimal hyperplasia in saphenous veins rather than internal mammary arteries: a possible explanation for better performance of arterial conduits / A. Kutikhin, A. Terekhov, **L. Bogdanov**, R. Mukhamadiyarov, A. Frolov // Atherosclerosis. – 2020. – Vol. 315. – P. E134.

10. Adventitial and perivascular vascularisation correlates with vascular inflammation and intimal hyperplasia / **L. Bogdanov**, D. Shishkova, R. Mukhamadiyarov, A. Shabaev, A. Kutikhin // Atherosclerosis. – 2021. – Vol. 331. – P. E80.

11. Total and calcification-associated atherosclerotic plaque neovascularisation: The bad cop and the good cop / N. Osyayev, **L. Bogdanov**, R. Mukhamadiyarov, A. Shabaev, A. Kutikhin // Atherosclerosis. – 2021. – Vol. 331. – P. E92-E93.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВВ – *vasa vasorum*; ПВЖТ – периваскулярная жировая ткань; ЭК – эндотелиальные клетки; ВП – *vasa plaquorum*; МПО – миелопероксидаза; КШ – коронарное шунтирование; ВГА – внутренняя грудная артерия; БПВ – большая подкожная вена; СГМК – сосудистые гладкомышечные клетки.

Подписано в печать 17.08.2023

Заказ № 2806

Тираж 100 экз.

Формат 60×84/16

Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,33.

Способ печати – оперативный

Отпечатано в ООО «ВВС-А»

650000, г. Кемерово, ул. Демьяна Бедного, 1, оф. 423

Тел. 8 (3842) 36-86-90