

Иммуногистохимические и ультраструктурные признаки нарушения атромбогенных свойств эндотелия при атеросклерозе каротидного синуса

А.Н. Евдокименко, Т.С. Гулевская, М.М. Танашия

ФГБНУ «Научный центр неврологии» (Москва)

Введение. Эндотелиальной дисфункции в настоящее время отводится ключевая роль в патогенезе атеросклероза. Тем не менее исследования, демонстрирующие зависимость между изменением показателей активности атеросклеротического процесса и основных функциональных свойств эндотелия, единичны, а полученные данные часто противоречивы, что и послужило целью настоящего исследования.

Материалы и методы. Проведены гистологическое, иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследования 13 атеросклеротических бляшек, удаленных при операции каротидной эндартерэктомии. Интенсивность экспрессии фактора фон Виллебранда, ТМ и эндотелиальной NO-синтазы оценивали полуквантитативным методом и сопоставляли с основными показателями активности течения атеросклероза в бляшке (объем атероматоза, скопления липофагов, инфильтрация покрышки моноцитами и макрофагами). Проводилось также сравнение осложненных и неосложненных бляшек.

Результаты. Содержание фактора фон Виллебранда в эндотелии каротидного синуса увеличивалось по мере накопления в нем липидов и инфильтрации покрышки моноцитами и макрофагами ($p < 0,017$) в отличие от ТМ и эндотелиальной NO-синтазы, экспрессия которых не отражала активности атеросклеротического процесса и не коррелировала с содержанием фактора фон Виллебранда. При этом показатели экспрессии ТМ и эндотелиальной NO-синтазы коррелировали между собой ($p = 0,004$). Не обнаружено различий интенсивности окраски на все три маркера между осложненными и неосложненными бляшками. Ультраструктурный анализ эндотелия продемонстрировал резко выраженные нарушения атромбогенности сосудистой стенки вследствие многочисленных дефектов эндотелиального пласта, адгезии клеток крови к поверхности артерии с формированием микротромбов и активации эндотелиоцитов наряду с их дистрофическими изменениями, некрозом и слушиванием в просвет сосуда.

Заключение. Установлена высокая диагностическая значимость фактора фон Виллебранда в оценке активности атеросклеротического процесса в каротидном синусе и риска развития осложнений. ТМ и эндотелиальная NO-синтаза не рекомендуются в качестве биомаркеров прогрессирования атеросклероза данной локализации, поскольку не отражают выраженность воспалительной реакции и деструктивных процессов в бляшке.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, атеросклероз каротидного синуса, фактор фон Виллебранда, тромбомодулин, эндотелиальная NO-синтаза, морфологическое исследование.

Введение

Эндотелий играет ключевую роль в поддержании эффективного первичного и вторичного гемостаза, оказывая комплексное воздействие на сосудистую стенку, форменные элементы крови и системы свертывания и фибринолиза. В норме синергизм продуцентов эндотелия обеспечивает его атромбогенность, предотвращает адгезию и агрегацию тромбоцитов, блокирует образование тромбина и подавляет отложение фибрина на поверхности сосудистой стенки [1]. С этой целью эндотелиоциты синтезируют и экспрессируют на своей поверхности и/или секретируют в кровоток и субэндотелиальное пространство многочисленные биологически активные вещества, включающие тканевой активатор плазминогена и его ингибиторы, гепаран-сульфат, тромбомодулин (ТМ), рецептор к эндотелиальному белку С, экто-АДФазу, простаглицлин, оксид азота и др. [2].

Эндотелий находится в непосредственном контакте с кровью и быстро реагирует на изменившиеся условия

среды посредством многочисленных механо- и хеморецепторов, изменяя свой фенотип с атромбогенного и противовоспалительного на протромбогенный, прокоагулянтный и провоспалительный, активируя синтез и экспрессию соответствующих веществ (тканевой фактор, ингибитор активатора плазминогена 1, фактор фон Виллебранда (ФФВ) и активируемые протеазами рецепторы, молекулы адгезии) [2] и/или снижая синтез веществ, обладающих противоположно направленным действием. В физиологических условиях данный процесс носит локальный кратковременный характер и направлен на предотвращение потери крови, ограничение распространения процесса и восстановление целостности сосудистой стенки. В патологических условиях процесс затягивается, возникает структурная перестройка эндотелия, сопровождаемая дисбалансом многочисленных продуцируемых им веществ, которая получила название *эндотелиальной дисфункции* и в настоящее время признается ключевым звеном в патогенезе атеросклероза и связанных с ним осложнений.

Поскольку в основе дисфункции эндотелия лежит дисбаланс синтезируемых, экспрессируемых и секретируемых эндотелием веществ, неудивительно, что для оценки функции эндотелия широко применяется определение циркулирующих в крови молекул и частиц эндотелиального происхождения, а также эндотелиальных клеток. Поскольку атеросклероз является системным заболеванием, содержание растворимых маркеров эндотелиальной дисфункции в крови предоставляет сводную информацию о состоянии сосудистого русла в целом и не дает возможности оценить какие-либо его конкретные участки, что нередко требуется для решения вопроса о профилактике и тактике лечения (включая решение вопроса о проведении оперативного вмешательства при асимптомном стенозе артерий).

В решении данного вопроса может значительно помочь новое, активно развивающееся направление – молекулярная визуализация. Она позволяет неинвазивно определять такие показатели, как фагоцитоз, формирование пенных клеток, повышение метаболической активности клеток, апоптоз, окислительный стресс, ангиогенез, протеиназная активность, содержание активированного фактора фон Виллебранда и начальные этапы тромбообразования в бляшке с использованием МРТ, КТ и ультразвукового исследования с контрастированием [3]. В этой связи чрезвычайное значение приобретают морфологические исследования структурно-функциональных особенностей эндотелия при атеросклерозе. Немногочисленность таких исследований и порой противоречивость представленных в них результатов определило **цель настоящего исследования** – установить зависимость содержания в эндотелии веществ, оказывающих разнонаправленное действие на систему гемостаза, с его структурными изменениями и основными показателями активности атеросклеротического процесса.

Материалы и методы

Проведены гистологическое, иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследования 13 атеросклеротических бляшек внутренней сонной артерии (ВСА), полученных при операции каротидной эндартерэктомии. Степень атеростеноза ВСА до операции составляла от 50 до 90% по результатам дуплексного сканирования. После иссечения все биоптаты немедленно помещали в фиксирующий раствор (18–20°C) – 2,5% раствор глутарового альдегида на фосфатном буфере. Через 1 час фиксации каждый биоптат разрезали на 6–8 поперечных блоков шириной 2–4 мм. Для световой микроскопии брали 1–4 блока из различных частей биоптата, которые фиксировали в 10% растворе формалина в течение 1 суток, обезживали, заливали в парафин и изготавливали серийные срезы толщиной 3–4 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином и по методу ван Гизона для определения структуры атеросклеротической бляшки и активности атеросклеротического процесса. Активность течения атеросклероза определяли на основании количественной оценки объема атероматоза, а также полуколичественной оценки скопления липофагов в бляшке (по шкале от 0 до 5, где 0 – клетки отсутствуют, 1 – единичные липофаги, 2 – небольшие группы клеток, 3 – неравномерное распределение с образованием среднего размера клеточных групп, 4 – многочисленные крупные скопления липофагов, 5 – массивные скопления, занимающие более половины среза) и степени инфильтрации покрышки моноцитами и макрофагами на каждом срезе (по шкале от 0 до 3, где 0 – моноциты/макрофаги отсутствуют, 1 – незначительная инфильтрация, 2 – умеренно выражен-

ная инфильтрация, 3 – многочисленные крупные инфильтраты). В иммуногистохимическом исследовании применяли кроличьи поликлональные антитела к фФв (BioCare Medical, США) и эндотелиальной NO-синтазе (Lab Vision Corporation, США) и мышинные моноклональные антитела к ТМ (клон 141C01, Lab Vision Corporation, США). Для визуализации иммунопероксидазной реакции использовали систему UltraVision Quanto (Lab Vision Corporation, США), выявление пероксидазной активности проводили с помощью 3,3-диаминобензидина (DAB) на автостейнере 360 производства Thermo Fisher Scientific (США). Препараты докрашивали гематоксилином Майера. Оценка степени экспрессии антител осуществлялась полуколичественным методом по шкале от 0 до 3, где 0 – отрицательная реакция, 1 – слабая окраска менее трети клеток, 2 – средняя интенсивность окраски большинства клеток, 3 – субтотальная окраска высокой интенсивности.

Для ультраструктурного анализа брали 3–4 поперечных среза биоптата, соседних с биоптатами, взятыми для гистологического и иммуногистохимического исследований. Из данных поперечных срезов вырезали 2–5 прямоугольных блока с размерами сторон 0,2–0,4 см, которые дополнительно фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере в течение 2–3 часов, после чего промывали в фосфатном буфере 30 минут, обрабатывали 1%-м раствором OsO₄ на фосфатном буферном растворе (pH 7,35) 1–1,5 часа и подвергали обезживанию в спиртах возрастающей концентрации и пропиленоксиде. Заливку проводили в смесь эпоксидных смол (Epon 812, Epon DDSA и Epon MNA). Блоки выдерживали в течение 1–2 суток в термостате при температуре 37°C и одни сутки – при температуре 60°C. Полутонкие и ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме LKB III-8800 (Швеция). Полутонкие срезы толщиной до 1 мкм окрашивали метиленовым синим или толудиновым синим. С выбранного на полутонких срезах участка приготавливали ультратонкие срезы, которые окрашивали уранил-ацетатом и цитратом свинца и анализировали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония).

Для статистической обработки полученных результатов использовали непараметрический критерий Манна-Уитни и коэффициент корреляции Спирмена при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Гистологическое исследование удаленных во время операции каротидной эндартерэктомии атеросклеротических бляшек выявило, что в 5 случаях бляшки относились к осложненному атеросклеротическим изменениям вследствие наличия изъязвления поверхности в области атероматоза, кровоизлияния и/или тромба на поверхности бляшки; 6 бляшек являлись атероматозными, 1 бляшка – кальцинозной и 1 бляшка – фиброзной.

Проведена количественная и полуколичественная оценка показателей активности атеросклеротического процесса и функционального статуса эндотелия в 48 срезах бляшки. Объемная доля атероматоза на срезе колебалась от 0 до 77,3%; липофаги были единичными или формировали группы различного размера вплоть до массивных скоплений, занимающих подавляющую часть поля зрения; моноциты и макрофаги в покрышке отсутствовали или образовывали инфильтраты различного размера (табл. 1).

таблица 1: Показатели активности течения атеросклеротического процесса в сонной артерии.

Структурный компонент	Среднее значение \pm SD	Минимум	Максимум
Атероматоз (%)	21,5 \pm 23,6	0	77,3
Липофаги (баллы)	1,8 \pm 1,2	0	4
Инфильтрация покрышки моноцитами и макрофагами (баллы)	0,9 \pm 0,9	0	3

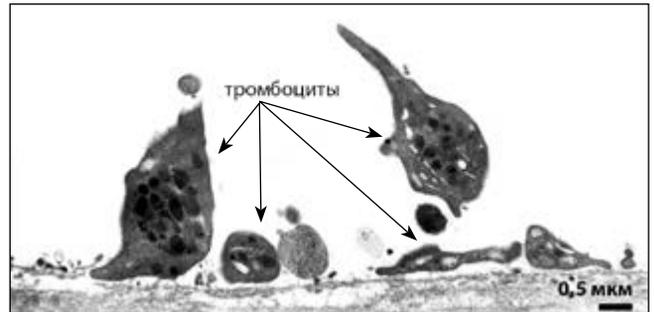
таблица 2. Выраженность экспрессии антител к фФв, ТМ и эндотелиальной NO-синтазе в эндотелии каротидного синуса.

Маркер	Среднее значение \pm SD	Минимум	Максимум
Фактор фон Виллебранда (баллы)	2,06 \pm 1,04	0	4
Тромбомодулин (баллы)	2,21 \pm 0,92	0	4
Эндотелиальная NO-синтаза (баллы)	1,51 \pm 0,9	0	3

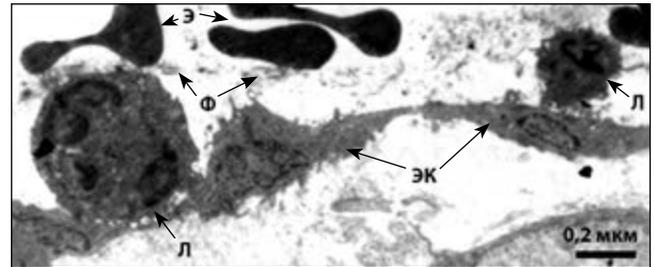
Экспрессия в эндотелии антител к фФв, ТМ и эндотелиальной NO-синтазе также варьировала в широких пределах — от отрицательной реакции до высокой интенсивности окраски в подавляющем большинстве эндотелиоцитов, покрывающих бляшку (табл. 2). Нами была установлена прямая зависимость между изменением интенсивности реакции на ТМ и на эндотелиальную NO-синтазу ($p=0,004$), а именно — повышение экспрессии ТМ с повышением экспрессии эндотелиальной NO-синтазы в эндотелии и наоборот. Между тем интенсивность окраски эндотелия на фактор фон Виллебранда и интенсивность окраски на вышеуказанные маркеры между собой не коррелировали ($p>0,13$).

При сопоставлении показателей активности атеросклеротического процесса с выраженностью экспрессии маркеров функционального статуса эндотелия на срезах бляшки получены следующие результаты. Обнаружена значимая прямая зависимость между количеством фФв в эндотелии и рядом морфологических показателей активности течения атеросклероза, а именно: объемом атероматоза в бляшке, количеством липофагов и степенью инфильтрации покрышки моноцитами и макрофагами ($p<0,017$). Степень экспрессии ТМ и эндотелиальной NO-синтазы в эндотелии, в свою очередь, с вышеуказанными структурными изменениями не коррелировала. Также не было выявлено различий интенсивности окраски всех трех вышеуказанных маркеров между осложненными и неосложненными бляшками.

Ультраструктурный анализ 50 фрагментов атеросклеротических бляшек продемонстрировал выраженные изменения эндотелия и субэндотелиального слоя в подавляющем большинстве случаев. В 96% полутонких срезов выявлены дефекты эндотелиального пласта различного размера (от



А



Б

рис. 1: Нарушение атромбогенности сосудистой стенки.

А — адгезия тромбоцитов к субэндотелиальному слою в области дефекта эндотелиального пласта; Б — адгезия лейкоцитов (Л) к эндотелию, нити фибрина (Ф) и эритроциты (Э) на поверхности эндотелия (ЭК — эндотелиальная клетка).

единичных эндотелиоцитов до 3,5 мм). В области дефектов в большинстве случаев обнаруживались фрагменты погибших эндотелиоцитов, эритроциты, тромбоциты (рис. 1А), наложения фибрина и/или микротромбы. Скопления эритроцитов, нити фибрина и микротромбы также нередко определялись и в области относительно сохранного эндотелиального пласта (рис. 1Б). Часто наблюдалась адгезия лейкоцитов к поверхности эндотелия (рис. 1Б) и процесс их трансмиграции в субэндотелиальное пространство.

При электронно-микроскопическом исследовании эндотелиоцитов обратила на себя внимание крайняя неоднородность эндотелиального пласта с точки зрения размера, формы, плотности цитоплазмы и ядра эндотелиоцитов. Преобладали «активированные» увеличенные в размере клетки неправильной формы с гипертрофией и гиперплазией элементов гранулярного эндоплазматического ретикулума (гЭПР) (рис. 2А) и аппарата Гольджи (АГ), увеличенным количеством и размером митохондрий и количеством полисом. В отдельных клетках также обнаруживались скопления телец Вейбеля–Паладе (рис. 2Б).

Помимо усиления обменных процессов в эндотелиоцитах часто выявлялись признаки дистрофии различной степени выраженности вплоть до необратимых изменений, приводящих к некрозу и слушиванию клеток в просвет артерии с формированием дефекта пласта в данной области. Дистрофические изменения включали резкое расширение цистерн АГ и гЭПР с уменьшением количества и неравномерным расположением рибосом на мембранах и участками деструкции мембран (рис. 2В, Г), уплотнение митохондриального матрикса и межмембранного пространства митохондрий, лизис крист и формирование теней митохондрий, слияние многочисленных везикул с образованием мультивезикулярных комплексов. Межэндотелиальные контакты

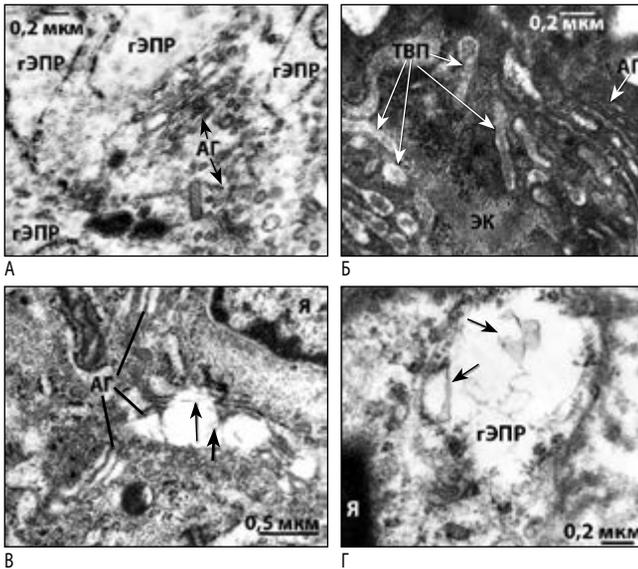


рис. 2: Ультраструктурные изменения эндотелия каротидного синуса при атеросклерозе. А – гиперплазия гранулярного эндоплазматического ретикулума (гЭПР) и аппарата Гольджи (АГ) с умеренным расширением цистерн; Б – скопление телец Вейбеля–Паладе (ТВП) и цистерн АГ вблизи люминальной поверхности эндотелиальной клетки (ЭК); В – расширенные цистерны АГ с деструкцией мембран (указано стрелкой); Г – резко расширенная цистерна гЭПР с нарушением целостности мембраны и немногочисленными прикрепленными рибосомами.

были главным образом упрощены, выглядели слабо извитыми или щелевидными, с тенденцией к расхождению контактных поверхностей и образованию щелей между клетками.

Обсуждение

В проведенном исследовании продемонстрированы значительные структурные и функциональные изменения эндотелия каротидного синуса, свидетельствующие о снижении его атромбогенных свойств. Они выражались в значимом повышении экспрессии фФв, адгезии тромбоцитов, эритроцитов и наложениях фибрина на поверхности эндотелиоцитов наряду с их деструктивными изменениями, нарушением целостности эндотелиального пласта и повышением проницаемости эндотелия, о чем свидетельствовало упрощение контактов и расхождение контактных поверхностей с формированием щелей между клетками. При нарушении целостности эндотелия или повышении его проницаемости в субэндотелиальный слой проникают многие компоненты крови, включая гемостатические факторы, обладающие хемотаксическими (привлечение моноцитов/макрофагов) и митогенными (стимуляция клеточной пролиферации) свойствами, что стимулирует воспалительную реакцию и дополнительно активизирует эндотелиальные клетки [4]. На формирование провоспалительного фенотипа указывала адгезия лейкоцитов к поверхности эндотелия с их миграцией в субэндотелиальное пространство. Кроме того, часто выявляемые дефекты эндотелиального пласта обуславливают обнажение субэндотелиального слоя, обладающего протромбогенными свойствами [5].

Начало свертывания крови, как известно, требует экспрессии фФв для адгезии и агрегации тромбоцитов, а также воздействия тканевого фактора для активации каскада свертывания [6]. фФв синтезируется в эндотелии и секретируется

в кровотоки и субэндотелиальное пространство, поэтому повышение его содержания в крови, являясь ранним маркером эндотелиальной дисфункции, может быть результатом не только повреждения эндотелиоцитов, но и в первую очередь их активации [7].

Нами продемонстрирована высокая корреляция между экспрессией фФв и выраженностью деструктивных процессов и воспалительных реакций в атеросклеротической бляшке, что может подтверждать высокую значимость данного маркера в отражении активности течения атеросклероза каротидного синуса. Сходные результаты были получены в ряде исследований на животных, в которых отмечена прямая связь между повышением экспрессии фФв в эндотелии аорты и степенью тяжести атеросклероза и воспалительной клеточной инфильтрации в бляшке [8, 9]. В ранее проведенном электронно-микроскопическом исследовании эндотелия аорты крыс с применением антител к фФв было продемонстрировано резкое повышение синтеза фФв в различных моделях повреждения, при этом фФв преимущественно располагался в цистернах гЭПР и АГ [10]. Авторы не наблюдали телец Вейбеля–Паладе и высказали предположение о преимущественно конститутивной секреции фФв в кровотоки и субэндотелиальное пространство при активации эндотелиоцитов, минуя «хранилище» в виде телец Вейбеля–Паладе, служащих для регулируемой секреции в физиологических условиях. Это предположение косвенно подтверждается и в нашем исследовании, поскольку тельца Вейбеля–Паладе были в основном единичными или отсутствовали, их скопления наблюдались лишь в отдельных эндотелиоцитах, а повышенное содержание фФв сочеталось с гиперплазией и гипертрофией гЭПР в эндотелиоцитах.

На основании полученных результатов можно предполагать повышение уровня фФв в крови по мере прогрессирования атеросклероза каротидного синуса вследствие как активации, так и повреждения и деструкции эндотелиоцитов. Данное предположение подтверждается результатами многочисленных клинических исследований, в которых продемонстрированы повышение содержания фФв в крови при атеросклерозе, его факторах риска и осложнениях, а также ассоциация повышения уровня фФв с риском неблагоприятного исхода при сердечно-сосудистых заболеваниях [6, 11, 12]. Тем не менее не вполне понятно прогностическое значение данного маркера у асимптомных или относительно здоровых лиц при отсутствии выраженной сердечно-сосудистой патологии, в особенности с учетом того, что синтез и секреция фФв имеет циркадный ритм и в норме повышается с возрастом, после нагрузки и при остром ответе на большое количество биологических стимулов [13]. В этой связи особое значение приобретает метод молекулярной визуализации, способные ультразвуковым методом с контрастным усилением локально оценить уровень активированного фФв на эндотелии, что является признаком формирования его протромботического и провоспалительного фенотипа и высокого риска развития тромбоза [9].

Вторым оцененным маркером атромбогенных свойств эндотелия был ТМ, который синтезируется, но не секретруется эндотелием и является интегральным мембранным гликопротеином, связанным с его поверхностью. Концентрация ТМ в крови напрямую зависит от целостности эндотелия и служит признанным маркером его повреждения при различных патологических условиях [14–16]. ТМ является определяющим фактором тромборезистентности

эндотелия, поскольку, связывая фибрин, он активирует систему протеина С, оказывая антикоагулянтное, фибринолитическое и противовоспалительное действие.

Интенсивность экспрессии ТМ, в отличие от фФв, не была связана с инфильтрацией бляшки моноцитами и макрофагами, а также объемной долей атероматоза в нашем исследовании. Активация атеросклеротического процесса предполагает ответ острой фазы, включающий накопление и активацию моноцитов/макрофагов и высвобождение цитокинов, таких как ИЛ-1, ИЛ-6 и фактора некроза опухолей. В исследованиях на культуре эндотелиальных клеток продемонстрировано отсутствие изменений содержания ТМ или подавление его синтеза в эндотелии под действием вышеуказанных медиаторов воспаления, что свидетельствует, по-видимому, об отсутствии прямой связи между экспрессией ТМ и воспалительной реакцией. В исследовании экспрессии ТМ в атеросклеротических бляшках коронарных артерий было обнаружено значимое ее снижение [17], что не подтвердилось в проведенном нами исследовании при каротидном атеросклерозе, поскольку наблюдалась значительная вариабельность интенсивности окраски.

Несмотря на отсутствие зависимости экспрессии ТМ от активности атеросклероза можно ожидать повышения его уровня в крови по мере нарастания деструктивных процессов, объема атероматоза и выраженности воспалительной реакции в бляшке вследствие усугубления дистрофических изменений эндотелиоцитов, активации некроза или слушивания эндотелиоцитов с поверхности сосуда, что было продемонстрировано нами ранее [18]. Тем не менее значение концентрации, по нашему мнению, будет сложно интерпретировать, поскольку содержание ТМ в эндотелиоцитах не коррелировало с активностью процесса. Данное предположение согласуется с противоречивыми литературными данными в отношении концентрации ТМ в крови, ничтожно малого у здоровых людей. В одних исследованиях отмечено его повышение при многих сосудистых заболеваниях, включая атеросклероз [19, 20], в других – его снижение при сахарном диабете 2-го типа и ишемической болезни сердца [21–23], в третьих – отсутствие изменений уровня ТМ при ишемической болезни сердца [24] и атеросклерозе сонной артерии [25]. Эти расхождения демонстрируют необходимость понимания точной функциональной значимости и регуляции синтеза ТМ, по-видимому, являющихся более сложными, чем в случае фФв.

Еще одним изученным маркером атромбогенных свойств эндотелия являлась эндотелиальная NO-синтаза, катализирующая образование оксида азота, который, как известно, играет важную роль в регуляции сосудистого тонуса, подавлении агрегации тромбоцитов и пролиферации гладкомышечных клеток, т.е. обладает антиагрегантными, противовоспалительными, антигипертензивными и антиатерогенными свойствами [26]. Экспрессия эндотелиальной NO-синтазы, по нашим данным, не коррелировала с

признаками воспаления и активности деструктивных процессов в бляшке, однако коррелировала с экспрессией ТМ. Во многих клинических исследованиях продемонстрировано снижение биодоступности NO при атеросклерозе, в том числе при асимптомном течении [27], и при наличии всех известных сердечно-сосудистых факторов риска, что может наводить на мысль о снижении экспрессии NO-синтазы в эндотелии при данных состояниях. При этом в ряде исследований отмечено увеличение ее экспрессии, что, по мнению авторов, носило компенсаторный характер [28]. Сохранение сниженной биодоступности в такой ситуации можно отнести на счет описываемого рядом авторов подавления активности NO-синтазы или разделения субъединиц фермента под действием липопротеинов низкой плотности и ангиотензина II с результирующей продукцией супероксида одной из субъединиц и усилением окислительного стресса [29]. Иными словами, повышение экспрессии NO-синтазы может усугублять течение атеросклероза. Впервые отмеченная в настоящем исследовании корреляция экспрессии эндотелиальной NO-синтазы и ТМ может свидетельствовать о сходных механизмах их регуляции при атеросклерозе, что требует дополнительного изучения.

Отсутствие значимых различий между осложненными и неосложненными бляшками по экспрессии всех трех проанализированных маркеров функции эндотелия может быть связано с тем, что все неосложненные бляшки имели нестабильную структуру, а значит, очень высокий риск развития осложнений. Кроме того, для решения вопроса о надежности того или иного маркера в оценке риска развития осложнений необходимо подтвердить результаты на большем количестве наблюдений, включающих стабильные, нестабильные и осложненные атеросклеротические бляшки.

Заключение

Продemonстрировано выраженное нарушение атромбогенных свойств эндотелия сонной артерии при каротидном атеросклерозе, сопровождающееся дисбалансом продуцируемых им веществ, обладающих разнонаправленным действием на систему гемостаза. Отмечено преобладание в эндотелии прокоагулянтной активности вследствие значимого повышения экспрессии фФв. Повышение содержания фФв не сопровождалось снижением продукции ТМ и NO-синтазы, обладающих атромбогенными свойствами. Напротив, наблюдалась значительная вариабельность содержания ТМ и NO-синтазы; поэтому содержание этих веществ не отражает выраженности воспалительной реакции и деструктивных процессов в бляшке и не рекомендуется в качестве биомаркера прогрессирования каротидного атеросклероза. Установлена высокая диагностическая значимость экспрессии фФв для определения локальной степени активности атеросклеротического процесса в каротидном синусе и риска развития осложнений.

References

1. Becker B.F., Heindl B., Kupatt C., Zahler S. Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol.* 2000; 89(3): 160–167. PMID: 10798271
2. Aird W.C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2007; 100(2): 158–173. DOI: 10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a. PMID: 17272818.
3. Scherer D.J., Psaltis P.J. Future imaging of atherosclerosis: molecular imaging of coronary atherosclerosis with (18)F positron emission tomography. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2016; 6(4): 354–367. DOI: 10.21037/cdt.2015.12.02. PMID: 27500093.
4. Falk E., Fernández-Ortiz A. Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications. *Am J Cardiol.* 1995; 75(6): 3B–11B. PMID: 7863969.
5. Broos K., Feys H.B., De Meyer S.F. et al. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* 2011; 25(4): 155–167. PMID: 21496978. DOI: 10.1016/j.blre.2011.03.002.
6. van Mourik J.A., Boertjes R., Huisveld I.A. et al. von Willebrand factor propeptide in vascular disorders: A tool to distinguish between acute and chronic endothelial cell perturbation. *Blood* 1999; 94(1): 179–185. PMID: 10381511.
7. Blann A.D., McCollum C.N. von Willebrand factor, endothelial cell damage and atherosclerosis. *Eur J Vasc Surg.* 1994; 8(1): 10–15. PMID: 8307205.
8. Theilmeyer G., Michiels C., Spaepen E. et al. Endothelial von willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis-prone sites in response to hypercholesterolemia. *Blood* 2002; 99 (12): 4486–4493. PMID: 12036879.
9. McCarty O.J., Conley R.B., Shentu W. et al. Molecular imaging of activated von willebrand factor to detect high-risk atherosclerotic phenotype. *JACC Cardiovasc Imaging* 2010; 3 (9): 947–955. PMID: 20846630. DOI: 10.1016/j.jcmg.2010.06.013.
10. Reidy M.A., Chopek M., Chao S. et al. Injury induces increase of von Willebrand factor in rat endothelial cells. *Am J Pathol.* 1989; 134(4): 857–864. PMID: 2650559.
11. Suslina Z.A., Tanashyan M.M., Domashenko M.A. et al. [Endothelial dysfunction in patients with ischemic stroke]. *Annaly klinicheskoy i eksperimental'noy nevrologii.* 2008; 2(1): 4–11.
12. Whincup P.H., Danesh J., Walker M. et al. Von Willebrand factor and coronary heart disease. Prospective study and meta-analysis. *Eur Heart J.* 2002; 23(22): 1764–1770. PMID: 12419296.
13. Nightingale T., Cutler D. The secretion of von Willebrand factor from endothelial cells; an increasingly complicated story. *J Thromb Haemost.* 2013; 11 Suppl 1: 192–201. DOI: 10.1111/jth.12225. PMID: 23809123.
14. Takano S., Kimura S., Ohdama S., Aoki N. Plasma thrombomodulin in health and diseases. *Blood* 1990; 76(10): 2024–2029. PMID: 2173634.
15. Boffa M.C., Karochkine M., Bérard M. Plasma thrombomodulin as a marker of endothelium damage. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1991; 33(6): 529–530. PMID: 1667951.
16. Seigneur M., Dufourcq P., Conri C. et al. Plasma thrombomodulin — new approach of endothelial damage. *Int Angiol.* 1993; 12(4): 85–93. PMID: 8207313.
17. Laszik Z.G., Zhou X.J., Ferrell G.L. et al. Down-Regulation of Endothelial Expression of Endothelial Cell Protein C Receptor and Thrombomodulin in Coronary Atherosclerosis. *American Journal of Pathology* 2001; 159 (3): 797–802. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)61753-1. PMID: 11549570.
18. Evdokimenko A.N. [Ultrastructural changes of endothelium in unstable atherosclerotic plaques of carotid sinus]. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy* 2015; 11(5): 639–647.
19. Pawlak K., Myśliwiec M., Pawlak D. Kynurenine pathway — a new link between endothelial dysfunction and carotid atherosclerosis in chronic kidney disease patients. *Adv Med Sci.* 2010; 55(2): 196–203. DOI: 10.2478/v10039-010-0015-6. PMID: 20439183.
20. Taylan A., Sari I., Kozaci D.L. et al. Evaluation of various endothelial biomarkers in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2012; 31: 23–28. DOI: 10.1007/s10067-011-1760-z. PMID: 21556780.
21. Salomaa V., Matei C., Aleksic N. et al. Soluble thrombomodulin as a predictor of incident coronary heart disease and symptomless carotid artery atherosclerosis in the Atherosclerosis. *Lancet.* 1999; 353(9166): 1729–1734. PMID: 10347984.
22. Thorand B., Baumert J., Herder C. et al. Soluble thrombomodulin as a predictor of type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984–1998. *Diabetologia* 2007; 50(3): 545–548. DOI: 10.1007/s00125-006-0568-x. PMID: 17195062.
23. Wu K.K. Soluble thrombomodulin and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14(4): 373–375. DOI: 10.1097/01.mol.0000083766.66245.44. PMID: 12865735.
24. Karakas M., Baumert J., Herder C. et al. Soluble thrombomodulin in coronary heart disease: lack of an association in the MONICA/KORA case-cohort study. *J Thromb Haemost.* 2011; 9(5): 1078–1080. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04229.x. PMID: 21320279.
25. Dósa E., Szabó A., Prohászka Z. et al. Changes in the plasma concentration of soluble thrombomodulin in patients with severe carotid artery stenosis after eversion endarterectomy. *Inflamm Res.* 2005; 54(7): 289–294. DOI: 10.1007/s00011-005-1354-9. PMID: 16134058.
26. Ignarro L.J., Cirino G., Casini A., Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999; 34(6): 879–886. PMID: 10598133.
27. Tanashyan M. M., Raskurazhev A. A., Shabalina A. A. et al. [Biomarkers of cerebral atherosclerosis: the capabilities of early diagnosis and prognosis of individual risk]. *Annaly klinicheskoy i eksperimental'noy nevrologii* 2015; 9(3): 20–25.
28. Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012; 33(7): 829–837. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr304. PMID: 21890489.
29. Li H, Förstermann U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2013; 13(2): 161–167. DOI: 10.1016/j.coph.2013.01.006. PMID: 23395155.

Immunohistochemical and ultrasonic signs of the disturbance of anti-thrombogenic properties of endothelium in atherosclerosis of the carotid sinus

A.N. Evdokimenko, T.S. Gulevskaya, M.M. Tanashyan

Research Center of Neurology (Moscow)

Keywords: endothelial dysfunction, atherosclerosis of carotid sinus, von Willebrand factor, thrombomodulin, endothelial nitric oxide synthase, morphological study.

Introduction. Endothelial dysfunction is currently believed to play a crucial role in pathogenesis of atherosclerosis. Nevertheless, there are only few studies that demonstrate the relationship between changes in parameters of the atherosclerotic process and the main functional properties of endothelium. In addition, the findings are often controversial, which served as an incentive for this study.

Materials and methods. Thirteen atherosclerotic plaques resected during carotid endarterectomy were subjected to immunohistochemical and electron microscopy examination. The intensity of expression of the von Willebrand factor, thrombomodulin, and endothelial nitric acid synthase was assessed semi-quantitatively and compared to the main parameters of activity and the course of atherosclerosis in a plaque (volume of atheromatosis, lipophagy aggregation, infiltration of the fibrous cap by monocytes and macrophages). Complicated and uncomplicated plaques were also compared.

Results. The level of von Willebrand factor in the carotid sinus endothelium increased as lipids were accumulated in it and as the fibrous cap was infiltrated by monocytes and macrophages ($p < 0.017$), as opposed to the levels of thrombomodulin and en-

dothelial nitric oxide synthase whose expression did not show the activity of the atherosclerotic process and did not correlate with the level of von Willebrand factor. Meanwhile, the expression of thrombomodulin and endothelial nitric oxide synthase correlated with each other ($p = 0.004$). No difference in staining intensity for all three markers was detected between the complicated and uncomplicated plaques. Ultrasonic analysis of endothelium demonstrated the strongly pronounced disturbance of anti-thrombogenicity of the vascular wall as a result of numerous defects of the endothelial stratum, adhesion of blood cells to the arterial surface causing microthrombi formation and activation of endothelial cells along with dystrophic changes in them, necrosis, and exfoliation into the vascular lumen.

Conclusions. The von Willebrand factor is found to have high diagnostic significance in the assessment of activity of the atherosclerotic process in the carotid sinus and the risk of developing complications. Thrombomodulin and endothelial nitric acid synthase are not recommended to be used as biomarkers of progression of atherosclerosis of this localization, since they are not indicative of the intensity of inflammatory response and destructive processes in a plaque.

Контактный адрес: Евдокименко Анна Николаевна – канд. мед. наук, ученый секретарь, науч. сотр. лаб. патологической анатомии ФГБНУ НЦН. Москва 125367, Волоколамское ш., д. 80. E-mail: annevdokimenko@gmail.com;

Гулевская Т.С. – зав. лаб. патологической анатомии ФГБНУ НЦН;

Танашян М.М. – зам. директора по научной и лечебной работе, зав. 1-м неврол. отд. ФГБНУ НЦН.