



## Возможности электронно-микроскопической диагностики кальцификации, патологической неоваскуляризации и эластолиза в сочетании с фенотипированием клеточных популяций в крупных артериях

Мухамадияров Р. А., Клышников К. Ю., Кошелев В. А., Кутихин А. Г.

**Цель.** Определить возможности электронно-микроскопической диагностики классификационных рубрик, отражающих внутрибляшечные патологические процессы (выраженность липидного поражения, толщину и состояние фиброзной покрышки, выраженность патологической неоваскуляризации, наличие, характер и выраженность кальцификации, соотношение и распределение различных клеточных популяций).

**Материал и методы.** Объектами исследования были извлеченные в процессе эндактерэктомии атеросклеротические бляшки из сонной артерии человека и сегменты внутренней грудной артерии человека, извлеченные при выполнении коронарного шунтирования. Целые биоптаты подвергались химической фиксации, окрашиванию солями тяжелых металлов, заливке в эпоксидную смолу с последующей послойной шлифовкой, полировкой, контрастированием, визуализацией при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах и трехмерной реконструкцией с цветовым картированием структур интереса (модифицированный метод EM-BSEM).

**Результаты.** Использование модифицированного метода EM-BSEM позволило: 1) визуализировать толщину фиброзной покрышки и оценить состояние внеклеточного матрикса; 2) провести анализ распределения липидной нагрузки в неинтими; 3) выполнить трехмерную реконструкцию и проанализировать микроокружение кальцификатов различной размерности; 4) визуализировать эндотелиальные клетки, дефекты межэндотелиальных контактов и базальной мембраны капилляров неинтимы с их последующей трехмерной реконструкцией; 5) выполнить анализ возраст-зависимых дефектов базальной мембраны и внутренней эластической мембраны внутренней грудной артерии. Разрешение полученных изображений существенно превосходило методы внутрисосудистой визуализации (внутрисосудистое ультразвуковое исследование и оптическую когерентную томографию), позволяя дополнительно оценить текучесть капилляров, степень инкапсуляции кальцификатов и состояние эластических волокон. Трехмерная реконструкция кальцификатов, капилляров неинтимы и эластических волокон позволила оценить их пространственную плотность и гетерогенность. Одновременно с идентификацией и оценкой указанных гистологических структур было выполнено объективное фенотипирование клеточных популяций, которое позволяло выделить в атеросклеротических бляшках макрофаги и пенные клетки, сосудистые гладкомышечные клетки, фибробласты и эндотелиальные клетки и автоматически идентифицировать их посредством цветового картирования, определяемого сигнатурами распределения их электронного контраста.

**Заключение.** Модифицированный метод EM-BSEM позволяет осуществлять универсальную электронно-микроскопическую диагностику атеросклеротического и эластического поражения крупных артерий с высокой информативностью о патологических процессах сосудистого ремоделирования и высокой точностью определения соответствующих им классификационных рубрик. Уникальные для каждой клеточной популяции сигнатуры распределения электронного контраста обозначают возможность их автоматизированного фенотипирования при помощи специализированных нейросетевых алгоритмов.

**Ключевые слова:** электронная микроскопия, атеросклероз, неоваскуляризация, кальцификация, эластолиз, фенотипирование.

**Отношения и деятельность.** Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2024-0001 "Разработка новых фармакологических подходов к экспериментальной терапии атеросклероза, технологий серийного производства реактивов и расходных материалов для изучения физиологии и патофизиологии сердечно-сосудистой системы и программного обеспечения на основе искусственного интеллекта для автоматизированной диагностики патологий системы кровообращения и автоматизированного расчета сердечно-сосудистого риска" при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках национального проекта "Наука и университеты".

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

Мухамадияров Р. А. — к. б. н., доцент, с. н. с. лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины, ORCID: 0000-0002-5558-3229, Клышников К. Ю. — к. м. н., н. с. лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины, ORCID: 0000-0003-3211-1250, Кошелев В. А. — м. н. с. лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины, ORCID: 0000-0001-6840-1116, Кутихин А. Г. — д. м. н., зав. лабораторией молекулярной, трансляционной и цифровой медицины, ORCID: 0000-0001-8679-4857.

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): antonkutikhin@gmail.com

АСБ — атеросклеротическая бляшка, EM-BSEM — EMbedding and Backscattered Scanning Electron Microscopy (сканирующая электронная микроскопия в обратно-рассеянных электронах после заключения окрашенных тяжелыми металлами тканей в эпоксидную смолу).

Рукопись получена 18.04.2024

Рецензия получена 13.08.2024

Принята к публикации 15.08.2024



**Для цитирования:** Мухамадияров Р. А., Клышников К. Ю., Кошелев В. А., Кутихин А. Г. Возможности электронно-микроскопической диагностики кальцификации, патологической неоваскуляризации и эластолиза в сочетании с фенотипированием клеточных популяций в крупных артериях. *Российский кардиологический журнал*. 2024;29(8):5909. doi: 10.15829/1560-4071-2024-5909. EDN LFYXHO

## Potential of diagnostic electron microscopy of calcification, pathological neovascularization and elastolysis in combination with phenotyping of cell populations in large arteries

Mukhamadiyarov R. A., Klyshnikov K. Yu., Koshelev V. A., Kutikhin A. G.

**Aim.** To determine the potential of diagnostic electron microscopy of intraplaque processes (severity of lipid damage, fibrous cap thickness and condition, severity of pathological neovascularization, presence, nature and severity of calcification, ratio and distribution of various cell populations).

**Material and methods.** The study objects were plaques removed during endarterectomy from the human carotid artery and segments of the human internal mammary artery removed during coronary bypass surgery. Whole specimens were subjected to chemical fixation, staining with heavy metal salts, embedding in epoxy

resin followed by layer-by-layer grinding, polishing, contrasting, visualization using back-scattered electron scanning electron microscopy and three-dimensional reconstruction with color mapping (modified EM-BSEM).

**Results.** The use of a modified EM-BSEM made it possible to: 1) visualize the fibrous cap thickness and assess the extracellular matrix; 2) analyze the neointimal lipid distribution; 3) perform three-dimensional reconstruction and analyze the microenvironment of calcifications of various sizes; 4) visualize endothelial cells, defects in interendothelial contacts and the basement membrane of neointimal capillaries with their subsequent three-dimensional reconstruction; 5) perform an analysis of age-dependent defects in the basement membrane and internal elastic membrane of the internal mammary artery. The resolution of the obtained images was significantly superior to intravascular imaging methods (intravascular ultrasound and optical coherence tomography), allowing additional assessment of capillary fluidity, the degree of calcification encapsulation and the condition of elastic fibers. Three-dimensional reconstruction of calcifications, neointimal capillaries and elastic fibers made it possible to assess their spatial density and heterogeneity. Simultaneously with the identification and assessment of these histological structures, objective phenotyping of cell populations was performed, which made it possible to isolate macrophages and foam cells, vascular smooth muscle cells, fibroblasts and endothelial cells in atherosclerotic plaques and automatically identify them through color mapping determined by their electronic contrast distribution signatures.

**Conclusion.** The modified EM-BSEM method allows for universal electron microscopic diagnosis of atherosclerotic and elastolytic lesions of large arteries with high information content about vascular remodeling and high accuracy. Electronic contrast distribution signatures unique for each cell population indicate the possibility of their automated phenotyping using specialized neural network algorithms.

**Keywords:** electron microscopy, atherosclerosis, neovascularization, calcification, elastolysis, phenotyping.

**Relationships and Activities.** The work was supported by a comprehensive fundamental research program of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the fundamental theme of the Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases № 0419-2024-0001 "Development of new pharmacological approaches to experimental therapy of atherosclerosis, technologies for serial production of reagents and consumables for studying the physiology and pathophysiology of the cardiovascular system and software based on artificial intelligence for automated diagnosis of cardiovascular pathologies and automated calculation of cardiovascular risk" with financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the national project "Science and Universities".

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

Mukhamadiyarov R. A. ORCID: 0000-0002-5558-3229, Klyshnikov K. Yu. ORCID: 0000-0003-3211-1250, Koshelev V. A. ORCID: 0000-0001-6840-1116, Kutikhin A. G. \* ORCID: 0000-0001-8679-4857.

\*Corresponding author:  
antonkutikhin@gmail.com

**Received:** 18.04.2024 **Revision Received:** 13.08.2024 **Accepted:** 15.08.2024

**For citation:** Mukhamadiyarov R. A., Klyshnikov K. Yu., Koshelev V. A., Kutikhin A. G. Potential of diagnostic electron microscopy of calcification, pathological neovascularization and elastolysis in combination with phenotyping of cell populations in large arteries. *Russian Journal of Cardiology*. 2024;29(8):5909. doi: 10.15829/1560-4071-2024-5909. EDN LFYXHO

Несмотря на существенные достижения прижизненной внутрисосудистой визуализации и виртуальной гистологии окклюзионно-стенотических поражений крупных артерий человека [1, 2], возможности их патоморфологической визуализации после извлечения из организма человека остаются довольно ограниченными. Методики, применяемые для анализа макро- и микрокальцификатов элементов системы кровообращения (окрашивание по Коссу и ализариновым красным), требуют предварительной микротомии или криотомии извлеченных биологических тканей для подготовки гистологических срезов, что приводит к критическому нарушению их целостности вследствие несовпадения плотности ткани и плотности эктопических кальцификатов [3]. Естественное изменение геометрии самих кальцификатов в составе ткани делает в известной степени стохастическим их анализ по одному срезу или нескольким последовательным срезам, требуя для объективной оценки около десятка срезов, равномерно распределенных по всей длине или толщине извлеченного сегмента ткани, что представляется не всегда возможным [3]. Кроме того, низкая сохранность кальцификатов и окружающих их биологических тканей при микротомии или криотомии не позволяет выполнить полноценный анализ их микроокружения и химического состава [3]. Проблемы сопоставимого масштаба возникают и при анализе неоваскуляризации элементов системы крово-

обращения (в частности, неоинтимы и адвентиции крупных артерий), поскольку широко применяемое иммуногистохимическое окрашивание не позволяет определить ряд патофизиологически важных признаков патологической васкуляризации (степень нарушения целостности межэндотелиальных контактов, толщину и дефекты базальной мембраны, выраженность кровотечения из микрососуда в ткань), позволяя детектировать исключительно факт наличия сосуда, его топографию и, до некоторой степени, его геометрию [4, 5]. Кроме того, геометрия малых сосудов (в особенности не имеющих эластической мембраны вен и капилляров) также может подвергаться значительному изменению при микротомии или криотомии, что не позволяет адекватно оценить объем поступающего через патологически измененные сосуды кровоснабжения [4, 5]. Наконец, рутинный гистологический анализ и световая микроскопия имеют относительно низкую ценность при детекции нарушений целостности артериальных эластических волокон, которые неизбежно сопровождают старение организма, позволяя обнаруживать лишь наиболее крупные дефекты в силу относительно малого разрешения [6].

С точки зрения патоморфологии и патофизиологии методологическим решением всех вышеописанных проблем является применение электронной микроскопии, однако классический метод ультраструктурного анализа биологических тканей — про-

## Ключевые моменты

## Что уже известно о предмете исследования?

- Новый вариант электронной микроскопии биологических тканей позволяет осуществлять анализ цельных и интактных сегментов элементов системы кровообращения, в т.ч. кальцинированных атеросклеротических бляшек.

## Что нового?

- Электронно-микроскопическая диагностика атеросклеротических бляшек позволяет с высокой точностью выполнять оценку ряда характеристик, ассоциированных с их нестабильностью: толщины фиброзной покрышки, распределения и объема липидного поражения, распределения и доли макрофагов, характера кальцификации.

## Возможный вклад в клиническую практику

- Анализ результатов патофизиологической и клинической эффективности антиатеросклеротической терапии в клинических и доклинических испытаниях.

## Key messages

## What is already known about the subject?

- A novel version of electron microscopy of biological tissues allows the analysis of whole and intact segments of elements of cardiovascular system, including calcified atherosclerotic plaques.

## What might this study add?

- Diagnostic electron microscopy of atherosclerotic plaques allows high accuracy assessment of the following instability-associated parameters: fibrous cap thickness, lipid distribution and volume, macrophage distribution and proportion, the nature of calcification.

## How might this impact on clinical practice?

- Analysis of the results of pathophysiological and clinical effectiveness of anti-atherosclerotic therapy in clinical and preclinical trials.

свечивающая электронная микроскопия — неминуемо сопряжен с потерей большого количества ценного материала вследствие необходимости ультрамикротомии и также не позволяет проводить объективный анализ кальцификации. Тем не менее недавно разработанный и внедренный в практику оригинальный метод EM-BSEM (окрашивание цельных сегментов тканей солями тяжелых металлов с их последующим заключением в эпоксидную смолу, шлифовкой и полировкой эпоксидных блоков и визуализацией при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах) позволяет полностью сохранить целостность биологических тканей (в т.ч. элементов системы кровообращения) и исследовать их с электронно-микроскопическим разрешением в полностью интактном состоянии с сохраненной геометрией кальцификатов и сосудов микроциркуляторного русла, а также визуализировать даже незначительные дефекты эластических волокон [7]. До недавнего времени указанный метод позволял осуществлять лишь классический двухмерный анализ электронно-микроскопических изображений, однако в последние месяцы была разработана технология равномерной послойной шлифовки и полировки эпоксидных блоков с заключенными в них биологическими тканями с их последующей съемкой и трехмерной реконструкцией. Кроме того, добавление в процесс пробоподготовки ряда химических веществ для усиления электронного контраста

биополимеров (в частности, ферроцианида калия, тиокарбогидрида, фосфорновольфрамовой кислоты и лантаноидов) позволила существенно улучшить визуализационные характеристики и разрешающую способность метода EM-BSEM. Было предположено, что в совокупности модифицированный метод EM-BSEM позволяет визуализировать все патофизиологически важные компоненты крупных артерий (фиброзную покрышку, скопления пенистых клеток, сосуды микроциркуляторного русла, очаги эктопической кальцификации, эластические волокна, пучки коллагеновых волокон), выполнять типирование сосудистых клеточных популяций, различать виды сосудов микроциркуляторного русла (артериол, венул и капилляров) и определять их патологическую проницаемость путем детекции межэндотелиальных контактов и дефектов базальной мембраны.

В статье показаны возможности применения метода EM-BSEM для электронно-микроскопической диагностики кальцификации, патологической неоваскуляризации и эластолиза в крупных артериях человека. Продемонстрирована возможность фенотипирования клеточных популяций и анализа микроморфологических признаков патологической неоваскуляризации и кальцификации в атеросклеротических бляшках (АСБ) сонной артерии человека. На примере трехмерной электронно-микроскопической визуализации возраст-зависимой деградации внутренней эластической мембраны и базальной мембраны внутренней грудной артерии показана возможность анализа эластолиза, предшествующего формированию неоинтимы в артериях и сопровождающего старение человека. Полученные

результаты свидетельствуют о применимости технологии EM-BSEM для анализа патоморфологии крупных артерий в целом и АСБ в частности, особенно, при проведении клинических испытаний для профилактики и терапии атеросклероза периферических артерий, доклинических испытаний и патофизиологических исследований.

### Материал и методы

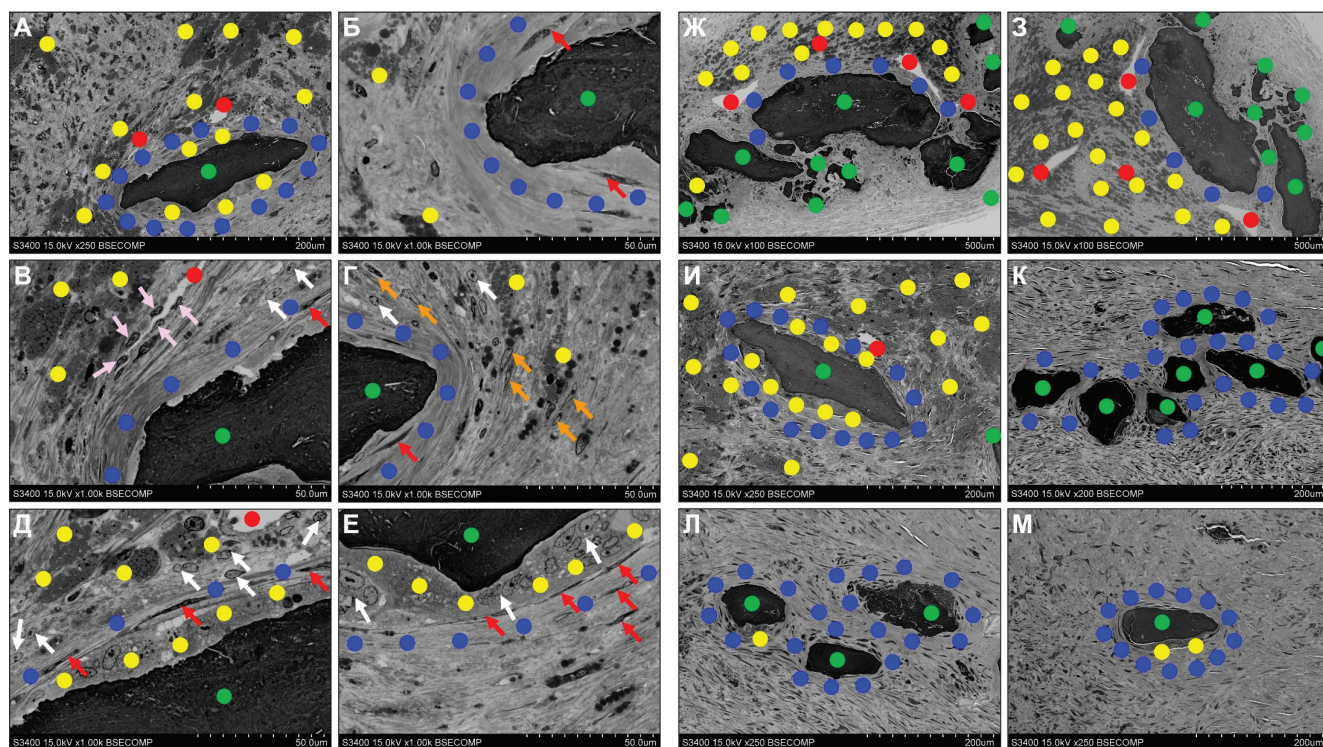
Для патоморфологического анализа были использованы АСБ сонной артерии человека, извлеченные в процессе эндартерэктомии у пациентов с хронической ишемией головного мозга в отделении нейрохирургии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения "Кузбасский клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша", а также сегменты левой внутренней грудной артерии, извлеченные в процессе коронарного шунтирования у пациентов с ишемической болезнью сердца в отделении кардиохирургии № 1 Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний". Протокол исследования и сбор клинических образцов были одобрены Локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (протокол заседания ЛЭК № 9 от 10.09.2021). Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации (2013). До включения в исследование у всех участников было получено письменное информированное согласие.

Образцы АСБ и сегменты внутренней грудной артерии были: 1) подвергнуты химической фиксации в 2,5% растворе глутарового альдегида (G6257, Sigma-Aldrich) на 0,1M фосфатном буфере (3 смены — через 10 мин, 4 и 16 ч при 4° C) и отмыты в чистом 0,1M фосфатном буфере (4 смены по 20 мин); 2) постфиксированы в 1% растворе тетраоксида осмия на 0,1M фосфатном буфере (19102, Electron Microscopy Sciences) с 1,5% ферроцианидом калия (8.06.00423, ChemExpress) в течение 16 ч и отмыты в чистом 0,1M фосфатном буфере (4 смены по 20 мин); 3) инкубированы с 1% тиокарбогидразидом (21900, Electron Microscopy Sciences) в течение 16 ч при 60° C и отмыты в бидистиллированной воде (4 смены по 20 мин); 4) окрашены в 2% водном растворе тетраоксида осмия (19102, Electron Microscopy Sciences) в течение 16 ч и отмыты в бидистиллированной воде (4 смены по 20 мин); 5) контрастированы в 1% водном растворе фосфорновольфрамовой кислоты (200209, ЛенРеактив) в течение 16 ч и отмыты в бидистиллированной воде (4 смены по 20 мин); 6) окрашены в 2% водном растворе триацетата гадолиния (CAS 100587-93-7, Химметпродукт) в течение 16 ч и отмыты в бидистиллированной воде (4 смены по 20 мин); 7) обез-

вожены в этаноле возрастающей концентрации (70% этанол, 3 смены по 15 мин; 80% этанол, 3 смены по 20 мин; 95% этанол, 3 смены по 30 мин), изопропанол (13-5, ЭКОС-1, 4 смены по 15 мин) и ацетоне (13-5, ЭКОС-1, 3 смены по 30 мин); 8) пропитаны в смеси ацетона (13-5, ЭКОС-1) и эпоксидной смолы (Araldite 502, 13900, Electron Microscopy Sciences) в соотношении 1:1 в течение 16 ч; 9) пропитаны в чистой эпоксидной смоле (Araldite 502, 13900, Electron Microscopy Sciences) в течение 24 ч и полимеризованы в свежей эпоксидной смоле (Araldite 502, 13900, Electron Microscopy Sciences) в течение 24 ч при 60° C.

Далее на шлифовально-полировальном станке TegraPol-11 (Struers) была проведена шлифовка до глубины исследуемого образца с использованием шлифовальных дисков с размером зерен 800 grit (40400138, Struers) или 1200 grit (40400140, Struers) и полировкой дисками из нетканого материала (M620, NX MET) с использованием суспензий монокристаллических алмазов с диаметром 9 мкм и 6 мкм (ПОЛИЛАБ PRO), дисками из тканого шелка (M500, NX MET) с использованием суспензии монокристаллических алмазов с диаметром 3 мкм (ПОЛИЛАБ PRO) и бархатным кругом без абразива (экстрематный флок, M200, NX MET). После завершения полировки было проведено контрастирование образцов цитратом свинца по Рейнольдсу собственного приготовления в течение 7 мин с последующей отмывкой блока в 3 сменах бидистиллированной воды по 20 мин и высушиванием при комнатной температуре в течение 1 ч. После напыления поверхности заключенного в эпоксидный блок образца углеродом с толщиной покрытия 10-15 нм (EM ACE200, Leica Microsystems) была проведена визуализация при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах с ускоряющим напряжением 12 или 15 кВ (Hitachi S-3400N, Hitachi).

После визуализации исходного шлифа с целью трехмерной реконструкции анализируемой ткани была проведена послойная шлифовка, полировка и съемка эпоксидных блоков с заключенными в них АСБ из сонной артерии и сегментами внутренней грудной артерии. Для определения стабильности послойной шлифовки и обеспечения отсутствия необходимости контакта толщиномера с поверхностью эпоксидного блока была разработана бесконтактная гравиметрическая методика определения толщины шлифа, предотвращающая его загрязнение. В ходе выполнения этой методики эпоксидный блок промывали в проточной воде, протирали салфетками и высушивали на воздухе в течение 12 ч, а затем в вакуумном импрегнаторе CitoVac (Struers) в течение 3 ч. После сушки измеряли толщину и массу эпоксидного блока. Далее выполняли шлифовку и полировку эпоксидного блока на глубину 3-4 мм. Образец отмывали и просушивали согласно описанной выше



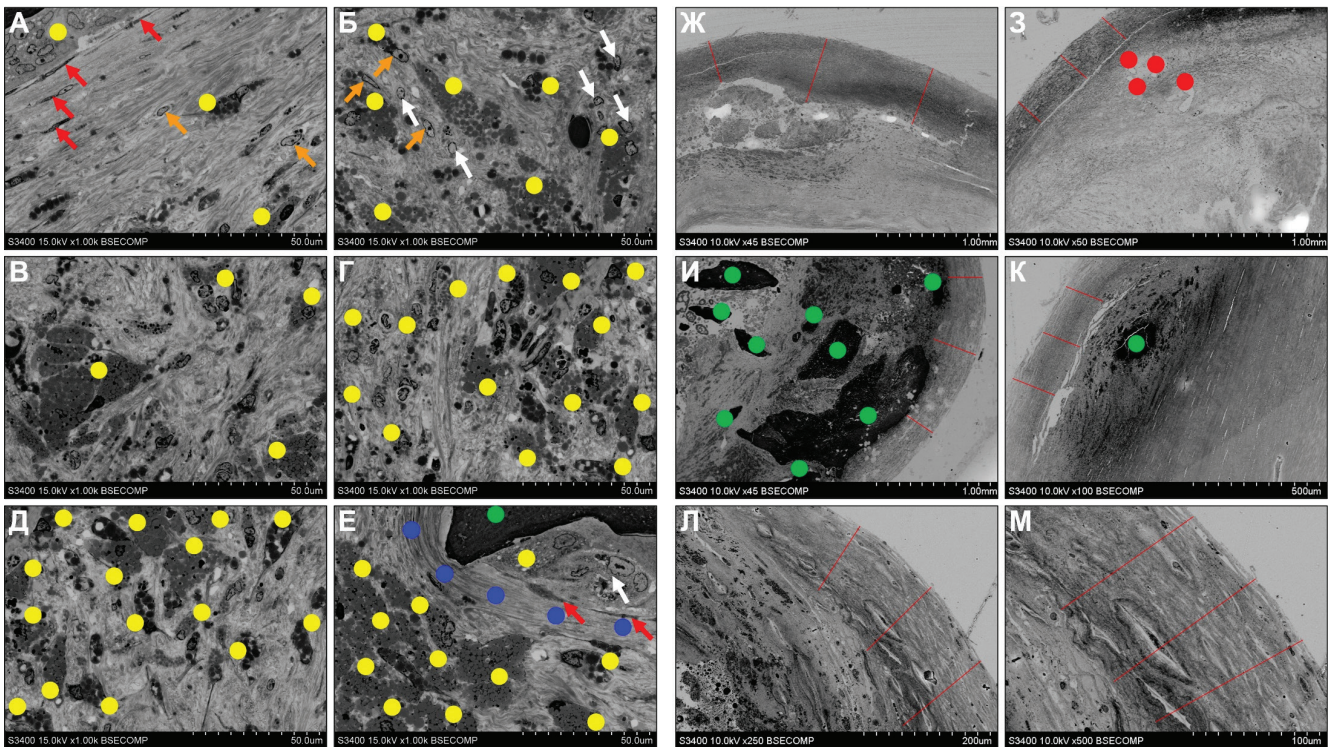
**Рис. 1.** Визуализация располагающихся в АСБ сонной артерии кальцификатов и их микроокружения.

**Примечание:** локализация скоплений пенистых клеток обозначена желтыми точками, плотной оформленной соединительной ткани — синими точками, кальцификатов — зелеными точками, капилляров неоинтимы — красными точками. Фибробласты обозначены красными стрелками, эндотелиальные клетки — розовыми стрелками, сосудистые гладкомышечные клетки (гладкие миоциты) — оранжевыми стрелками, макрофаги — белыми стрелками. Обратите внимание на продолговатые ядра фибробластов окружающей кальцификаты соединительнотканной капсулы и на округленные или продолговатые ядра выстилающих капилляры неоинтимы эндотелиальных клеток. **А.** Кальцификат с окружающими его капиллярами и оформленной соединительнотканной капсулой, прилежащей непосредственно к нему или отделенной от него пенистыми клетками. **Б.** Кальцификат, окруженный соединительнотканной капсулой с небольшим количеством скоплений пенистых клеток за ее пределами. **В, Г.** Части кальцификата из **А**, окруженные непосредственно прилежащей к нему оформленной соединительнотканной капсулой и скоплениями пенистых клеток за ее пределами. **Д, Е.** Часть кальцификата из **А**, окруженная непосредственно прилежащими к нему пенистыми клетками и оформленной соединительнотканной капсулой за их пределами. **Ж.** Скопление кальцификатов различной размерности, окруженные соединительнотканной капсулой, большим скоплением пенистых клеток за ее пределами и находящимися рядом многочисленными капиллярами. **З.** Скопление кальцификатов различной размерности из **Ж** под другим ракурсом. **И.** Кальцификат, непосредственно окруженный прилежащими пенистыми клетками, оформленной соединительнотканной капсулой за их пределами и большим количеством пенистых клеток в микроокружении. **К, Л, М.** Ряд микрокальцификатов, окруженных соединительнотканной капсулой и небольшим количеством пенистых клеток. Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

методике, после чего вновь измеряли толщину и массу эпоксидного блока. Разделив изменение массы блока на изменение его толщины, получали коэффициент пересчета (1 мкм толщины эпоксидного блока соответствовал 0,61 мг). На основании полученных данных был выбран режим шлифовки и полировки, при котором толщина шлифа составляла 2,5–2,7 мкм за один цикл. В нашем случае это составляло 18 мин полировки блока на диске с алмазными частицами 15 мкм и 15 мин на диске с алмазными частицами 6 мкм. В качестве лубриканта использовали DP-Lubricant Blue (Struers). После каждого цикла полировки перед очередным использованием оба диска тщательно отмывали сначала в мыльной воде, затем в теплой проточной воде. В таком варианте удавалось стабильно получать установленную в ходе калибровки толщину сошлифованного слоя (шлифа) в 2,5–2,7 мкм. Если в ходе послойной шлифовки

и последовательной электронно-микроскопической визуализации требовалось получить изображение с большой площадью поверхности, съемку выполняли так, что для получения полной картины требовалось выполнить 4–6 снимков (2×2 или 2×3). Для более мелких структур выполняли только один снимок с высоким разрешением для каждого слоя. Процедуру послойной шлифовки, полировки, контрастирования, напыления углеродом и электронно-микроскопической визуализации повторяли необходимое количество раз. После шлифовки каждого слоя эпоксидные блоки взвешивали для контроля стабильности шлифовки.

Далее все послойные шлифы эпоксидных блоков были упорядочены и подвергнуты трехмерной реконструкции с последовательным объединением в совокупность слоев с учетом электронно-микроскопического разрешения и масштаба и дальнейшим



**Рис. 2.** Визуализация липидного поражения и фиброзной покрышки АСБ сонной артерии.

**Примечание:** локализация скоплений пенистых клеток обозначена желтыми точками, плотной оформленной соединительной ткани — синими точками, кальцификатов — зелеными точками, капилляров неоинтимы — красными точками. Толщина фиброзной покрышки обозначена красными линиями. Фибробласты обозначены красными стрелками, эндотелиальные клетки — розовыми стрелками, сосудистые гладкомышечные клетки (гладкие миоциты) — оранжевыми стрелками, макрофаги — белыми стрелками. **А.** Участок АСБ с невысокой липидной нагрузкой (бедный пенистыми клетками). **Б, В.** Участки АСБ со средней липидной нагрузкой (с равномерно распределенными пенистыми клетками). **Г, Д.** Участки АСБ с высокой липидной нагрузкой (богатые пенистыми клетками). **Е.** Тотальное липидное поражение участка АСБ возле кальцификата с оформленной соединительнотканной капсулой. **Ж, З.** Измерение толщины фиброзной покрышки участков АСБ без кальцификации. **И, К.** Измерение толщины фиброзной покрышки участков АСБ с кальцификатами. **Л, М.** Измерение толщины фиброзной покрышки на участках АСБ с более высоким увеличением. Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

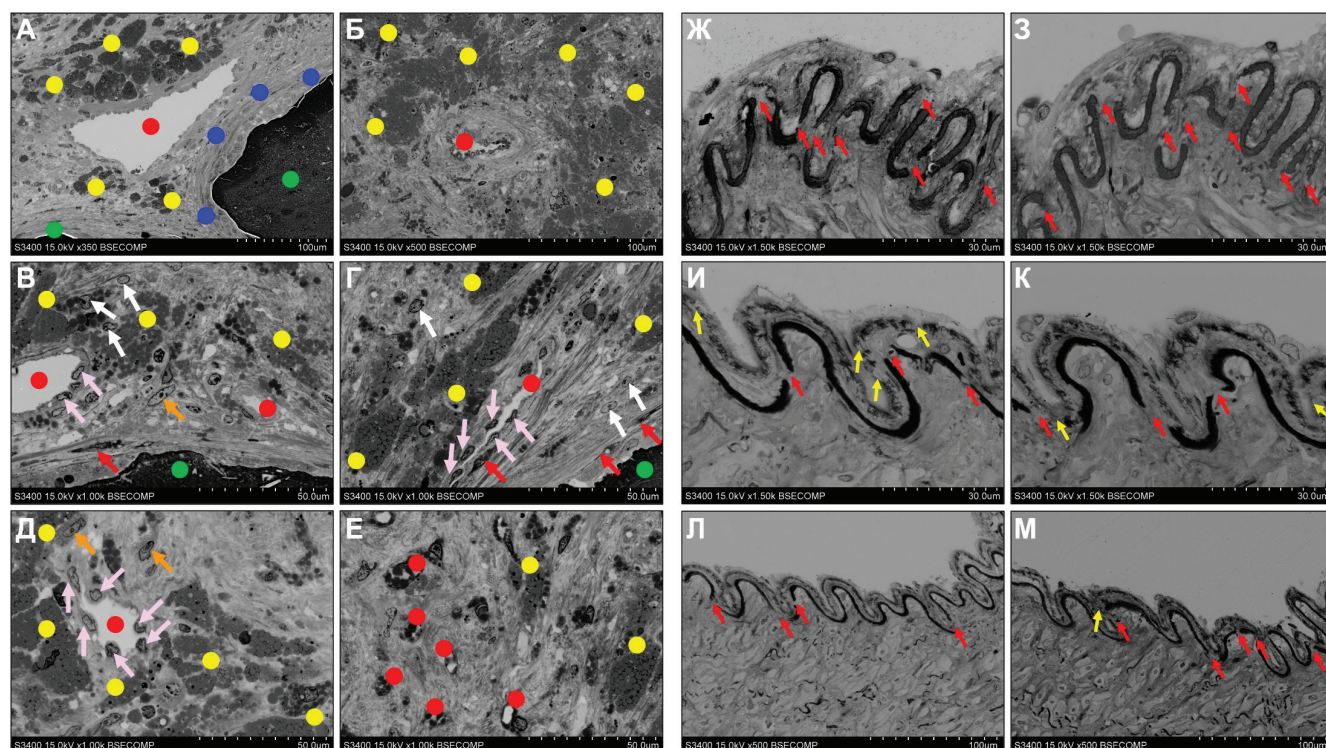
построением объемного изображения исследованных объектов в среде Amira (Thermo Fisher Scientific). Для визуализации наиболее информативных областей изображения отсекали только электронноплотные пиксели — в диапазоне 120–220 единиц восьмибитных изображений. Таким образом, при трехмерной визуализации отображали только участки высокой плотности, соответствующие областям кальцификации и некоторым целевым объектам: пенистым клеткам и соединительной ткани. После выполнения всех представленных процедур и условий были получены трехмерные черно-белые проекции рассматриваемых объектов. Далее полученные объекты переводили в цветной вид и осуществляли цветовое картирование ключевых объектов интереса: капилляров неоинтимы, крупных и мелких кальцификатов неоинтимы АСБ сонной артерии и внутренней эластической мембраны внутренней грудной артерии.

Разработка дизайна исследования, сбор, анализ и интерпретация данных и подготовка статьи выполнены при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рам-

ках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2024-0001 "Разработка новых фармакологических подходов к экспериментальной терапии атеросклероза, технологий серийного производства реактивов и расходных материалов для изучения физиологии и патофизиологии сердечно-сосудистой системы и программного обеспечения на основе искусственного интеллекта для автоматизированной диагностики патологий системы кровообращения и автоматизированного расчета сердечно-сосудистого риска" и в рамках национального проекта "Наука и университеты", реализуемого Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

## Результаты

С целью изучения способности модифицированного метода электронно-микроскопической диагностики ЕМ-BSEM дифференцировать различные структуры АСБ был проведен анализ кальцификатов, окружающей их плотной оформленной соединительной ткани (капсул), капилляров неоинтимы и скоплений пенистых клеток, имеющих отличный

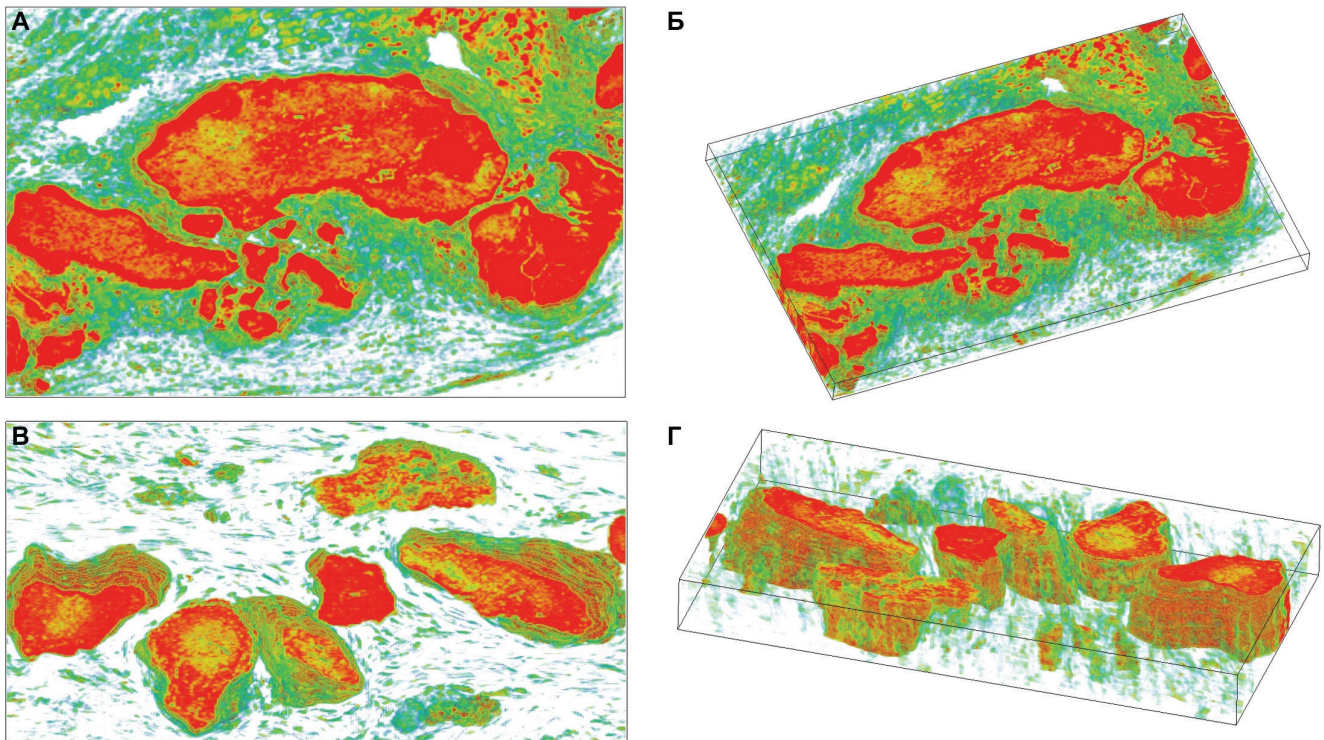


**Рис. 3.** Визуализация капилляров АСБ сонной артерии, дефектов внутренней эластической мембраны и дефектов базальной мембраны внутренней грудной артерии.

**Примечание:** локализация скоплений пенистых клеток обозначена желтыми точками, плотной оформленной соединительной ткани — синими точками, кальцификатов — зелеными точками, капилляров неоинтимы — красными точками. **А-Е:** Фибробласты обозначены красными стрелками, эндотелиальные клетки — розовыми стрелками, сосудистые гладкомышечные клетки (гладкие миоциты) — оранжевыми стрелками, макрофаги — белыми стрелками. **Ж-М:** Дефекты эластической мембраны обозначены красными стрелками, дефекты базальной мембраны — желтыми стрелками. **А.** Крупный капилляр, частично окруженный кальцификатом и пенистыми клетками. **Б.** Мелкий капилляр, полуокруженный скоплениями пенистых клеток. **В.** Капилляры различной геометрии (округлый и продолговатый) недалеко от кальцификата. **Г.** Капилляр продолговатой формы с большим количеством пенистых клеток в окружении. **Д.** Округлый капилляр, полуокруженный пенистыми клетками. **Е.** Многочисленные капилляры с большим количеством эритроцитов и скоплениями пенистых клеток неподалеку. **Ж, З.** Внутренняя грудная артерия с большим количеством дефектов внутренней эластической мембраны (красные стрелки) на относительно высоком увеличении. **И.** Внутренняя грудная артерия с небольшим количеством дефектов внутренней эластической мембраны (красные стрелки) и большим количеством дефектов базальной мембраны (желтые стрелки). **К.** Внутренняя грудная артерия с большим количеством дефектов внутренней эластической мембраны (красные стрелки) и небольшим количеством дефектов базальной мембраны (желтые стрелки). **Л, М.** Внутренняя грудная артерия с относительно небольшим количеством и площадью дефектов внутренней эластической мембраны (красные стрелки) на малом увеличении. Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

от остальной ткани АСБ визуализационный профиль при внутрисосудистом ультразвуковом исследовании и оптико-когерентной томографии. Анализ электронно-микроскопических изображений позволил провести визуальную оценку кальцификатов (имеющих наиболее высокую электронную плотность), очертить их соединительнотканную капсулу (ассоциированную с имеющими характерное продолговатое ядро фибробластами и окружающую непосредственно сами кальцификаты или прилежащие к ним скопления пенистых клеток), идентифицировать капилляры (в т.ч. по продолговатым или округленным ядрам эндотелиальных клеток) и оценить выраженность и распределение липидного поражения по имеющим среднюю электронную плотность скоплениям пенистых клеток (рис. 1). Даже на малых увеличениях (к примеру, 100 крат) электронно-микроскопическая визуализация позволяла диффе-

ренцировать малоразмерные очаги кальцификации и капилляры от окружающей ткани, а также провести анализ стабильности самих кальцификатов по плотности и толщине их соединительнотканной капсулы, состоящей из плотной оформленной соединительной ткани (рис. 1). Равномерность и стабильное качество визуализации позволяли стабильно очерчивать контуры и оценивать геометрию всех вышеуказанных структур (рис. 1), что даёт возможность выставления опорных точек для составления их визуализационных профилей (в т.ч. включающих в себя профили распределения электронной плотности) с целью последующей мануальной аннотации для обучения инструментов искусственного интеллекта, в т.ч. нейронных сетей. Как видно из рисунка 1, дифференцирующая способность метода даже на малых увеличениях визуально существенно превышает таковую у оптико-когерентной томографии.



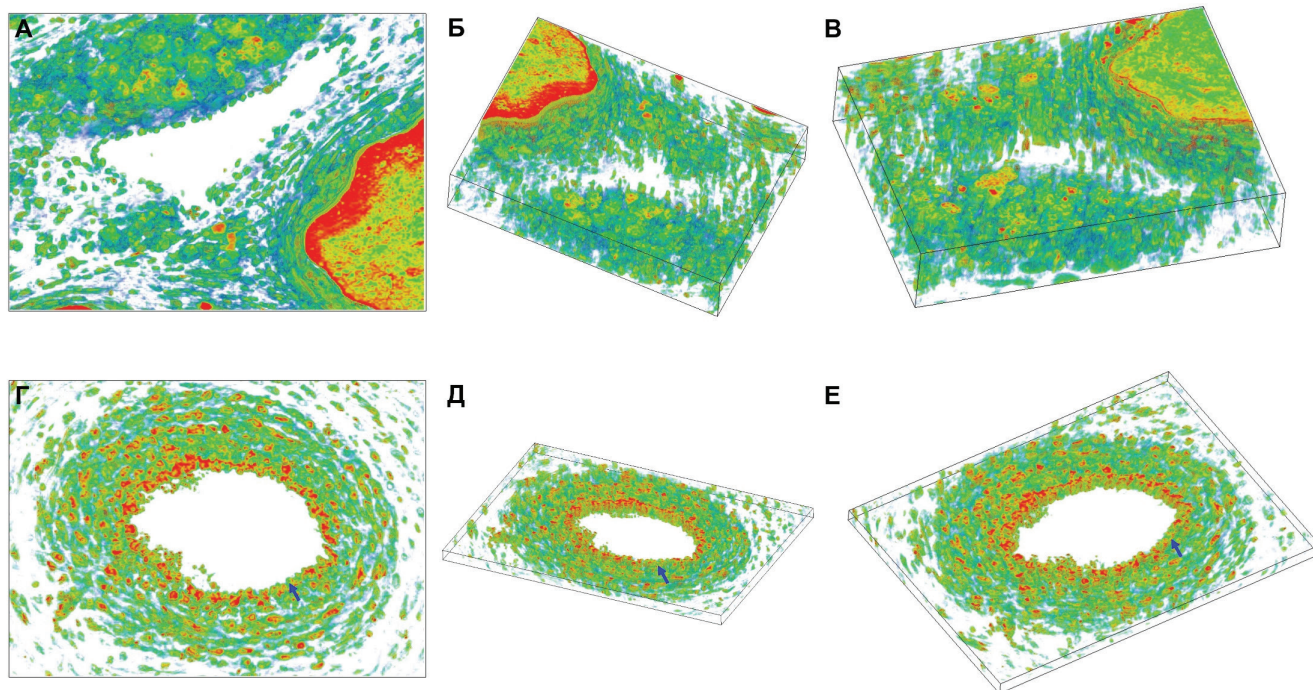
**Рис. 4.** Цветовое картирование очагов кальцификации и их микроокружения.

**Примечание:** А, Б. Трехмерная реконструкция рисунка 1Ж с цветовым картированием. В, Г. Трехмерная реконструкция рисунка 1К с цветовым картированием. Оттенки от синего до красного обозначают электронную плотность от низкой до высокой соответственно. Обратите внимание на изменение объемного контура кальцификата в зависимости от глубины. Различные тканевые структуры обладают различными профилями электронного контраста (сосуды микроциркуляторного русла — белые ровные пустоты на фоне остальной ткани, скопления пенистых клеток — многочисленные мелкие слегка размытые ярко-красные фрагменты, очаги кальцификации — крупные, средние или мелкие ровные монолитные фрагменты различных оттенков красного цвета, и соединительнотканые капсулы — сине-зеленые цветовые сигналы плотной соединительной ткани на фоне синей цветовой сигналы рыхлой соединительной ткани). Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

Поскольку АСБ характеризуются существенной гетерогенностью распределения липидной нагрузки, далее был проведен анализ различных сегментов АСБ, отличающихся выраженностью липидного поражения (которое оценивалось по относительному содержанию пенистых клеток в поле зрения). Даже на обзорном для электронной микроскопии увеличении (1000 крат) модифицированный метод EM-BSEM позволял с высокой точностью отличать скопления пенистых клеток от рыхлой соединительной ткани и от плотной оформленной соединительной ткани фиброзных капсул, окружающих кальцификаты, при этом электронная плотность скопления пенистых клеток выражено отличалась от таковой у кальцификатов (рис. 2). Сами скопления пенистых клеток были также четко дифференцируемы друг от друга (рис. 2), что при разработке соответствующих инструментов компьютерного зрения позволит выполнять количественный анализ площади липидного поражения с максимально высокой точностью. Далее была изучена способность метода отличать от нижележащих тканей фиброзную покрывку, толщина которой является одной из ос-

новных характеристик стабильности АСБ. По аналогии с остальными тканевыми структурами, даже на малом увеличении (от 50 до 500 раз) фиброзная покрывка имела электронную плотность, сопоставимую с таковой у окружающей кальцификаты соединительнотканной капсулы и заметно отличающуюся от кальцификатов и капилляров неоинтимы (рис. 2).

Еще одним преимуществом электронно-микроскопической визуализации по методу EM-BSEM является интактное состояние высокопроницаемых и не имеющих механической поддержки перицитов, оформленной соединительной ткани или эластической мембраны капилляров неоинтимы (в первую очередь, в силу отсутствия микротомии или криотомии в пробоподготовке биоматериала). Это позволило провести объективную оценку геометрии всех видов капилляров: крупных, мелких, вытянутых и округлых, при этом даже наиболее мелкие капилляры хорошо дифференцировались от объемных пенистых клеток с липидными каплями по наличию эндотелиальных клеток в своем просвете (рис. 3). Именно сохранность морфологии эндотелиальных



**Рис. 5.** Цветовое картирование капилляров неоинтимы.

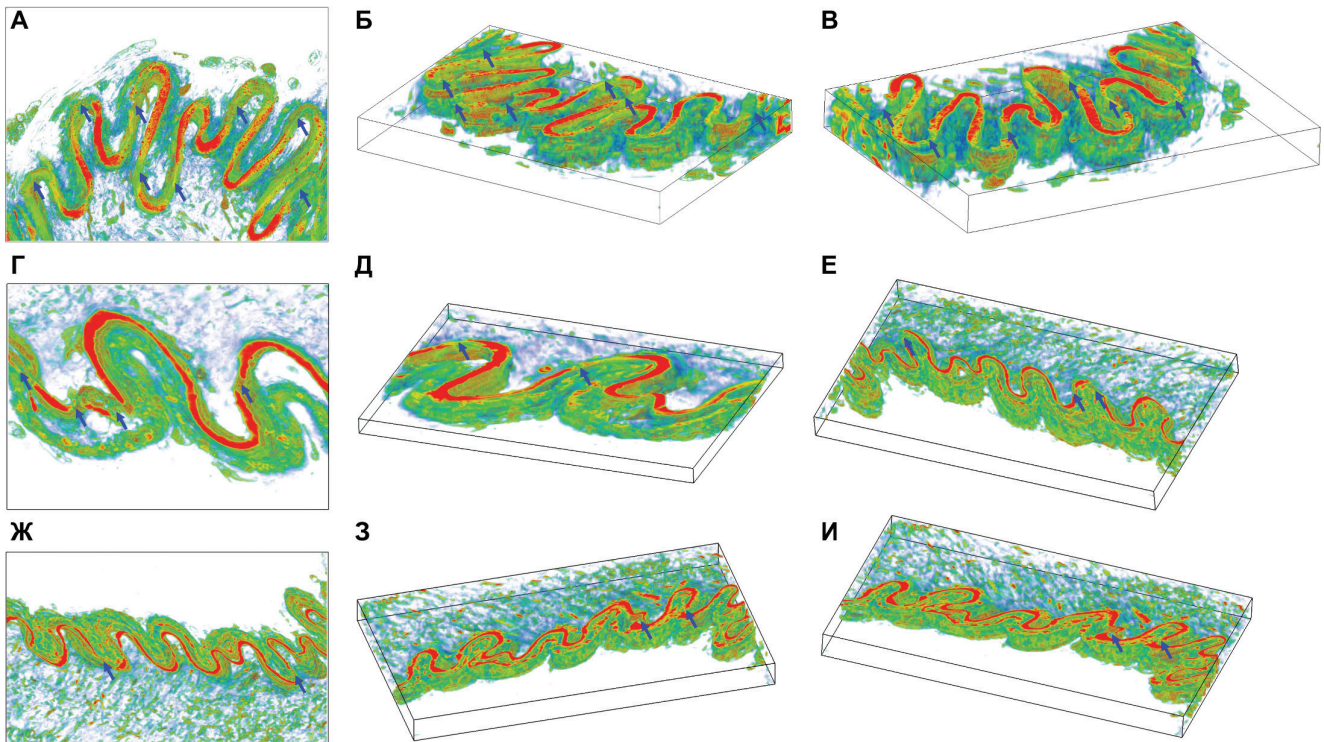
**Примечание:** оттенки от синего до красного обозначают электронную плотность от низкой до высокой соответственно. **А-В.** Трехмерная реконструкция рисунка **ЗА** с цветовым картированием. Капилляры неоинтимы (белые ровные пустоты) с расположенными рядом кальцификатами (красно-желтые сигнатуры высокой электронной плотности) и скоплениями пенистых клеток (сине-зелено-желто-красные клубящиеся тепловые сигнатуры) посреди синей рыхлой соединительной ткани. Обратите внимание на сине-зелено-желтые круглые или овальные тепловые сигнатуры ядер клеток (в т.ч. эндотелиальных клеток по внутреннему контуру капилляра). **Г-Е.** Цветовые сигнатуры артериолы. Оранжево-красным цветом выделены внутренняя эластическая мембрана и ядра клеток, сине-зеленым — более плотная соединительная ткань мышечной оболочки, зеленым — менее плотная соединительная ткань адвентиции. Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

клеток была отличительным признаком капилляров от остальных участков ткани с низкой электронной плотностью, позволяя отличить сосуды от внутритканевых разрывов, образующихся при извлечении АСБ при эндартерэктомии (рис. 3).

Сопоставимая с кальцификатами электронная плотность эластических волокон позволяла обнаруживать их мелкие дефекты, формирующиеся вследствие эластолиза, сопровождающие старение организма и являющиеся обязательной предпосылкой формирования АСБ (рис. 3). Поскольку извлеченные в процессе эндартерэктомии АСБ характеризуются уже выраженными изменениями прилегающих к ним эластических волокон мышечной оболочки, в данной работе для визуализации дефектов внутренней эластической мембраны были использованы сегменты внутренней грудной артерии, полученные в ходе выполнения коронарного шунтирования у пациентов с ишемической болезнью сердца. На электронно-микроскопических изображениях, полученных с использованием метода EM-BSEM, отчетливо визуализировалась фрагментация электронноплотной внутренней эластической мембраны и базальной мембраны, являющаяся результатом возрастзависимого эластолиза.

Помимо анализа тканевых структур (кальцификатов, капилляров неоинтимы и эластических волокон) и их характеристик (микроокружения кальцификатов, текучести капилляров и возникших вследствие эластолиза дефектов), электронно-микроскопическая визуализация также позволила надежно различать основные клеточные популяции (пенистые клетки — по скоплениям липидов, фибробласты — по продолговатым ядрам и плотной оформленной соединительной ткани вокруг, гладкие миоциты и канонические макрофаги — по характерному размеру и форме ядра, эндотелиальные клетки — по форме ядра и типичному расположению в просвете артерии либо сосудов микроциркуляторного русла, рисунки 1-3). Наиболее сложной задачей было дифференцировать макрофаги от сосудистых гладкомышечных клеток.

Далее в работе была поставлена задача по трехмерной реконструкции изучаемых объектов и оценке возможности их цветового картирования по электронной плотности. Наиболее простыми с этой точки зрения были обладающие наиболее высокой электронной плотностью кальцификаты, объем и геометрия которых существенно варьировали в зависимости от шлифа (рис. 4). Существенными от-



**Рис. 6.** Цветовое картирование внутренней эластической мембраны внутренней грудной артерии.

**Примечание:** оттенки от синего до красного обозначают электронную плотность от низкой до высокой соответственно. Синими стрелками обозначены дефекты внутренней эластической мембраны. **А.** Двухмерное цветовое картирование рисунка **ЗЖ** (с большим количеством дефектов внутренней эластической мембраны). **Б, В.** Трехмерная реконструкция рисунка **ЗЖ** с цветовым картированием. Красно-оранжево-желтые электронноплотные эластические волокна прерываются дефектами, имеющими низкую электронную плотность (синие и зеленые оттенки). **Г.** Двухмерное цветовое картирование рисунка **ЗИ** (со средним количеством дефектов внутренней эластической мембраны). **Д, Е.** Трехмерная реконструкция рисунка **ЗИ** с цветовым картированием. Красно-оранжево-желтые электронноплотные эластические волокна прерываются дефектами, имеющими низкую электронную плотность (синие и зеленые оттенки). **Ж.** Двухмерное цветовое картирование рисунка **ЗЛ** (с относительно небольшим количеством и площадью дефектов внутренней эластической мембраны). **З, И.** Трехмерная реконструкция рисунка **ЗЛ** с цветовым картированием. Красно-оранжево-желтые электронноплотные эластические волокна прерываются дефектами, имеющими низкую электронную плотность (синие и зеленые оттенки). Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

личиями и характерными профилями (сигнатурами) электронной плотности обладали скопления пенистых клеток, которые также были хорошо отличимы от кальцификатов, капилляров неоинтимы и составляющей АСБ рыхлой соединительной ткани (рис. 4).

Анализ сосудов микроциркуляторного русла показал, что цветовое картирование обладает высоким потенциалом в определении плотности соединительной ткани по периметру капилляров, в сочетании с целостностью его эндотелиального барьера, напрямую влияющей на геморрагическое пропитывание АСБ. При этом способность к контрастированию ядер клеток позволила оценить структурное состояние эндотелиального монослоя (рис. 5). На рисунке 5 А-В показаны зоны различной плотности вокруг капилляра, микроокружение которого составляют скопление пенистых клеток, кальцификат и сочетание рыхлой и плотной соединительной ткани. На рисунке 5 Г-Е показана артериола с сохранной внутренней эластической мембраной (за исключением небольшого сегмента) несколькими слоями сосудистых гладко-

мышечных клеток, плотной тканью мышечной оболочки и более рыхлой соединительной тканью адвентиции. Подобное различие профилей электронной плотности позволяет предположить перспективность разработки технологий "компьютерного зрения" для автоматизированного аннотирования тканевого компонента (соединительной ткани и внутренней эластической мембраны при ее наличии) и различных клеточных популяций в сосудах микроциркуляторного русла.

Вероятно, наибольшую диагностическую ценность цветовое картирование имело при анализе внутренней эластической мембраны, где оно позволяло с высокой чувствительностью и специфичностью визуализировать ее возникающие вследствие возраст-зависимого эластолиза дефекты (рис. 6). Трехмерная реконструкция анализируемой ткани также обладала в данном случае наиболее высокой диагностической ценностью, предоставляя возможность проводить анализ целостности внутренней эластической мембраны на глубине и устраняя таким образом ложно-

положительные результаты, связанные с дефектами шлифовки (рис. 6). Сочетание цветового картирования и трехмерной реконструкции позволяло выявлять как множественные, так и одиночные дефекты внутренней эластической мембраны (рис. 6).

### Обсуждение

Электронно-микроскопическая диагностика состояния извлеченных АСБ подразумевает одновременный анализ их липидного поражения, толщины фиброзной покрышки и состояния внеклеточного матрикса, патологической неоваскуляризации и кальцификации в сочетании с иммунофенотипированием клеточных популяций (макрофагов, сосудистых гладкомышечных клеток, фибробластов, эндотелиальных клеток) в составе АСБ методами двухмерной визуализации и трехмерной реконструкции. В данной работе показана применимость модифицированного метода EM-BSEM для всех вышеуказанных задач, а также для анализа возраст-зависимой деградации артериальных эластических волокон.

Основной проблемой патоморфологической диагностики АСБ и соответствующей методологии является ее клиническая релевантность, поскольку для задач интервенционной кардиологии и кардиохирургии достаточно прижизненной визуализации и "виртуальной гистологии" методами внутрисосудистого ультразвукового исследования или оптической когерентной томографии [1, 2]. Указанные два метода позволяют идентифицировать плотную соединительную ткань (фиброзную покрышку), очаги липидного поражения, капилляры и кальцификаты, при этом оптико-когерентная томография характеризуется более высоким разрешением ( $\approx 5\text{--}10$  мкм) [8] в сравнении с внутрисосудистым ультразвуковым исследованием ( $\approx 100$  мкм) [9]. В клинической практике данные методы применяются для оценки окклюзионно-стенотического поражения не только коронарного бассейна, но и других сосудистых бассейнов (в частности, экстракраниальных артерий и артерий нижних конечностей) [10, 11]. В то же время относительно высокая стоимость выполнения внутрисосудистого ультразвукового исследования ( $\approx 100$  тыс. рублей) и оптической когерентной томографии ( $\approx 140$  тыс. рублей) ограничивает их применение в рамках программы обязательного медицинского страхования коронарным бассейном, а также их распространенность в протоколах клинических испытаний антиатеросклеротических лекарственных средств [12]. Кроме того, доклинические испытания подобных препаратов в обязательном порядке включают оценку их профилактического или терапевтического влияния на атеросклероз аорты ApoE<sup>-/-</sup> или LDLR<sup>-/-</sup> мышей, с рождения лишенных экспрессии аполипопротеина E (одного из ключевых компонентов липопротеинов высокой плотности) или рецепто-

ра к липопротеинам низкой плотности и вследствие этого склонных к развитию атеросклероза. Несмотря на практическую возможность использования внутрисосудистого ультразвукового исследования и оптической когерентной томографии для оценки атеросклероза аорты мышей [13], данные методики не особенно широко применяются в патофизиологических исследованиях и доклинических испытаниях вследствие указанной выше высокой стоимости.

Именно эти ниши (оценку гемодинамически и клинически значимых АСБ периферических сосудистых бассейнов и анализ аортального атеросклероза генетически модифицированных мышей в доклинических испытаниях и патофизиологических исследованиях) и может занять электронная микроскопия по методу EM-BSEM для составления диагностических заключений по ряду классификационных рубрик АСБ (выраженность липидного поражения, толщина и состояние фиброзной покрышки, выраженность патологической неоваскуляризации, наличие, характер и выраженность кальцификации). Кроме того, электронную микроскопию по методу EM-BSEM целесообразно применять при сопоставлении точности неинвазивных методов артериального ремоделирования (оценка скорости распространения пульсовой волны в различных артериях, расчет изменения диаметра просвета артерии в зависимости от артериального давления и анализ формы пульсовой волны) [14] и фактического состояния эластических волокон в артериальной стенке (на примере сегмента относительно интактной внутренней грудной артерии) у пациентов с ишемической болезнью сердца, подвергающихся коронарному шунтированию. В отношении других категорий пациентов можно предположить полезность патоморфологического анализа АСБ у пациентов с семейной гиперхолестеринемией, подвергшихся хирургическому вмешательству, поскольку, по литературным данным, их микроморфология отличается от АСБ других пациентов [15]. Наконец, перспективным направлением приложения электронно-микроскопической диагностики может стать автоматизированное типирование клеточных популяций при помощи нейросетевых алгоритмов, основанных на цветовом картировании различных типов клеток вследствие уникальных профилей распределения их электронного контраста. Таким образом, в сравнении с внутрисосудистым ультразвуковым исследованием и оптической когерентной томографией электронно-микроскопическая диагностика обладает существенно более высокими визуализационными характеристиками и более высоким разрешением, что позволяет в дополнение к идентификации самих тканевых структур (фиброзной покрышки, скопления пенных клеток, капилляров неоинтимы, кальцификатов и эластических волокон) оценить их патофизиологически значимые характеристики (текучесть

капилляров, степень инкапсуляции кальцификатов и состояние эластических волокон), а также одновременно выполнять объективное и автоматизированное фенотипирование всех клеточных популяций в составе АСБ (в т.ч., при необходимости — в трехмерном формате). Дальнейшие исследования в этом направлении будут посвящены разработке инструментов искусственного интеллекта на основе нейронных сетей, способных проводить одновременное и автоматическое определение фиброзной покрышки (с расчетом ее толщины по всему ее периметру), капилляров и кальцификатов неинтимы, эластических волокон мышечной оболочки (меди), пенистых клеток, макрофагов, сосудистых гладкомышечных клеток, фибробластов, эндотелиальных клеток и окружающего их внеклеточного матрикса на основании уникальных профилей распределения электронного контраста.

### Заключение

Модифицированный метод EM-BSEM позволяет осуществлять универсальную электронно-микроскопическую диагностику атеросклеротического и эластолитического поражения крупных артерий с высокой информативностью о патологических процессах сосу-

дистого ремоделирования и высокой точностью определения соответствующих им классификационных рубрик. Уникальные для каждой клеточной популяции и тканевой структуры сигнатуры (профили) распределения электронного контраста обозначают возможность их автоматизированной идентификации при помощи специализированных нейросетевых алгоритмов.

**Отношения и деятельность.** Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2024-0001 "Разработка новых фармакологических подходов к экспериментальной терапии атеросклероза, технологий серийного производства реактивов и расходных материалов для изучения физиологии и патофизиологии сердечно-сосудистой системы и программного обеспечения на основе искусственного интеллекта для автоматизированной диагностики патологий системы кровообращения и автоматизированного расчета сердечно-сосудистого риска" при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках национального проекта "Наука и университеты".

### Литература/References

1. Mézquita AJV, Biavati F, Falk V, et al. Clinical quantitative coronary artery stenosis and coronary atherosclerosis imaging: a Consensus Statement from the Quantitative Cardiovascular Imaging Study Group. *Nat Rev Cardiol*. 2023;20(10):696-714. doi:10.1038/s41569-023-00880-4.
2. Kuno T, Kiyohara Y, Maehara A, et al. Comparison of Intravascular Imaging, Functional, or Angiographically Guided Coronary Intervention. *J Am Coll Cardiol*. 2023;82(23):2167-76. doi:10.1016/j.jacc.2023.09.823.
3. 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 обратнорассеянных электронах. *Атеросклероз*. 2020;16(2):5-15. doi:10.15372/ATER20200201.
4. Bogdanov LA, Velikanova EA, Kanonykia AYU, et al. Vascular smooth muscle cell contractile proteins as universal markers of vessels of microcirculatory bed. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2022;11(3):162-76. (In Russ.) Богданов Л.А., Великанова Е.А., Каноникина А.Ю. и др. Сократительные белки сосудистых гладкомышечных клеток — универсальные маркеры сосудов микроциркуляторного русла. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2022;11(3):162-76. doi:10.17802/2306-1278-2022-11-3-162-176.
5. 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.
6. Mukhamadiyarov RA, Frolov AV, Kutikhin AG. Age-dependent remodeling of the internal thoracic artery extracellular matrix in patients with a combination of two or more cardiovascular risk factors. *Clinical and Experimental Surgery*. *Petrovsky Journal*. 2022;10(2):33-45. Мухамадияров Р.А., Фролов А.В., Кутихин А.Г. Возрастное ремоделирование внеклеточного матрикса внутренней грудной артерии у пациентов с сочетанием двух и более факторов сердечно-сосудистого риска. *Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского*. 2022;10(2):33-45. doi:10.33029/2308-1198-2022-10-2-33-45.
7. Mukhamadiyarov RA, Bogdanov LA, Glushkova TV, et al. EMbedding and Backscattered Scanning Electron Microscopy: A Detailed Protocol for the Whole-Specimen, High-Resolution Analysis of Cardiovascular Tissues. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:739549. doi:10.3389/fcvm.2021.739549.
8. Bernstein L, Ramier A, Wu J, et al. Ultrahigh resolution spectral-domain optical coherence tomography using the 1000-1600 nm spectral band. *Biomed Opt Express*. 2022;13(4):1939-47. doi:10.1364/BOE.443654.
9. Ono M, Kawashima H, Hara H, et al. Advances in IVUS/OCT and Future Clinical Perspective of Novel Hybrid Catheter System in Coronary Imaging. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:119. doi:10.3389/fcvm.2020.00119.
10. Tung ET, Yim KHC, Li CL, et al. Optical coherence tomography in peripheral arterial disease: A systematic review. *Int J Clin Pract*. 2021;75(10):e14628. doi:10.1111/ijcp.14628.
11. Cortese B, Sanchez-Jimenez E. Intravascular Imaging for Peripheral Artery Interventions: Ready for Prime Time? *JACC Cardiovasc Interv*. 2022;15(5):547-9. doi:10.1016/j.jcin.2022.01.304.
12. Kochergin NA, Kochergina AM. Potential of optical coherence tomography and intravascular ultrasound in the detection of vulnerable plaques in coronary arteries. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2022;21(1):2909. Кочергин Н.А., Кочергина А.М. Возможности оптической когерентной томографии и внутрисосудистого ультразвука в выявлении нестабильных бляшек в коронарных артериях. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2022;21(1):2909. doi:10.15829/1728-8800-2022-2909.
13. Tahara S, Morooka T, Wang Z, et al. Intravascular optical coherence tomography detection of atherosclerosis and inflammation in murine aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(5):1150-7. doi:10.1161/ATVBAHA.111.243626.
14. Regnault V, Lacolley P, Laurent S. Arterial Stiffness: From Basic Primers to Integrative Physiology. *Annu Rev Physiol*. 2024;86:99-121. doi:10.1146/annurev-physiol-042022-031925.
15. Pang J, Abraham A, Vargas-Garcia C, et al. An age-matched computed tomography angiographic study of coronary atherosclerotic plaques in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2020;298:52-7. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2020.03.001.