

Закономерности стабилизации атеросклеротической бляшки при различных сценариях кальцификации и васкуляризации неоинтимы

Осяев Н. Ю., Богданов Л. А., Мухамадияров Р. А., Шаббаев А. Р., Шишкова Д. К., Маркова В. Е., Груздева О. В., Кутихин А. Г.

Цель. Комплексное изучение связей между фенотипами бляшек экстракраниальных артерий (стабильный/нестабильный), их кальцификацией и ее причинами, в частности, васкуляризацией атеросклеротической бляшки (АСБ).

Материал и методы. В исследование были включены 88 субъектов: 44 пациента с острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК) по ишемическому типу и 44 пациента с хронической ишемией головного мозга. У всех субъектов определяли параметры системного минерального гомеостаза (общий и ионизированный кальций, фосфор, общий белок, альбумин, способность к формированию кальций-фосфатных бионов). АСБ, полученные в ходе каротидной эндалтерэктомии, фиксировали в формалине, постфиксировали в 1% тетраоксиде осмия, окрашивали в 2% тетраоксиде осмия, обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и ацетоне, окрашивали 2% спиртовым раствором уранилацетата и заливали в эпоксидную смолу с ее дальнейшей полимеризацией. Готовые эпоксидные блоки подвергались шлифовке, полировке, контрастированию цитратом свинца по Рейнольдсу и напылению углеродом с последующей сканирующей электронной микроскопией в обратном-рассеянных электронах. На полученных микрофотографиях определяли количество и площадь кальцификатов и сосудов неоинтимы в программе ImageJ. Статистический анализ проводили при помощи анализа ассоциативных связей по критерию Манна-Уитни и корреляционных связей при помощи коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты. Выявлено, что у пациентов с атеросклерозом экстракраниальных артерий увеличение общей площади (но не количества) кальцификатов в бляшке ассоциировано с ее стабильным фенотипом. Стабилизирующий эффект кальцификации проявлялся в сдерживании прогрессирования стеноза экстракраниальных артерий, ассоциированного с разрывом фиброзной покрышки бляшки и ОНМК. Рост кальцификатов был напрямую связан с выраженностью общего и локального кровоснабжения бляшки, при этом активное локальное кровоснабжение вокруг кальцификатов было ассоциировано со стабильным фенотипом АСБ (таким образом, играя положительную роль), а общее кровоснабжение бляшки, напротив, было ассоциировано с приводящим к ОНМК увеличением стеноза сосудистого просвета, играя отрицательную роль в патогенезе атеросклероза. Кальцификация бляшки также была ассоциирована с развитием нарушений минерального гомеостаза, отрицательно коррелируя с уровнем общего белка и альбумина в крови.

Заключение. Кальцификация АСБ и активное локальное кровоснабжение непосредственно вокруг кальцификатов способствуют уменьшению сосудистого стеноза и стабилизации АСБ. Активное же общее кровоснабжение бляшки способствует прогрессированию атеросклероза и ускоренному наступлению сосудистого события.

Ключевые слова: атеросклероз, ишемический инсульт, неоинтима, кальцификация, стеноз.

Отношения и деятельность. Работа (дизайн, проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных) выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002 "Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов".

ФГБНУ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия.

Осяев Н. Ю.* — лаборант-исследователь лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0002-5186-7873, Богданов Л. А. — м.н.с. лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0003-4124-2316, Мухамадияров Р. А. — к.б.н., с.н.с. лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0002-5558-3229, Шаббаев А. Р. — м.н.с. лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0002-9734-8462, Шишкова Д. К. — м.н.с. лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0002-1518-3888, Маркова В. Е. — лаборант-исследователь лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0002-6652-5745, Груздева О. В. — д.м.н., зав. лабораторией исследований гомеостаза отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0002-7780-829X, Кутихин А. Г. — к.м.н., зав. лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0001-8679-4857.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): osyaev.nikolai@mail.ru

АСБ — атеросклеротическая бляшка, ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, ХИГМ — хроническая ишемия головного мозга, ЭКА — экстракраниальные артерии.

Рукопись получена 10.08.2020

Рецензия получена 01.10.2020

Принята к публикации 02.10.2020



Для цитирования: Осяев Н. Ю., Богданов Л. А., Мухамадияров Р. А., Шаббаев А. Р., Шишкова Д. К., Маркова В. Е., Груздева О. В., Кутихин А. Г. Закономерности стабилизации атеросклеротической бляшки при различных сценариях кальцификации и васкуляризации неоинтимы. *Российский кардиологический журнал*. 2021;26(6):4051. doi:10.15829/1560-4071-2021-4051

Regularities of plaque stabilization in various scenarios of neointimal calcification and vascularization

Osyaev N. Yu., Bogdanov L. A., Mukhamadiyarov R. A., Shabaev A. R., Shishkova D. K., Markova V. E., Gruzdeva O. V., Kutikhin A. G.

Aim. To study the relationships between phenotypes of extracranial arteries' plaques (stable/unstable), their calcification and its causes, in particular, vascularization.

Material and methods. The study included 88 patients: patients (n=44) with ischemic stroke and those (n=44) with chronic brain ischemia. In all subjects, the parameters of systemic mineral homeostasis were assessed (total and ionized calcium, phosphate, total protein, albumin, and calcification propensity). Atherosclerotic plaques have been obtained during carotid endarterectomy, fixed

in formalin, postfixed in 1% osmium tetroxide, stained in 2% osmium tetroxide, dehydrated in ascending ethanol series and acetone, stained with 2% alcoholic uranyl acetate and embedded into epoxy resin with its further polymerization. Epoxy resin blocks were grinded, polished, counterstained with Reynolds' lead citrate and sputter coated with carbon. Sample visualization was performed employing backscattered scanning electron microscopy. Number and area of calcium deposits and neointimal vessels were quantified using ImageJ. Statistical analysis was carried out using Mann-Whitney U-test and Spearman's rank correlation coefficient.

Results. It was found that area of neointimal calcification, but not number of calcium deposits, was associated with the stable plaque phenotype. The stabilizing effect of calcification was manifested in retarding stenosis associated with plaque rupture and stroke. Calcification extent directly correlated with total and local plaque vascularization, which have been associated with unstable and stable plaque phenotype, respectively. In addition, plaque calcification negatively correlated with total protein and albumin, thereby reflecting the impaired systemic mineral homeostasis.

Conclusion. Atherosclerotic plaque calcification and active local vascularization reduce stenosis extent and stabilize plaque. In contrast, total plaque calcification contributes to the atherosclerosis progression and promotes major acute cardiovascular events.

Keywords: atherosclerosis, ischemic stroke, neointima, calcification, stenosis.

Relationships and Activities. The study (design, experiments, analysis and interpretation of data) was supported by a Complex Program of Basic Research of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the Basic Research Topic of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases № 0546-2019-0002 "Pathogenetic basis for the development of cardiovascular

implants from biocompatible materials using patient-oriented approach, mathematical modeling, tissue engineering, and genomic predictors".

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia.

Osyayev N.Yu.* ORCID: 0000-0002-5186-7873, Bogdanov L.A. ORCID: 0000-0003-4124-2316, Mukhamadiyev R.A. ORCID: 0000-0002-5558-3229, Shabaev A.R. ORCID: 0000-0002-9734-8462, Shishkova D.K. ORCID: 0000-0002-1518-3888, Markova V.E. ORCID: 0000-0002-6652-5745, Gruzdeva O.V. ORCID: 0000-0002-7780-829X, Kutikhin A.G. ORCID: 0000-0001-8679-4857.

*Corresponding author: osyayev.nikolai@mail.ru

Received: 10.08.2020 **Revision Received:** 01.10.2020 **Accepted:** 02.10.2020

For citation: Osyayev N.Yu., Bogdanov L.A., Mukhamadiyev R.A., Shabaev A.R., Shishkova D.K., Markova V.E., Gruzdeva O.V., Kutikhin A.G. Regularities of plaque stabilization in various scenarios of neointimal calcification and vascularization. *Russian Journal of Cardiology*. 2021;26(6):4051. (In Russ.) doi:10.15829/1560-4071-2021-4051

Атеросклероз экстракраниальных артерий (ЭКА) по мере своего прогрессирования неизбежно приводит к гемодинамическим нарушениям и недостаточности кровоснабжения головного мозга [1]. В частности, разрыв бляшек в ЭКА приводит к острому несоответствию объема кровоснабжения головного мозга его потребности в кислороде (острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) по ишемическому типу), в то время как постоянное стабильное стенозирование просвета ЭКА клинически проявляется хронической ишемией головного мозга (ХИГМ). Таким образом, клинически бляшки можно подразделить на нестабильные (вызвавшие ОНМК) и стабильные (характеризующиеся постепенным развитием ХИГМ) [2]. Несмотря на принципиальные отличия клинического фенотипа стабильного и нестабильного атеросклероза ЭКА, патофизиологические факторы нестабильности атеросклеротических бляшек (АСБ) и особенно механизмы их регуляции остаются в значительной степени неизвестными. Вместе с тем прогнозирование сердечно-сосудистого исхода у пациентов с мультифокальным атеросклерозом требует ясного понимания регуляции баланса между разрывом и стабилизацией АСБ.

Несмотря на то, что роль кальцификации АСБ в ее стабилизации изучена относительно хорошо в сравнении с рядом других аналогичных патогенетических факторов, причины развития и прогрессирования кальцификации неинтимы, а также причинно-следственные связи между кальцификацией и иными детерминантами нестабильного фенотипа бляшки исследованы недостаточно [3]. Неясно, почему ряд бляшек остается некальцинированным вплоть до наступления сердечно-сосудистого события, и какие факторы являются ведущими в формировании кальцификата. Также остается непонятным, какие типы

кальцификации неинтимы стабилизируют бляшку, а какие, напротив, способствуют ее разрыву.

Изучение указанной проблемы осложняется тем, что пробоподготовка тканей с очагами внескелетной минерализации к гистологическому исследованию чрезвычайно затруднена в силу критического нарушения целостности ткани при микротомной резке вследствие существенных различий в плотности кальцификатов и окружающих их тканей. В результате анализ взаимодействия кальцификации с другими происходящими в неинтиме патологическими процессами становится практически невозможным. Нашей группой ранее был разработан оригинальный метод пробоподготовки кальцинированных бляшек для электронно-микроскопического анализа, заключающийся в окрашивании фиксированных формалином тканей красителями для просвечивающей электронной микроскопии (тетраоксидом осмия и уранилацетатом), дальнейшем заключении обезвоженных тканей в эпоксидную смолу, шлифовке и полировке полимеризованных эпоксидных блоков и последующей сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах после контрастирования цитратом свинца и напыления углеродом [4-6]. Данный метод позволяет полностью сохранить целостность кальцинированных АСБ и исследовать их ко-локализацию с сосудами неинтимы (так называемыми *vasa plaquorum*) [7].

Целью данной работы было комплексное изучение связей между фенотипами бляшек ЭКА (стабильный/нестабильный), их кальцификацией и причинами кальцификации. В конечном счете это позволило выделить типы кальцификации, характерные для стабильных и нестабильных бляшек, а также патоморфологические детерминанты кальцинирующего и некальцинирующего фенотипа при ЭКА.

Материал и методы

В исследование было включено 88 пациентов, госпитализированных в нейрохирургическое отделение государственного бюджетного учреждения здравоохранения “Кузбасский клинический кардиологический диспансер имени академика Л. С. Барбараша” с верифицированным при помощи ультразвукового исследования стенозом брахиоцефальных артерий (44 пациента с ОНМК и 44 пациента с ХИГМ). Бляшки определялись как нестабильные при ОНМК (острой сосудистой катастрофе) и как стабильные — при ХИГМ. Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (дата заседания 10.09.2018, протокол № 100920180-ЛФАА). До включения в исследование от всех пациентов было получено письменное информированное согласие. Цереброваскулярные заболевания (ишемия головного мозга и ишемический инсульт), а также сопутствующие заболевания (артериальная гипертензия, хроническая сердечная недостаточность, хроническая обструктивная болезнь легких, бронхиальная астма, хроническая болезнь почек, сахарный диабет, избыточный вес и ожирение) были диагностированы и подвергнуты лечению согласно соответствующим клиническим рекомендациям и стандартам оказания медицинской помощи, разработанным экспертными медицинскими сообществами (European Society of Cardiology, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, Global Initiative for Asthma, Kidney Disease: Improving Global Outcomes, American Diabetes Association и European Association for the Study of Obesity). Скорость клубочковой фильтрации рассчитывали в соответствии с уравнением Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI). Фракцию выброса левого желудочка оценивали с помощью эхокардиографии (ультразвуковая диагностическая система Sonos 2500, Hewlett Packard). Процент стеноза ЭКА у пациентов с цереброваскулярными заболеваниями оценивался с помощью цветного дуплексного сканирования (Vivid 7 Dimension Ultrasound System, General Electric Healthcare). Данные о возрасте, поле, статусе курения и фармакологическом анамнезе были собраны во время поступления.

У всех пациентов, принимавших участие в исследовании, при поступлении в стационар определяли параметры системного минерального гомеостаза (уровень общего и ионизированного кальция, фосфора, а также концентрации общего белка и альбумина) на автоматическом биохимическом анализаторе (Konelab 60i, Thermo Scientific). Всем пациентам была проведена каротидная эндартерэктомия, в ходе которой у ряда из них (21 пациент с ОНМК и 27 пациен-

тов с ХИГМ) были получены АСБ для дальнейшего ультраструктурного исследования. После суточной фиксации в формалине (B06-003, БиоВитрум) с одной сменой раствора через 12 ч инкубации каждый биоматериал постфиксировали 1% тетраоксидом осмия (OsO_4 , 19110, Electron Microscopy Sciences) в 0,1M фосфатном буфере в течение 12 ч, затем окрашивали 2% тетраоксидом осмия в бидистиллированной воде в течение 48 ч. Далее образцы обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации (50, 60, 70, 80 и 95% этанол, все по две смены, каждая смена по 15 мин), окрашивали 2% уранилацетатом (22400-2, Electron Microscopy Sciences) в 95% этаноле (5 ч), обезвоживали 99,7% изопропанолом (06-002, БиоВитрум) в течение 5 ч и ацетоном (150495, ЛенРеактив) в течение 1 ч, пропитывали смесью ацетона с эпоксидной смолой Epon (14120, Electron Microscopy Sciences) в соотношении 1:1 (6 ч), после чего переносили в свежую порцию эпоксидной смолы (на 24 ч) и далее проводили ее полимеризацию в емкостях FixiForm (40300085, Struers) при 60° С. После этого образцы в эпоксидных блоках подвергали шлифовке и полировке на установке TegraPol-11 (Struers). Контрастирование цитратом свинца (17810, Electron Microscopy Sciences) проводили по Рейнольдсу в течение 7 мин путем нанесения раствора на поверхность шлифованного образца с последующей его отмывкой бидистиллированной водой. Далее проводили напыление на полированную поверхность эпоксидных блоков углерода (толщина покрытия 10-15 нм) с помощью вакуумного напылительного поста (EM ACE200, Leica). Визуализацию структуры образцов при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах проводили на электронном микроскопе Hitachi S-3400N (Hitachi) в режиме BSECOMP при ускоряющем напряжении 10 кВ.

Количество и площадь кальцификатов и сосудов неоинтимы анализировали как по всей бляшке, так и непосредственно вокруг репрезентативных кальцификатов (один на бляшку). Расчет площади кальцификатов и сосудов неоинтимы выполняли при помощи количественного анализа изображений посредством программы ImageJ (National Institutes of Health). Статистическую обработку и графическое представление результатов проводили с помощью программы GraphPad Prism 7 (GraphPad Software). В силу недостаточного для оценки нормальности распределения объема выборки данные описывали непараметрическими критериями (медиана и межквартильное расстояние), межгрупповое сравнение проводили при помощи U-критерия Манна-Уитни, корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу $p \leq 0,05$.

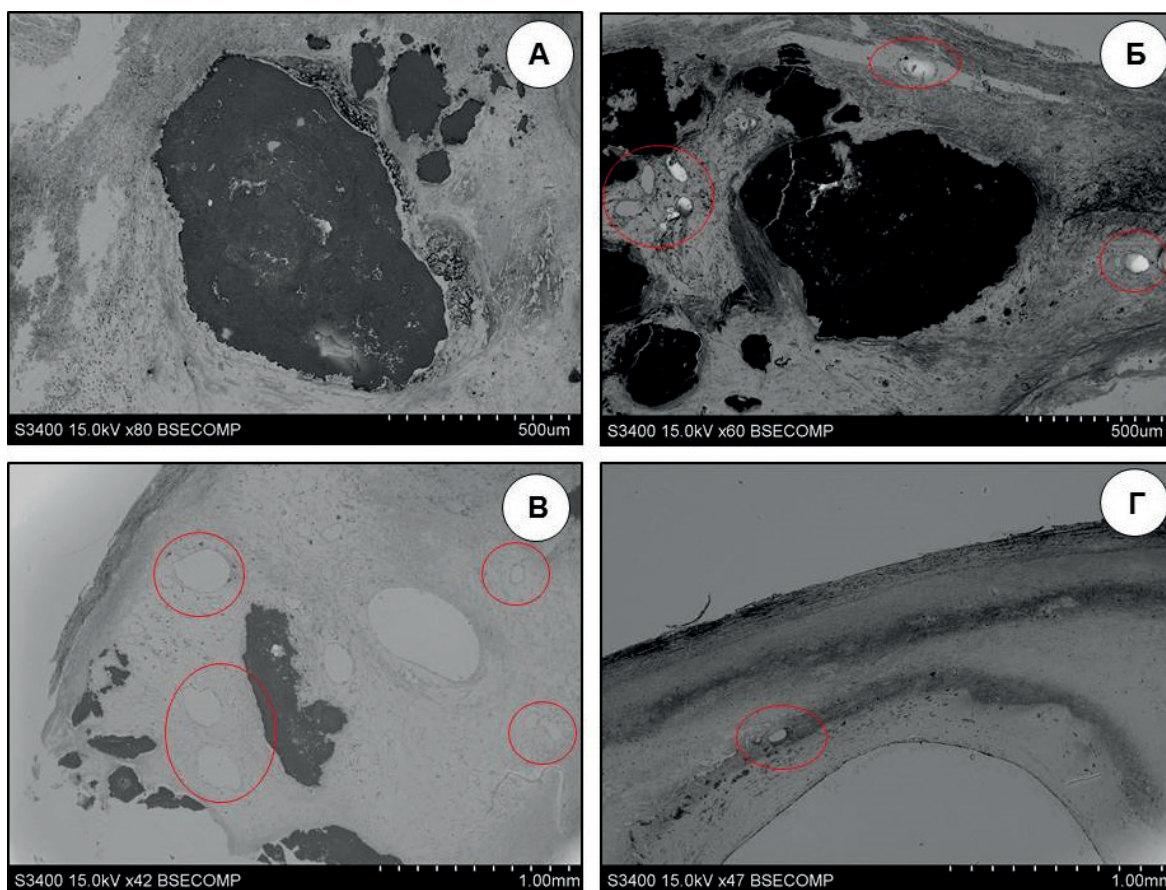


Рис. 1. Взаиморасположение сосудов неоинтимы и кальцификатов в АСБ. **А.** Отсутствие сосудов вокруг кальцификатов; **Б.** Большое количество сосудов непосредственно вокруг кальцификата; **В.** Большое количество сосудов как вокруг кальцификата, так и в самой бляшке; **Г.** Отсутствие кальция, при наличии новообразованных сосудов. Красным цветом обозначены новообразованные сосуды неоинтимы.

Примечание: цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

Результаты

На начальном этапе исследования при изучении ультраструктуры АСБ методом сканирующей электронной микроскопии были установлены основные виды взаиморасположения кальцификатов и сосудов неоинтимы (рис. 1). Это позволило в дальнейшем выявить особенности кальцификации и васкуляризации АСБ при различных фенотипах. В первую очередь была проверена гипотеза о стабилизирующем эффекте кальцификации АСБ, учитывая высокую распространенность и выраженность коморбидных патологий у пациентов (табл. 1). В работах ряда авторов было показано, что кальцификация в целом способствует укреплению АСБ, предохраняя ее от разрыва, однако преобладание микрокальцификатов над макрокальцификатами приводит к обратному эффекту [8]. При электронно-микроскопическом исследовании было выявлено, что увеличение общей площади, но не количества кальцификатов (рис. 2), оказывает стабилизирующее действие на бляшку у пациентов с атеросклерозом ЭКА, что подтверждает данный постулат [9-11]. Таким образом, можно сделать вывод о том, что выраженность кальцифи-

кации препятствует разрыву бляшки и определяет ее стабильный фенотип.

Тем не менее, механизм стабилизации бляшки ее кальцификацией остается неясным. В ходе количественного анализа изображений было обнаружено, что общая площадь (но не общее количество) кальцификатов отрицательно коррелировала с процентом стеноза сосудистого просвета ($r=-0,41$) (табл. 2), который был выше в нестабильных бляшках (ОНМК), чем в стабильных (ХИГМ) (рис. 3). Стоит отметить, что процент стеноза просвета сосуда также положительно коррелировал ($r=0,41$) (табл. 2) с количеством сосудов неоинтимы — показателем, отражающим объем кровоснабжения бляшки и, согласно данным литературы, также способствующим ее росту и разрыву [12]. Можно заключить, что морфологическим субстратом стабилизирующего эффекта кальцификации является сдерживание бляшки от разрастания в просвет сосуда, которое рано или поздно приведет к нестабильности гистоархитектоники неоинтимы и разрыву фиброзной покрывки.

Далее была поставлена задача идентифицировать механизмы прогрессирования кальцификации

Таблица 1

**Гендерно-возрастные характеристики, коморбидные патологии
и фармакологический анамнез включенных в исследование субъектов**

Группа пациентов/изучаемый сопутствующий фактор	Пациенты с хронической ишемией головного мозга	Пациенты с ишемическим инсультом	P
Гендерно-возрастные характеристики			
Мужской пол	26/44 (59,09%)	31/44 (70,46%)	0,37
Возраст	67,0 (61,0-73,7)	64,50 (59,25-70,0)	0,07
Сопутствующие заболевания или патологические состояния			
Артериальная гипертензия	41/43 (95,3%)	39/41 (95,1%)	0,64
Хроническая сердечная недостаточность	36/43 (83,7%)	37/41 (90,2%)	0,57
Хроническая обструктивная болезнь легких или бронхиальная астма	3/43 (7,0%)	7/41 (17,1%)	0,27
Курение	2/43 (4,6%)	6/41 (14,6%)	0,24
Хроническая болезнь почек	4/43 (9,3%)	4/41 (9,8%)	0,76
Сахарный диабет	10/43 (23,2%)	13/41 (31,7%)	0,53
Избыточная масса тела	25/43 (58,1%)	20/41 (48,8%)	0,52
Ожирение	5/43 (11,6%)	9/41 (22,0%)	0,33
Количественные показатели			
Индекс массы тела, кг/м ²	27,6 (24,2-32,0)	26,3 (24,6-32,8)	0,88
Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин/1,73 м ²	73,0 (60,0-82,0)	77,0 (66,0-91,5)	0,13
Фракция выброса левого желудочка, %	64,0 (60,5-65,5)	65,0 (64,0-67,0)	0,10
Процент стеноза брахиоцефальных артерий	75,0 (70,0-83,5)	86,0 (75,5-95,0)	0,01
Лекарственный анамнез до поступления в стационар (клиника НИИ КПССЗ или ГБУЗ "ККД")			
Антиагреганты	25/43 (58,1%)	15/41 (36,6%)	0,08
Бета-адреноблокаторы	16/43 (37,2%)	13/41 (31,7%)	0,76
Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента	7/43 (16,3%)	3/41 (7,3%)	0,35
Статины	29/43 (67,4%)	14/41 (34,1%)	0,01
Нитраты	0/43 (0,0%)	0/41 (0,0%)	0,91
Блокаторы рецепторов к ангиотензину II	16/43 (37,2%)	5/41 (12,2%)	0,02
Антагонисты альдостерона	2/43 (4,7%)	1/41 (2,4%)	0,96
Блокаторы кальциевых каналов	14/43 (32,5%)	5/41 (12,2%)	0,05
Диуретики	0/43 (0,0%)	1/41 (2,4%)	0,97
Антикоагулянты	5/43 (11,6%)	1/41 (2,4%)	0,23

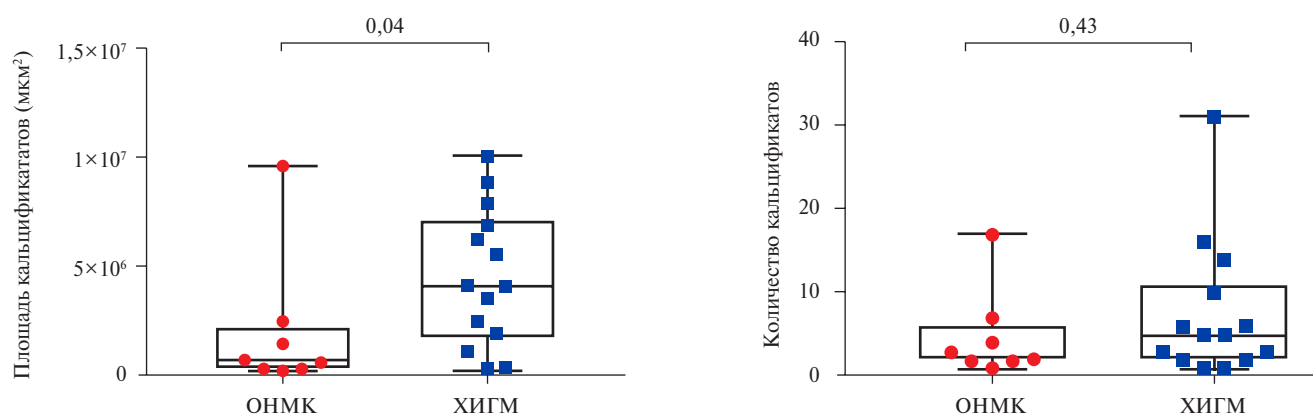


Рис. 2. Общая площадь кальцификатов (слева) и общее количество кальцификатов (справа) в АСБ пациентов с ОНМК и ХИГМ. Критерий Манна-Уитни. Значения P приведены над графиками.

Сокращения: ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, ХИГМ — хроническая ишемия головного мозга.

неоинтимы. Количество и площадь кальцификатов независимо от ее фенотипа коррелировали с общим кровоснабжением неоинтимы (как с количеством, так и с площадью сосудов, $r=0,53-0,60$) (табл. 2)

и с непосредственным кровоснабжением вблизи репрезентативного кальцификата (аналогично, $r=0,52-0,63$) (табл. 2). При этом общее количество и площадь сосудов неоинтимы сильно коррелировали

Таблица 2

Корреляционная матрица оценки взаимосвязей между объемом АСБ, ее кровоснабжением и кальцификацией

Коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r; P)							
	Процент стеноза	Количество сосудов неоинтимы	Площадь сосудов неоинтимы	Количество сосудов неоинтимы вокруг Са	Площадь сосудов неоинтимы вокруг Са	Общая площадь Са	Количество кальцификатов
Процент стеноза		0,41; 0,13	0,33; 0,23	-0,08; 0,83	-0,21; 0,54	-0,41; 0,18	-0,27; 0,39
Количество сосудов неоинтимы	0,41; 0,13		0,94; 0,0001	0,70; 0,0005	0,65; 0,001	0,53; 0,02	0,58; 0,007
Площадь сосудов неоинтимы	0,33; 0,23	0,94; 0,0001		0,70; 0,0004	0,68; 0,001	0,58; 0,008	0,60; 0,006
Количество сосудов неоинтимы вокруг Са	-0,08; 0,83	0,70; 0,0005	0,70; 0,0004		0,96; 0,0001	0,63; 0,003	0,54; 0,01
Площадь сосудов неоинтимы вокруг Са	-0,21; 0,54	0,65; 0,001	0,68; 0,001	0,96; 0,0001		0,56; 0,01	0,52; 0,02
Общая площадь Са	-0,41; 0,18	0,53; 0,02	0,58; 0,008	0,63; 0,003	0,56; 0,01		0,69; 0,0004
Количество кальцификатов	-0,27; 0,39	0,58; 0,007	0,60; 0,006	0,54; 0,01	0,52; 0,02	0,69; 0,0004	

Примечание: статистически значимые корреляции выделены цветом.

Сокращение: Са — репрезентативный кальцификат.

между собой ($r=0,94$) (табл. 2) и коррелировали с количеством и площадью сосудов вокруг кальцификатов ($r=0,65-0,70$) (табл. 2), что подтверждает правомерность использования обеих этих мер для оценки кровоснабжения бляшки. Исходя из вышеннаписанного, можно предположить, что общее и локальное (вблизи кальцификата) кровоснабжение бляшки обуславливает активный рост кальцификата (рис. 4).

Таким образом, возникает парадокс: способствующая стабилизации бляшки кальцификация прогрессирует за счет васкуляризации, которая, однако, ассоциирована с нестабильным фенотипом бляшки. Для объяснения данного парадокса было проведено сравнение выраженности общего кровоснабжения бляшки и локального кровоснабжения вблизи кальцификатов со стабильностью/нестабильностью бляшки. Было выявлено, что активное кровоснабжение непосредственно вблизи репрезентативного кальцификата ассоциировано со стабильным фенотипом АСБ (рис. 5) — в отличие от общего, которое ассоциировано с приводящим к разрыву покрышки ростом бляшки. Поэтому правомерно говорить о “хорошем” локальном кровоснабжении кальцификатов неоинтимы, способствующем его увеличению и стабильности бляшки, и “плохом” общем кровоснабжении неоинтимы, способствующем нестабильности бляшки (рис. 6).

Наконец, было исследовано, ассоциирована ли кальцификация бляшки с параметрами минерального гомеостаза (уровнем общего и ионизированного кальция, фосфора, общего белка, альбумина и фетуина-А). Как общая площадь, так и количество кальцификатов в бляшке отрицательно коррелировало с уровнем общего белка ($-0,37$ и $-0,38$, соответственно) и альбумина ($-0,34$ и $-0,40$, соответствен-

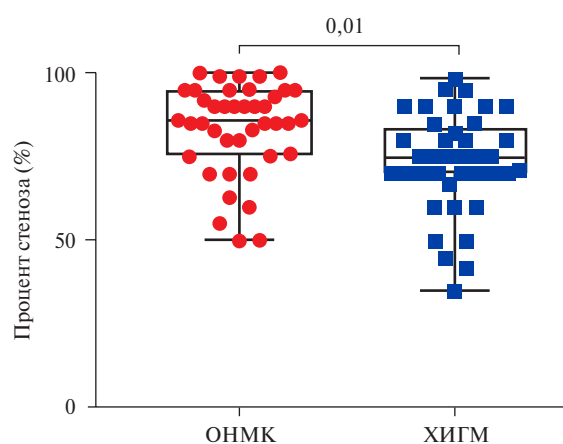


Рис. 3. Процент стеноза сосудистого просвета у пациентов с ОНМК и ХИГМ. Критерий Манна-Уитни. Значение P приведено над графиком.

Сокращения: ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, ХИГМ — хроническая ишемия головного мозга.

но), отражая развитие кальцификации неоинтимы при истощении депо ионов кальция. При этом общая площадь кальцификатов также отрицательно коррелировала с уровнем фосфора ($-0,48$), а количество кальцификатов — с уровнем общего кальция ($-0,38$), что, возможно, свидетельствует о частичном переходе данных ионов из сыворотки в сформированные эктопические (в данном случае бляшечные) кальцификаты.

Обсуждение

Доказано, что кальцификация неоинтимы является длительным, сложным и многофакторным процессом, играющим одну из ключевых ролей в патогенезе атеросклероза, при этом определенные фенотипы кальцификации являются предиктором

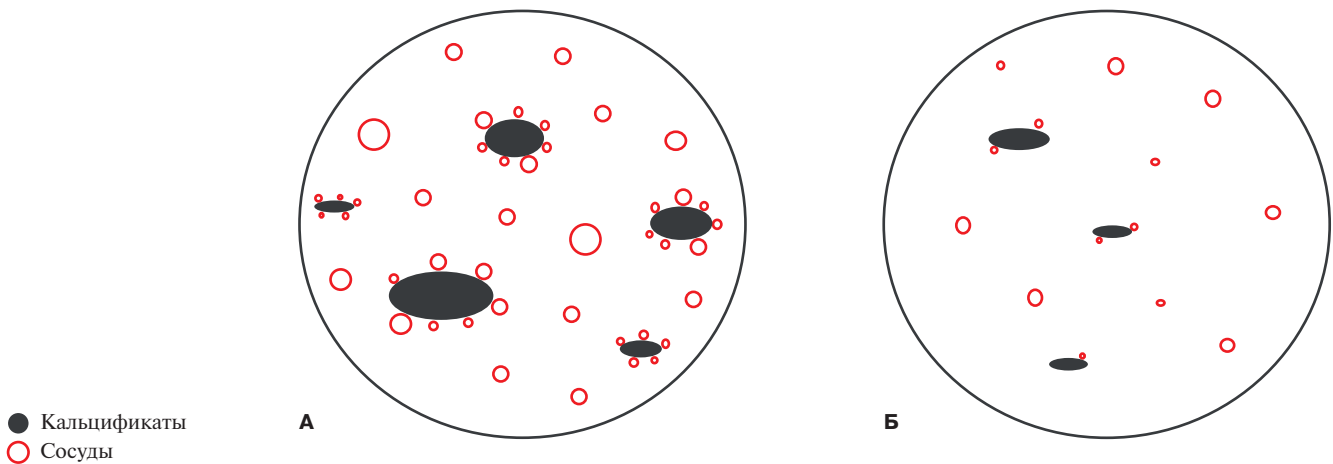


Рис. 4. Схема расположения сосудов неоинтимы в бляшке. А — кальцинирующий фенотип, Б — некальцинирующий фенотип.

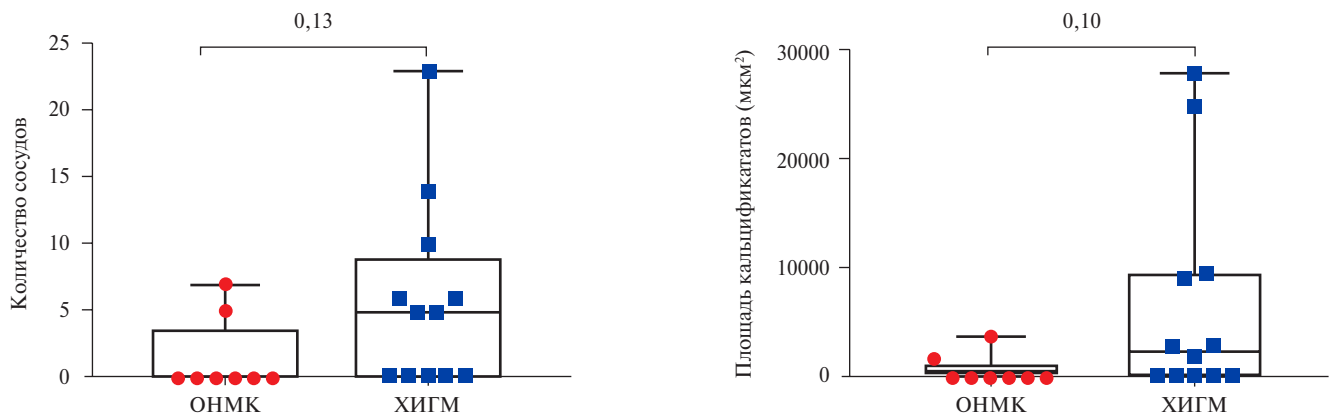


Рис. 5. Общее количество сосудов неоинтимы вокруг репрезентативного кальцификата (слева) и общая площадь сосудов неоинтимы вокруг репрезентативного кальцификата (справа). Критерий Манна-Уитни. Значения P приведены над графиками.

Сокращения: ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, ХИГМ — хроническая ишемия головного мозга.

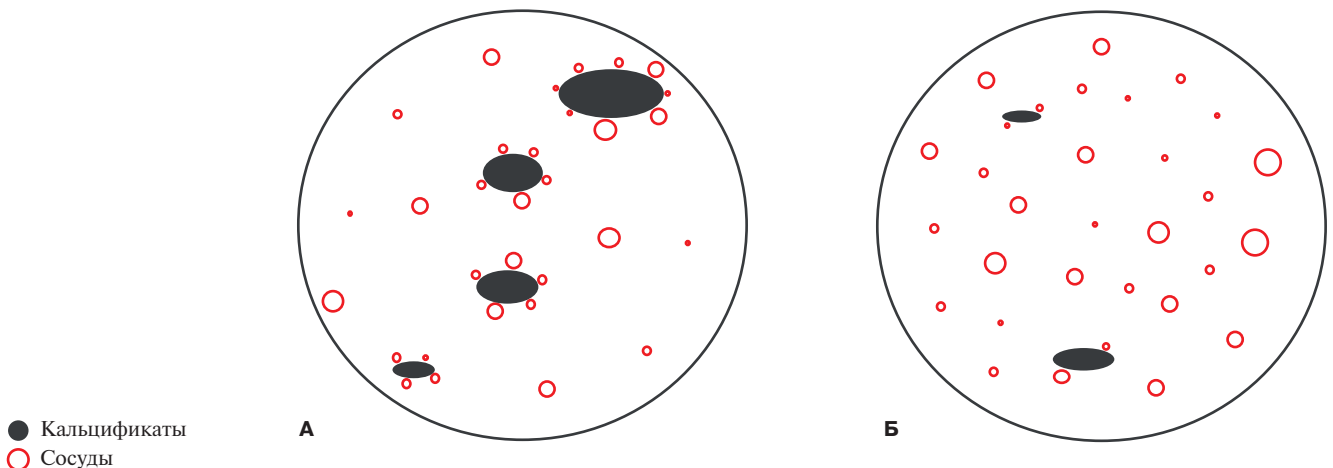


Рис. 6. Схема расположения сосудов неоинтимы в бляшке. А. Стабильный фенотип. Б. Нестабильный фенотип.

прогрессирования АСБ [13]. Комплексное изучение детерминант стабильного и нестабильного атеросклеротического фенотипа позволило сформировать представление о факторах, способствующих

стабилизации АСБ. Согласно литературным данным, увеличение общей площади кальцификации способствовало стабилизирующему эффекту [9-11, 14]. Это было выявлено и в данном исследовании. Поэтому

можно предположить, что выраженность кальцификации определяет стабильный фенотип АСБ и препятствует ее разрыву. Стабилизирующий эффект кальцификации клинически проявляется в уменьшении процента стеноза за счет сдерживания бляшки от разрастания в просвет сосуда.

Новообразованные сосуды неоинтимы насыщают бляшку кислородом и питательными веществами, необходимыми для ее метаболизма, но при этом также способствуют разрастанию АСБ, тем самым увеличивая процент стеноза. По мнению некоторых авторов, активное кровоснабжение каротидной бляшки является фактором, усугубляющим клинический прогноз, и приводит к повышенному риску развития ишемического инсульта [12]. По мере разрастания АСБ увеличивается процент стеноза ЭКА. С уменьшением просвета сосуда увеличивается трансмуральное давление, создаваемое в просвете новообразованных сосудов неоинтимы, что дестабилизирует гемодинамический ответ бляшки на изменения артериального давления и ведет к еще большему ее расширению во время систолы [12]. Согласно литературным данным, сеть новообразованных сосудов занимает до 14% объема тканей неоинтимы [12]. Данные сосуды характеризуются частыми кровоизлияниями в бляшку вследствие несовершенности их стенок и повышенного градиента давления в тканях неоинтимы из-за уменьшения сосудистого просвета и постоянных поперечных пульсирующих движений сосудов неоинтимы [12].

Детальное изучение закономерностей кровоснабжения неоинтимы позволило установить, что ее васкуляризация способствует не только росту АСБ, но также и росту кальцификатов. При исследовании роли васкуляризации в кальцификации АСБ следует уделить внимание особенностям расположения сосудов в АСБ. Активное общее кровоснабжение неоинтимы оказалось наиболее характерным для нестабильного фенотипа (ОНМК). При этом активное локальное кровоснабжение (вокруг репрезентативного кальцификата) способствует росту кальцификата и, следовательно, стабилизации бляшки и развитию стабильного фенотипа (ХИГМ) при атеросклерозе сосудов ЭКА.

На определенном этапе развития бляшки постепенно начинает происходить гибель клеток неоинтимы вследствие выраженных нарушений гомеостаза и нехватки кислорода и питательных веществ при

критическом утолщении внеклеточного матрикса. На определенном этапе фагоциты бляшки перестают эффективно перерабатывать погибшие клетки [15]. Отправной точкой начала кальцификации может служить отложение микроскопических гранул кальция на останках погибших клеток и некротического ядра АСБ. Другими важными аспектами кальцификации являются остеогенная дифференцировка сосудистых гладкомышечных клеток и высокая активность генерирующих фосфаты ферментов, в частности, щелочной фосфатазы [14]. Можно предположить, что разрастание сосудов неоинтимы в области вновь образованного кальцификата способствует постоянной доставке минеральных ионов и биоактивных веществ, необходимых для формирования кальцификата.

Заключение

При комплексном изучении связей между фенотипами бляшек ЭКА можно определить, что для стабильного фенотипа (ХИГМ) АСБ характерно развитие кальцификации неоинтимы (способствующей уменьшению процента стеноза) и активное местное кровоснабжение непосредственно в области формирования макрокальцификата. Активное общее кровоснабжение неоинтимы способствует формированию некальцинирующего нестабильного фенотипа (ОНМК), способствующего быстрому разрастанию АСБ в просвет сосуда, прогрессированию атеросклероза и наступлению неблагоприятного сосудистого события. Особенности кровоснабжения неоинтимы неоспоримо оказывают значительное влияние на процессы формирования кальцификата, а различные типы кальцификации неоинтимы вносят значительный вклад в формирование фенотипа АСБ.

Отношения и деятельность. Работа (дизайн, проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных) выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002 “Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов”.

Литература/References

1. Kaźmierski P, Pająk M, Krus-Hadafa J, et al. Screening test for extracranial carotid lesions' detection in patients of an outpatient vascular clinic. *Pol Przegl Chir.* 2019;91(5):5-11. doi:10.5604/01.3001.0013.4520.
2. Ragino Yul, Volkov AM, Chernyavskiy AM. Stages of atherosclerotic plaque development and unstable plaque types: pathophysiologic and histologic characteristics. *Russian Journal of Cardiology.* 2013;18(5):88-95. (In Russ.) Рагино Ю.И., Волков А.М., Чернявский А.М. Стадии развития атеросклеротического очага и типы нестабильных бляшек — патофизиологическая и гистологическая характеристика. *Российский кардиологический журнал.* 2013;18(5):88-95. doi:10.15829/1560-4071-2013-5-88-95.
3. Nicoll R, Henein M. Arterial calcification: A new perspective? *Int J Cardiol.* 2017;228:11-22. doi:10.1016/j.ijcard.2016.11.099.
4. Mukhamadiyarov RA, Kutikhin AG. Structure of calcificates in human carotid artery atherosclerotic plaques by means of backscattered scanning electron microscopy. *Atherosclerosis.* 2020;16(2):5-15. (In Russ.) Мухамадияров Р.А., Кутихин А.Г. Исследование особенностей структуры кальцификатов в составе атеросклеротических бляшек сонной артерии человека методом сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах. *Атеросклероз.* 2020;16(2):5-15. doi:10.15372/ATER20200201.
5. Mukhamadiyarov RA, Kutikhin AG. Backscattered scanning electron microscopy approach to assess microvessels in health and disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2020;169(4):514-20. (In Russ.) Мухамадияров Р.А., Кутихин А.Г. Оценка сосудов малого диаметра при нормальной микроанатомии и патологической неоваскуляризации с использованием сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2020;169(4):514-20.
6. Mukhamadiyarov RA, Kutikhin AG. Histology and histopathology of blood vessels: backscattered scanning electron microscopy approach. *Fundamental and Clinical Medicine.* 2019;4(1):6-14. (In Russ.) Мухамадияров Р.А., Кутихин А.Г. Исследование нормальной и патологической микроскопической анатомии кровеносных сосудов при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах. *Фундаментальная и клиническая медицина.* 2019;4(1):6-14. doi:10.23946/2500-0764-2019-4-1-6-14.
7. Galis ZS, Lessner SM. Will the real plaque vasculature please stand up? Why we need to distinguish the vasa plaquorum from the vasa vasorum. *Trends Cardiovasc Med.* 2009;19(3):87-94. doi:10.1016/j.tcm.2009.06.001.
8. Shioi A, Ikari Y. Plaque Calcification During Atherosclerosis Progression and Regression. *J Atheroscler Thromb.* 2018;25(4):294-303. doi:10.5551/jat.RV17020.
9. Jinnouchi H, Sato Y, Sakamoto A, et al. Calcium deposition within coronary atherosclerotic lesion: Implications for plaque stability. *Atherosclerosis.* 2020;14:S0021-9150(20)30291-4. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2020.05.017.
10. Otsuka F, Sakakura K, Yahagi K, et al. Has our understanding of calcification in human coronary atherosclerosis progressed? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(4):724-36. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302642.
11. Karlöf E, Seime T, Dias N, et al. Correlation of computed tomography with carotid plaque transcriptomes associates calcification with lesion-stabilization. *Atherosclerosis.* 2019;288:175-85. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2019.05.005.
12. Xu C, Yuan C, Stutzman E, et al. Quest for the Vulnerable Atheroma: Carotid Stenosis and Diametric Strain — A Feasibility Study. *Ultrasound Med Biol.* 2016;42(3):699-716. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2015.11.002.
13. Yahagi K, Kolodgie FD, Lutter C, et al. Pathology of Human Coronary and Carotid Artery Atherosclerosis and Vascular Calcification in Diabetes Mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(2):191-204. doi:10.1161/ATVBAHA.116.306256.
14. Akers EJ, Nicholls SJ, Di Bartolo BA. Plaque Calcification: Do Lipoproteins Have a Role? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(10):1902-10. doi:10.1161/ATVBAHA.119.311574.
15. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, et al. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res.* 2014;114(12):1852-66. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302721.