



УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ПРИЗНАКИ НОРМАЛЬНЫХ И ДИСФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК АОРТЫ КРЫСЫ

В.А. Кошелев, Л.А. Богданов, Р.А. Мухамадияров, А.И. Лазебная, А.Д. Степанов, А.Г. Кутихин

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Основные положения

- Принципиальным признаком, отличающим нормальные эндотелиальные клетки от дисфункциональных, является их ориентация вдоль направления потока крови при отсутствии цитоплазматических или мембранных дефектов.
- Основными признаками дисфункциональных эндотелиальных клеток являются шарообразная форма (свидетельствующая о потере клеточной ориентации вдоль направления потока крови), вакуолизация цитоплазмы, нарушение целостности плазматической мембраны, снижение контрастности между ядром и цитоплазмой и частичное открепление эндотелиальной клетки от базальной мембраны.
- Состояние органелл (митохондрий, пластинчатого комплекса и эндоплазматической сети) и нарушения целостности базальной мембраны не являются чувствительными или специфичными признаками дисфункциональных эндотелиальных клеток в сравнении с вышеуказанными.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель

Анализ электронно-микроскопических признаков нормальных и дисфункциональных эндотелиальных клеток на примере нисходящей части аорты крысы (характеризующейся ламинарным потоком крови).

Материалы и методы

Исследование проведено на 5 самцах крыс Wistar (возраст ~6 мес., масса тела ~500 г). Фрагменты нисходящей части аорты фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде и постфиксировали в 1% солевом растворе тетраоксида осмия с 1,5% ферроцианидом калия, инкубировали с 1% тиокарбогидразидом, окрашивали в 2% водном растворе тетраоксида осмия, контрастировали в 1% фосфорно-вольфрамовой кислоте, окрашивали 2% триацетатом гадолиния, обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации, изопропанолу и ацетону и пропитывали в смеси ацетона и эпоксидной смолы, а затем в чистой эпоксидной смоле Araldite 502 с ее последующей полимеризацией. После шлифовки и полировки образцы аорт были контрастированы цитратом свинца, напылены углеродом и визуализированы посредством сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах.

Результаты

Электронно-микроскопический анализ позволил выделить три основных морфотипа нормальных эндотелиальных клеток: 1) вытянутая вдоль направления потока крови форма и продолговатое ядро; 2) полукруглая форма и овальное, круглое, бобовидное или полиморфное ядро с менее выраженной, но ясно видимой ориентацией вдоль направления потока крови; 3) крупное ядро и еще менее выраженная, но видимая ориентация вдоль направления потока крови. Базальная мембрана нормальных эндотелиальных клеток часто содержала различные дефекты. Дисфункциональные эндотелиальные клетки также имели несколько морфотипов, которые характеризовались сочетанием следующих признаков: приобретение шаровидной формы и потеря ориентации клетки вдоль направления потока крови, вакуолизация цитоплазмы, нарушение целостности плазматической мембраны, снижение контрастности между ядром и цитоплазмой и частичное открепление эндотелиальной клетки от базальной мембраны. При этом в дисфункциональных эндотелиальных клетках зачастую не наблюдалось выраженного изменения структуры органелл или прилегающей к ним базальной мембраны.

Заключение

Сохранение ориентации эндотелиальных клеток вдоль направления потока крови свидетельствует об их нормальном фенотипе при отсутствии иных

Для корреспонденции: Владислав Александрович Кошелев, vladkoshelev80@gmail.com; адрес: бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Corresponding author: Vladislav A. Koshelev, vladkoshelev80@gmail.com; address: 6, academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

	признаков дисфункциональных эндотелиальных клеток (вакуолизации цитоплазмы, нарушения целостности плазматической мембраны, снижения контрастности между ядром и цитоплазмой и частичного открепления эндотелиальной клетки от базальной мембраны).
Ключевые слова	Эндотелиальные клетки • Дисфункция эндотелия • Электронная микроскопия • Эндотелиальная механотрансдукция • Эндотелиальный гликокаликс • Базальная мембрана

Поступила в редакцию: 21.08.2024; поступила после доработки: 24.09.2024; принята к печати: 17.10.2024

ELECTRON MICROSCOPY SIGNS OF NORMAL AND DYSFUNCTIONAL RAT AORTIC ENDOTHELIUM

V.A. Koshelev, L.A. Bogdanov, R.A. Mukhamadiyarov, A.I. Lazebnaya, A.D. Stepanov, A.G. Kutikhin

Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, 6, academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

	Highlights
	• A fundamental distinguishing feature of normal endothelial cell morphotypes from pathological ones is their preserved orientation along the direction of blood flow in the absence of cytoplasmic or membrane defects. • The main characteristics of dysfunctional endothelial cells include a spherical shape (indicating a loss of cellular orientation along the direction of blood flow), the presence of large vacuoles within the cell, cytoplasmic vacuolization, impaired plasma membrane integrity, reduced contrast between the nucleus and cytoplasm, and partial detachment of the endothelial cell from the basement membrane. • The condition of organelles (mitochondria, Golgi complex, and endoplasmic reticulum) and impaired basement membrane integrity are not sensitive or specific markers of dysfunctional endothelium compared to the aforementioned features.

Aim	To analyze the electron microscopic features of normal and dysfunctional endothelium using the descending aorta of rats (characterized by laminar blood flow).
Methods	The study was conducted on 5 male Wistar rats (age ≈ 6 months, body weight ≈ 500 g). The extracted aortas were chemically fixed in 2.5% glutaraldehyde, post-fixed in 1% osmium tetroxide solution with 1.5% potassium ferrocyanide, incubated with 1% thiocarbohydrazide, stained in 2% aqueous osmium tetroxide solution, contrasted in 1% phosphotungstic acid, stained with 2% gadolinium triacetate, dehydrated in ascending concentrations of ethanol, isopropanol, and acetone, embedded in a mixture of acetone and epoxy resin, and then in pure Araldite 502 epoxy resin, followed by its polymerization. After grinding and polishing, the aorta samples were contrasted with lead citrate, coated with carbon, and visualized using backscattered scanning electron microscopy.
Results	Electron microscopic analysis identified three main morphotypes of normal endothelial cells: 1) elongated shape along the direction of blood flow and an elongated nucleus; semicircular shape with an oval, round, kidney-shaped, or polymorphic nucleus with a less pronounced but clearly visible orientation along the direction of blood flow; 3) large nucleus with an even less pronounced but visible orientation along the direction of blood flow. The basement membrane of normal endothelial cells often contained various defects. Dysfunctional endothelium also exhibited several morphotypes, characterized by different combinations of the following features: spherical shape and loss of cell orientation along the direction of blood flow, presence of large vacuoles within the cell, cytoplasmic vacuolization, disruption of plasma membrane integrity, reduced contrast between the nucleus and cytoplasm, and partial detachment of the endothelial cell from the basement membrane. However, pronounced changes in the structure of organelles or the adjacent basement membrane were often not observed in dysfunctional endothelial cells.

Conclusion	The preservation of orientation along the direction of blood flow indicates a normal phenotype of endothelial cells in the absence of other signs of dysfunctional endothelium (vacuoles within the cytoplasm, cytoplasmic vacuolization, disruption of plasma membrane integrity, reduced contrast between the nucleus and cytoplasm, and partial detachment of the endothelial cell from the basement membrane).
Keywords	Endothelial cells • Endothelial dysfunction • Electron microscopy • Endothelial mechanotransduction • Endothelial glycocalyx • Basement membrane

Received: 21.08.2024; received in revised form: 24.09.2024; accepted: 17.10.2024

Список сокращений
ЭК – эндотелиальные клетки

Введение

Поддержание внутрисосудистого гомеостаза и физиологического функционирования сосудистой стенки в значительной степени регулируется эндотелием, который обеспечивает атромбогенное течение крови по кровеносным сосудам, надлежащий баланс между вазоконстрикцией и вазодилатацией, а также избирательную проницаемость внутренней оболочки сосудов (интимы) для ионов и питательных веществ и их непроницаемость для липидов [1, 2]. При различных нарушениях гомеостаза циркулирующей крови (дислипидемии, гипергликемии, азотемии, гиперфосфатемии, гиперкальциемии, развитии острого и хронического системного воспаления), сопровождающих ряд патологий (сахарный диабет, хроническая болезнь почек, гиперпаратиреоз, инфекционные заболевания) и старение организма, происходит нарушение функций эндотелия [2–7]. Это выражается в утрате атромбогенных свойств эндотелия, нарушении баланса выделяемых им вазоконстрикторов и вазодилататоров, повышении сосудистой проницаемости и увеличении количества провоспалительных молекул, выделяемых эндотелиальными клетками (ЭК) в кровоток [2–7]. Данное состояние получило в научной литературе (в том числе в соответствующих международных рекомендациях) термин «дисфункция эндотелия», которая в зависимости от пускового фактора, изменения молекулярного профиля ЭК и патологических последствий подразделяется на вазоспастическую (к примеру, при артериальной гипертензии), провоспалительную (при старении организма, остром или хроническом повреждении почек, а также при сепсисе) и протромботическую (при среднетяжелом и тяжелом течении COVID-19) [2–7]. К патологическим последствиям развития дисфункции эндотелия относят гипертоническую болезнь, хроническое стерильное системное воспаление низкой интенсивности, в том числе при старческой астении (так называемый инфламейджинг), а также тромбоз сосудов при тяжелом течении COVID-19 [2–7].

Несмотря на достигнутые успехи в выявлении циркулирующего маркера протромботической дисфункции эндотелия (нерасщепленных протеазами гемостатически активных высокомолекулярных мультимеров фактора фон Виллебранда) [8, 9], детекция наиболее распространенных типов дисфункции эндотелия (вазоспастической и провоспалительной) *in vivo* остается затруднительной. Определение вазоспастической дисфункции эндотелия предполагает использование либо методов инвазивного вмешательства (коронарная ангиография, ультразвуковое внутрисосудистое исследование, канюляция плечевого ствола для плетизмографии вен предплечья), либо дорогостоящих и не всегда доступных методов (позитронно-эмиссионная или магнитно-резонансная томография), либо интересных, но недостаточно стандартизованных методов (пальцевая плетизмография, измерение зависимой от потока вазодилатации плечевого ствола, оценка расширения артерий сетчатки под воздействием мерцающего света) [10]. Данные методы были включены в международные рекомендации по оценке дисфункции эндотелия, однако ни один из них не был рекомендован как основной вследствие вышеуказанных недостатков [10]. Циркулирующие биохимические маркеры вазоспастической дисфункции эндотелия (NO₂/NO₃, тетрагидробиптерин, L-аргинин, асимметричный и симметричный диметиларгинин) не отражают вазоспазм и вазодилатацию напрямую, а используемые на данный момент циркулирующие маркеры провоспалительной дисфункции эндотелия (интерлейкин-6, интерлейкин-8, фактор хемотаксиса моноцитов MCP-1/CCL2, растворимые молекулы клеточной адгезии sVCAM-1 и sICAM-1) не являются достаточно специфичными для ЭК и также выделяются в системный кровоток другими клеточными популяциями [2, 10–12].

Основными недостатками циркулирующих маркеров вазоспастической и провоспалительной дисфункции эндотелия являются их относительно малая концентрация в крови и недостаточно высо-

кая специфичность применительно к данной патологии [10, 13, 14]. Хотя современные протеомные подходы обладают большим потенциалом в решении данной проблемы, обеспечение доказательной базы применения циркулирующих маркеров в обязательном порядке требует анализа их ассоциативной и корреляционной связи с морфологическими признаками, отражающими протекающие в клетке процессы [10, 13, 14]. В сравнении с циркулирующими маркерами морфологические признаки дисфункции эндотелия характеризуются существенно более высокой специфичностью и чувствительностью, являясь прямым следствием происходящих в клетке патологических процессов. Поскольку изображения, получаемые посредством световой микроскопии, не обладают достаточным разрешением и контрастностью для анализа состояния эндотелиального гликокаликса, межэндотелиальных контактов, клеточных мембран, базальной мембраны и органелл, объективный анализ дисфункции эндотелия *in situ* требует проведения электронно-микроскопического исследования. В свою очередь, ультроструктурный анализ минерализованных тканей (к которым относятся и атеросклеротические бляшки, подвергающиеся кальцификации приблизительно в 70% случаев) подразумевает использование метода EM-BSEM (окрашивание цельных сегментов тканей тяжелыми металлами с их последующим заключением в эпоксидную смолу, шлифовкой и полировкой эпоксидных блоков и визуализацией при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах) [15–17]. С помощью такого подхода становится возможным определять нарушения целостности межэндотелиальных контактов, дефекты клеточных мембран и базальной мембраны, а также визуализировать дисфункцию органелл как в артериальном эндотелии, выстилающем неоинтиму, так и в эндотелии капилляров неоинтимы, отличающихся от сосудов микроциркуляторного русла адвентициальной оболочки и периваскулярной жировой ткани повышенной проницаемостью [15–17].

В данном исследовании нами проведен анализ электронно-микроскопических признаков дисфункциональных эндотелиальных клеток для последующего поиска их корреляции с содержанием потенциальных циркулирующих маркеров дисфункции эндотелия, определяемых различными полуколичественными и количественными методами в сыворотке крови. Нормальные эндотелиальные клетки в большинстве своем имели три морфотипа и либо: 1) были вытянуты вдоль направления потока крови, имели продолговатое ядро; 2) имели полукруглую форму и овальное, круглое, бобовидное или полиморфное ядро, сохраняя определенную ориентацию по направлению потока крови; 3) имели крупное ядро и еще

менее выраженную ориентацию вдоль направления потока крови. Данные нормальные морфотипы эндотелиальных клеток наблюдались и в аортальном эндотелии на поверхности интимы, и в эндотелии сосудов микроциркуляторного русла внутри аортальной адвентициальной оболочки. К числу признаков дисфункциональных эндотелиальных клеток относились шарообразная форма с потерей ориентации вдоль потока крови, вакуолизация цитоплазмы, нарушение целостности плазматической мембраны, снижение контрастности между ядром и цитоплазмой и частичное открепление эндотелиальной клетки от базальной мембраны. Визуализация митохондрий, пластинчатого комплекса и эндоплазматической сети не продемонстрировала принципиальных различий данных органелл между нормальными и дисфункциональными эндотелиальными клетками. Нарушения целостности базальной мембраны также не были ассоциированы с нормальными или дисфункциональными морфотипами эндотелиальных клеток, поскольку наблюдались даже при сохранении клеточной ориентации вдоль потока и могли отсутствовать и при явных признаках дисфункциональных эндотелиальных клеток (потеря ориентации клетки вдоль потока, вакуолизация цитоплазмы, частичное открепление клетки от базальной мембраны). Данные электронно-микроскопические наблюдения согласуются с ранее полученными результатами анализа геной и белковой экспрессии, которые свидетельствуют о нарушениях сигнальных путей эндотелиальной механотрансдукции и об отсутствии изменений баланса между выделяемыми эндотелиальными клетками протеазами и их ингибиторами при моделировании провоспалительной дисфункции эндотелия *in vitro* и *in vivo*. Выявленные электронно-микроскопические признаки дисфункциональных эндотелиальных клеток далее будут использованы для анализа ассоциативных и корреляционных связей с иммуногистохимическими и циркулирующими маркерами дисфункционального эндотелия.

Материалы и методы

Для электронно-микроскопического анализа нормальных и дисфункциональных эндотелиальных клеток использовали нисходящие сегменты аорты 5 самцов крыс Wistar (вес ~500 г, возраст ~6 мес., получены из вивария отдела экспериментальной медицины НИИ КПССЗ). Животные были распределены по полипропиленовым клеткам (5 крыс на клетку) с выстланной деревянной щепой и имели неограниченный доступ к воде и пище. В течение всего времени эксперимента поддерживались стандартные условия температурного режима (24 ± 1 °C), относительной влажности ($55 \pm 10\%$)

и 12-часовые циклы смены света и темноты. Контроль состояния здоровья всех крыс проводили ежедневно. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (протокол заседания № 9 от 10.09.2021), исследование было выполнено в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986).

Образцы нисходящей аорты крыс Wistar были: 1) подвергнуты химической фиксации в 2,5% растворе глутарового альдегида (G6257, Sigma-Aldrich, США) на 0,1М фосфатном буфере (3 смены – через 10 мин, 4 и 16 ч при 4 °С) и отмыты в чистом 0,1М фосфатном буфере (4 смены по 20 мин); 2) постфиксированы в 1% растворе тетраоксида осмия на 0,1М фосфатном буфере (19102, Electron Microscopy Sciences, США) с 1,5% ферроцианидом калия (8.06.00423, ChemExpress, Китай) в течение 16 ч и отмыты в чистом 0,1М фосфатном буфере (4 смены по 20 мин); 3) инкубированы с 1% тиокарбогидразидом (21900, Electron Microscopy Sciences, США) в течение 16 ч при 60 °С и отмыты в бидистиллированной воде (4 смены по 20 мин); 4) окрашены в 2% водном растворе тетраоксида осмия (19102, Electron Microscopy Sciences, США) в течение 16 ч и отмыты в бидистиллированной воде (4 смены по 20 мин); 5) контрастированы в 1% водном растворе фосфорновольфрамовой кислоты (200209, АО «ЛенРеактив», Россия) 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, ООО НПП «Химметпродукт», Россия) в течение 16 ч и отмыты в бидистиллированной воде (4 смены по 20 мин); 7) обезвожены 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), изопропанолу (13-5, АО «ЭКОС-1», Россия; 4 смены по 15 мин) и ацетону (13-5, АО «ЭКОС-1», Россия; 3 смены по 30 мин); 8) пропитаны в смеси ацетона (13-5, АО «ЭКОС-1», Россия) и эпоксидной смолы (Araldite 502, 13900, Electron Microscopy Sciences, США) в соотношении 1:1 в течение 16 ч; 9) пропитаны в чистой эпоксидной смоле (Araldite 502, 13900, Electron Microscopy Sciences, США) в течение 24 ч и полимеризованы в свежей эпоксидной смоле (Araldite 502, 13900, Electron Microscopy Sciences, США) в течение 24 ч при 60 °С.

Далее на шлифовально-полировальном станке TegraPol-11 (Struers, Дания) была проведена шлифовка до глубины исследуемого образца с использованием шлифовальных дисков с размером зерен 800 grit (40400138, Struers, Дания) или 1 200 grit (40400140, Struers, Дания) с последующей полировкой дисками из нетканого материала (M620, NX-MET, Франция) с использованием

суспензий монокристаллических алмазов с диаметром 9 и 6 мкм («ПОЛИЛАБ PRO», ГК «ПОЛИТЕГ-МЕТ»), дисками из тканого шелка (M500, NX-MET, Франция) с использованием суспензии монокристаллических алмазов с диаметром 3 мкм («ПОЛИЛАБ PRO», ГК «ПОЛИТЕГ-МЕТ») и завершением полировки бархатным кругом без абразива (экстра-мягкий флок, M200, NX-MET, Франция). После завершения полировки проведено контрастирование образцов по Рейнольдсу раствором цитрата свинца собственного приготовления в течение 7 мин с последующей отмывкой блока в трех сменах бидистиллированной воды по 20 мин и высушиванием при комнатной температуре в течение часа. После напыления поверхности заключенного в эпоксидный блок образца углеродом с толщиной покрытия 10–15 нм (EM ACE200, Leica Microsystems, Германия) была проведена визуализация с помощью сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах с ускоряющим напряжением 12 или 15 кВ (Hitachi S-3400N, Hitachi, Япония). Основное внимание было сфокусировано на состоянии эндотелиальных клеток: их геометрии и ориентации вдоль направления потока крови, контрастности, наполнении и степени вакуолизации их цитоплазмы, внешнем виде органелл, целостности плазматической мембраны и базальной мембраны, их прикреплении к базальной мембране.

Результаты

Для установления ультраструктурных признаков эндотелиальных клеток была поставлена задача определить типы нормальной структуры эндотелия. В первую очередь проанализирован макрососудистый эндотелий (на примере эндотелия аорты крысы). В одном из двух наиболее распространенных вариантов эндотелиальные клетки имели продолговатое ядро и были сильно вытянуты вдоль направления потока крови, прижимаясь к базальной мембране (рис. 1, *A–E*), при этом целостность внутренней эластической мембраны могла быть нарушена (см. рис. 1, *D*), а ядро эндотелиальной клетки могло находиться на некотором удалении от базальной мембраны (см. рис. 1, *E*). Во втором распространенном варианте эндотелиальные клетки имели округленную форму, а их ядро было менее вытянуто вдоль направления потока крови (см. рис. 1, *F–M*). При этом базальная мембрана могла не визуализироваться (см. рис. 1, *F–H*) или, наоборот, служить четкой границей между эндотелиальной клеткой и внутренней эластической мембраной (см. рис. 1, *I–M*). Базальная мембрана нормальных эндотелиальных клеток в значительной степени была интактной, однако практически всегда имела некоторые дефекты, выражавшиеся в нарушении ее целостности (см. рис. 1, *I–M*). Нако-

нец, третьим типом структуры нормальных эндотелиальных клеток были клетки с крупным ядром, слабо ориентированным относительно потока крови (см. рис. 1, *N–O*).

Анализ микрососудистого эндотелия *vasa vasorum* в адвентициальной оболочке аорты крысы показал сходство вариантов нормального макро- и микрососудистого эндотелия. Находящиеся в физиологическом состоянии эндотелиальные клетки капилляров адвентициальной оболочки также либо имели продолговатое ядро и были ориентированы вдоль потока крови (рис. 2, *A–C*), либо имели округлое или полиморфное ядро, менее ориентированное вдоль потока крови (см. рис. 2, *D–I*). Микрососудистые эндотелиальные клетки часто имели богатое наполнение цитоплазмы различными оргanelлами и включениями, что свидетельствовало об их активном функционировании (см. рис. 2, *A–I*).

Дисфункциональные эндотелиальные клетки были хорошо отличимы от нормальных в силу выраженных морфологических изменений. Первым распространенным вариантом дисфункциональных эндотелиальных клеток было приобретение ими шарообразной формы (рис. 3, *A–E*), сигнализирующее о нарушении механотрансдукции в условиях наблюдающегося в аорте ламинарного потока. Ядро таких клеток было полиморфным (см. см. рис. 3, *A, B*), округлым (см. рис. 3, *C*) или бобовидным (см. рис. 3, *D, E*). При этом дисфункциональные эндотелиальные клетки могли находиться рядом с нормальными, что указывало

на дисфункцию именно самих клеток, а не изначально патологические условия в том или ином сегменте аорты (см. рис. 3, *B*). В некоторых эндотелиальных клетках подобного вида наблюдали

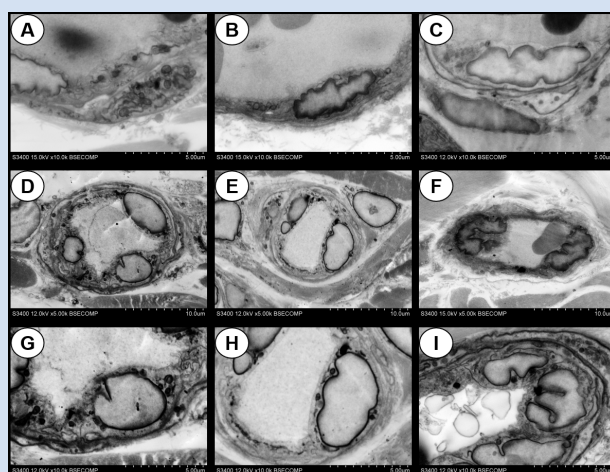


Рисунок 2. Электронно-микроскопическая визуализация различных вариантов эндотелиальных клеток в сосудах адвентициальной оболочки аорты крысы; *A, B, C* – эндотелиальные клетки с продолговатым ядром и богатым наполнением цитоплазмы; *D, E, F* – эндотелиальные клетки капилляров с округлым (*D*), овальным (*E*) или полиморфным (*F*) ядром, обзорный снимок; *G, H, I* – эндотелиальные клетки капилляров с округлым (*G*), овальным (*H*) или полиморфным (*I*) ядром, прицельный снимок

Figure 2. Electron microscopic visualization of capillary endotheliocytes in the adventitia of rat aorta; *A, B, C* – Endothelial cells with an elongated nucleus and rich cytoplasmic content; *D, E, F* – Capillary endothelial cells with a round (*D*), oval (*E*), or polymorphic (*F*) nucleus, overview; *G, H, I* – Capillary endothelial cells with a round (*G*), oval (*H*), or polymorphic (*I*) nucleus, close-ups

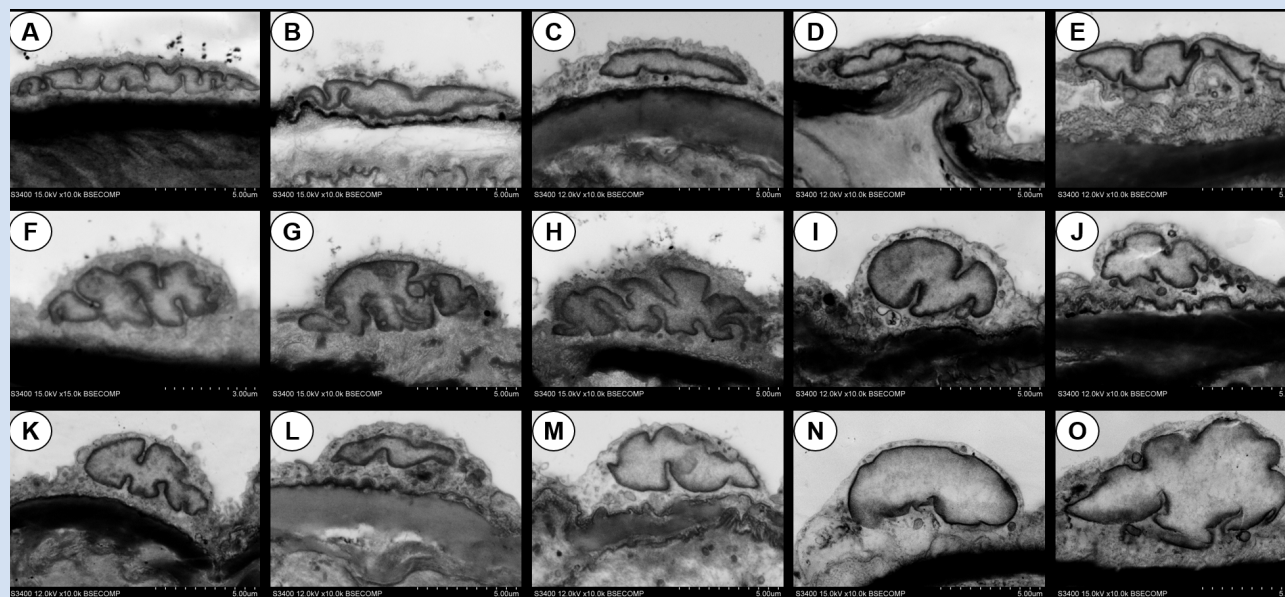


Рисунок 1. Электронно-микроскопическая визуализация различных вариантов нормальных эндотелиальных клеток аорты крысы; *A, B, C, D, E* – эндотелиальные клетки продолговатой формы с вытянутым вдоль движения потока крови тонким ядром; *F, G, H, I, J, K, L, M* – эндотелиальные клетки округленной формы с менее выраженной вытянутостью ядра вдоль движения потока крови; *N, O* – эндотелиальные клетки с крупным ядром, относительно слабо ориентированным относительно потока крови

Figure 1. Electron microscopic visualization of normal endotheliocytes in rat aorta; *A, B, C, D, E* – Endothelial cells with an elongated shape and a thin nucleus stretched along the direction of blood flow; *F, G, H, I, J, K, L, M* – Endothelial cells with a rounded shape and a less pronounced elongation of the nucleus along the direction of blood flow; *N, O* – Endothelial cells with a large nucleus, relatively weakly oriented with respect to the direction of blood flow

вакуолизацию цитоплазмы (см. рис. 3, *D*). Другими распространенными признаками дисфункциональных эндотелиальных клеток были крупные пустоты, расположенные вблизи ядра (см. рис. 3, *F–I*), и усиленная вакуолизация цитоплазмы (см. рис. 3, *J–L*). Вакуолизация цитоплазмы могла быть умеренной и сопровождаться уменьшением размеров ядра (см. рис. 3, *J*) либо выраженной и наблюдаться одновременно с дезинтеграцией ядра (см. рис. 3, *K, L*). Еще одним морфологическим вариантом дисфункциональных эндотелиальных клеток было явное нарушение целостности плазматической мембраны, которое на начальной стадии дисфункции не сопровождалось откреплением эндотелиальной клетки от базальной мембраны (см. рис. 3, *M*). Более поздние стадии данного дисфункционального морфотипа характеризовались снижением контрастности между ядром и цитоплазмой (см. рис. 3, *N, O*), а также частичным (см. рис. 3, *N*) или полным (см. рис. 3, *O*) откреплением от базальной мембраны. Последнюю стадию можно считать эквивалентной клеточной гибели,

на что указывает потеря клеткой своей геометрии (см. рис. 3, *O*).

Далее были рассмотрены некоторые ультраструктурные особенности строения эндотелиальных клеток, которые теоретически могут различаться в норме и при патологии, однако на практике этого по разным причинам не выявлено. Одной из предполагаемых черт дисфункции эндотелия является частичная или полная потеря эндотелиального гликокаликса, который в силу его нестабильности достаточно сложно детектировать при анализе биоптатов. Тем не менее электронно-микроскопическое исследование целых сегментов сосудов оставляет определенную вероятность сохранности гликокаликса, что и было продемонстрировано в данном исследовании (рис. 4, *A–F*). При этом гликокаликс может быть представлен в виде ветвей (см. рис. 4, *A, B, D–F*) или покрывать поверхность эндотелиальной клетки ровным слоем (см. рис. 4, *C*). Толщина эндотелиального гликокаликса в данном исследовании разнилась от 1 до 4 мкм (см. рис. 4, *A–F*).

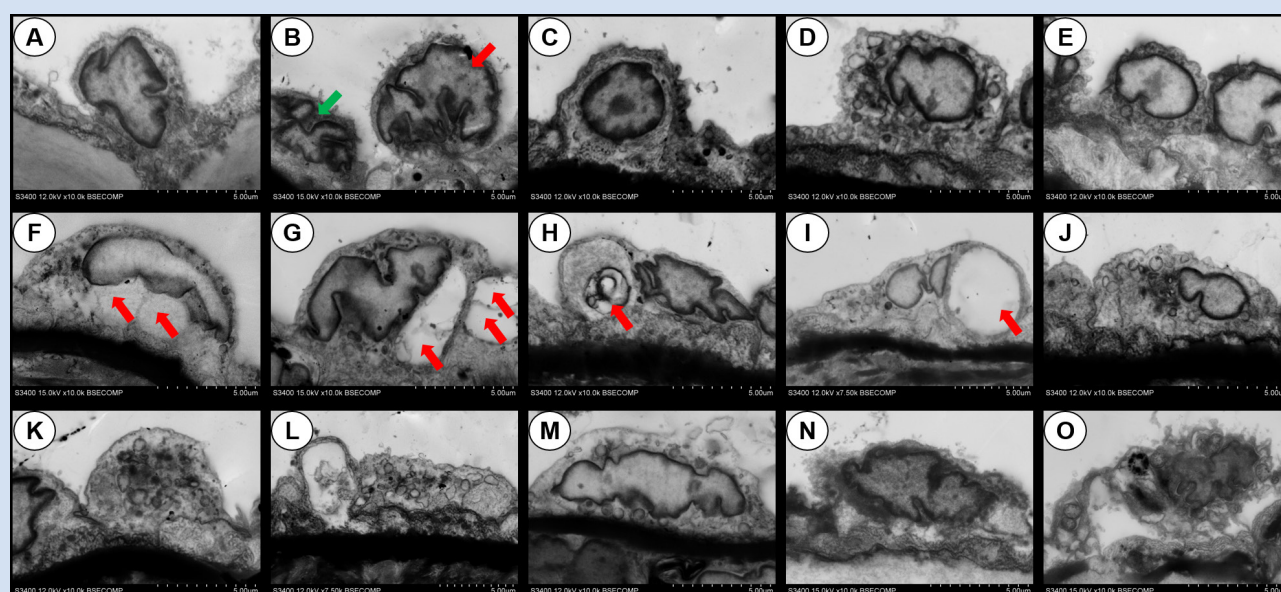


Рисунок 3. Электронно-микроскопическая визуализация различных вариантов дисфункциональных эндотелиальных клеток аорты крысы. *A, B, C, D, E* – клетки шарообразной формы с полиморфным (*A, B*), округлым (*C*) или бобовидным (*D, E*) ядром. На рис. 1, *B* дисфункциональная эндотелиальная клетка обозначена красной стрелкой, а нормальная – зеленой стрелкой; *F, G, H, I* – эндотелиальные клетки с продолговатым (*F*), полиморфным (*G, H*) или бобовидным (*I*) ядром и крупными пустотами (обозначены красными стрелками); *J* – эндотелиальная клетка с умеренной вакуолизацией, гетерогенной структурой цитоплазмы и малым бобовидным ядром; *K, L* – эндотелиальные клетки с выраженной вакуолизацией цитоплазмы и дезинтегрированным ядром; *M* – эндотелиальная клетка на стадии, предшествующей ее гибели (частичная дезинтеграция плазматической мембраны при сохранении прикрепления клетки к базальной мембране); *N* – эндотелиальная клетка на более поздней стадии своей гибели (уменьшенная контрастность между ядром и цитоплазмой, частичное открепление клетки от базальной мембраны); *O* – эндотелиальная клетка в процессе своей гибели (потеря четкой формы клетки, потеря целостности плазматической мембраны, практически полная потеря контрастности между ядром и цитоплазмой, открепление большей части клетки от базальной мембраны)

Figure 3. Electron microscopic visualization of dysfunctional endotheliocytes in rat aorta. *A, B, C, D, E* – Spherical cells with polymorphic (*A, B*), round (*C*), or kidney-shaped (*D, E*) nuclei. In image 1*B*, the dysfunctional endothelial cell is marked with a red arrow, and the normal cell is marked with a green arrow; *F, G, H, I* – Endothelial cells with elongated (*F*), polymorphic (*G, H*) or kidney-shaped (*I*) nuclei and large vacuoles (indicated by red arrows); *J* – Endothelial cell with moderate vacuolization, heterogeneous cytoplasmic structure, and a small kidney-shaped nucleus; *K, L* – Endothelial cells with pronounced cytoplasmic vacuolization and disintegrated nuclei; *M* – Endothelial cell at a stage preceding its death (partial disintegration of the cell membrane while retaining attachment to the basement membrane); *N* – Endothelial cell at a later stage of its death (reduced contrast between nucleus and cytoplasm, partial detachment from the basement membrane); *O* – Endothelial cell in the process of dying (loss of clear cell shape, loss of plasma membrane integrity, almost complete loss of contrast between nucleus and cytoplasm, detachment of most of the cell from the basement membrane)

Одним из несомненных преимуществ ультраструктурного анализа является возможность визуализации органелл, анализа их количества и пространственного распределения в клетке. Наиболее легко детектируемыми органеллами являются митохондрии, которые могут быть компактно расположены непосредственно около ядра (рис. 5, *A*), на некотором удалении от ядра (см. рис. 5, *B*), быть равномерно распределенными по апикальному и латеральным отделам цитоплазмы эндотелиальных клеток (см. рис. 5, *C*) или быть равномерно распределенными по всей клетке (см. рис. 5, *D*). Все указанные варианты расположения митохондрий были выявлены в нормальных эндотелиальных клетках, вытянутых вдоль направления потока, хотя и не имеющих продолговатого ядра (см. рис. 5, *A–D*). В некоторых клетках выявлялись цистерны пластинчатого комплекса (см. рис. 5, *E*) и эндоплазматическая сеть (см. рис. 5, *F*), также равномерно распределенные по клетке (см. рис. 5, *E*) или компактно расположенные в определенной локализации (см. рис. 5, *F*).

Важным критерием оценки структуры эндотелия является установление целостности базальной мембраны, которая, однако, не имеет четкой самостоятельной связи с физиологическим или патологическим состоянием эндотелиальных клеток. В данном исследовании выявлено, что базальная мембрана

может сохранять свою целостность при всех распространенных вариантах эндотелиального фенотипа: и при выраженной ориентации клетки вдоль направления потока с приобретением продолговатой формы ядра (рис. 6, *A*), и при полукруглой форме клетки с бобовидным ядром (см. рис. 6, *B*), и при потере дисфункциональной клеткой контакта с базальной мембраной (см. рис. 6, *C*). При этом, напротив, целостность базальной мембраны может быть нарушена и при нормальном строении эндотелия (на примере клеток полукруглой формы с полиморфным ядром, см. рис. 6, *D, E*), при этом базальная мембрана может иметь множественные дефекты (см. рис. 6, *D*) или локальные разрывы достаточно большой длины (см. рис. 6, *E*). Преимуществом электронно-микроскопической визуализации по методу EM-BSEM является возможность детекции даже наиболее мелких или неявных дефектов базальной мембраны (снижение контрастности поврежденных участков отражает степень лизиса базальной мембраны). При этом в одном поле зрения могут встречаться и неявные дефекты со сниженной контрастностью базальной мембраны, и ее микроразрывы (см. рис. 6, *F*).

Обсуждение

Несмотря на достаточно большое количество исследований, посвященных моделированию различных видов дисфункции эндотелия *in vitro* и определению циркулирующих маркеров дисфункции эндотелия *in vivo* [2–7], детекция дисфункцио-

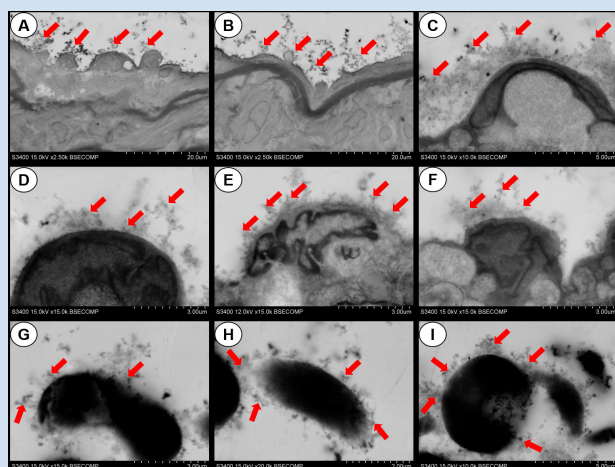


Рисунок 4. Электронно-микроскопическая визуализация эндотелиального и эритроцитарного гликокаликса (обозначен красными стрелками). *A, B* – обзорные фотографии эндотелиального гликокаликса, ветвящегося от апикальной поверхности плазматической мембраны эндотелиальных клеток; *C, D, E, F* – фотографии эндотелиального гликокаликса, покрывающего эндотелиальные клетки сплошным слоем (*C*) или ветвящегося от апикальной поверхности плазматической мембраны эндотелиальных клеток (*D, E, F*); *G, H, I* – гликокаликс, образованный ветвящимися нитями от поверхности плазматической мембраны эритроцитов

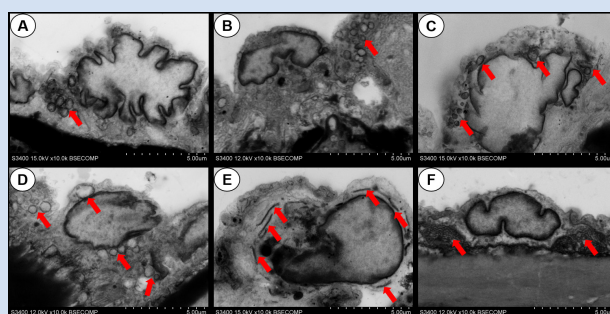


Рисунок 5. Визуализация органелл эндотелиальных клеток. *A, B, C, D* – митохондрии (отмечены красными стрелками) с различным паттерном расположения внутри клетки: компактно возле ядра (*A*), компактно на удалении от ядра (*B*), равномерно распределенные в апикальной и латеральных отделах цитоплазмы клетки (*C*), равномерно распределенные по всему цитозоллю (*D*); *E* – цистерны пластинчатого комплекса (отмечены красными стрелками), равномерно распределенные вокруг ядра и по цитозоллю клетки; *F* – эндоплазматическая сеть (отмечена красными стрелками), расположенная по обеим сторонам от ядра и примыкающая к базальной мембране

Figure 5. Electron microscopic visualization of endothelial cell organelles. *A, B, C, D* – Mitochondria (indicated by red arrows) with various patterns of distribution within the cell: compact near the nucleus (*A*), compact away from the nucleus (*B*), evenly distributed along the apical and lateral surfaces of the cell (*C*), evenly distributed throughout the cytosol (*D*); *E* – Cisternae of the Golgi complex (indicated by red arrows), evenly distributed around the nucleus and throughout the cytosol of the cell; *F* – Endoplasmic reticulum (indicated by red arrows), located on both sides of the nucleus and adjacent to the basement membrane

нальных эндотелиальных клеток *in situ* (то есть непосредственно в кровеносных или лимфатических сосудах) остается достаточно затруднительной. Классическое гистологическое исследование (к примеру, окрашивание гематоксилином и эозином) позволяет адекватно оценить форму клеточного ядра и ориентацию эндотелиальной клетки вдоль направления потока крови, но не позволяет проанализировать состояние цитоплазмы и плазматической мембраны. Иммуногистохимические маркеры позволяют надежно дифференцировать эндотелиальные клетки от остальных клеточных популяций, оценить форму ядра эндотелиальных клеток и их ориентацию вдоль направления потока крови, но их чувствительность и специфичность в отношении нормальных и дисфункциональных клеток остается неясной. Альтернативным решением проблемы морфологической детекции дисфункциональных эндотелиальных клеток является электронно-микроскопическое исследование цельных сегментов

сосудов в обратно-рассеянных электронах после их окрашивания растворами тяжелых металлов, заливки в эпоксидную смолу, шлифовки и полировки (так называемый метод EM-BSEM) [15–17]. Особенностью данного метода является возможность визуализации сосуда по всему диаметру и толщине (от внутренней оболочки до околососудистой жировой ткани) с получением микрофотографий высокого разрешения (до 50 000) [15–17]. В отношении морфологической диагностики электронная микроскопия является «золотым стандартом», позволяя визуализировать ядро, плазматические мембраны, органеллы, гликокаликс и внеклеточный матрикс (в том числе базальную мембрану) на ультраструктурном уровне [15–17]. Кроме того, именно при использовании электронной микроскопии становится возможным полноценное изучение гетерогенности эндотелиальных клеток различных органов, сосудов и сегментов одного и того же сосуда, поскольку фенотип различных эндотелиальных клеток может существенно различаться даже в одинаковых физиологических условиях [18, 19].

Гетерогенность фенотипа эндотелиальных клеток приобретает особую актуальность в контексте дисфункции эндотелия, которая в зависимости от активируемых в эндотелии сигнальных путей и функциональных последствий подразделяется на провоспалительную, протромботическую и вазоспастическую [2]. Способность эндотелиальных клеток противостоять развитию дисфункции при воздействии различных триггеров (компонентов бактериальной стенки, вирусных белков, провоспалительных цитокинов, избыточной концентрации глюкозы, жирных кислот, мочевины и иных продуктов метаболизма, кальципротеиновых частиц, генотоксических агентов и др.) обозначается термином *endothelial resilience*, что можно перевести как устойчивость эндотелия [20, 21]. Результаты нашего исследования показывают, что даже соседние эндотелиальные клетки имеют совершенно различную устойчивость к развитию дисфункции, в результате чего одна клетка может иметь нормальный, а другая – дисфункциональный фенотип. В сочетании с гемодинамическими параметрами, в частности с напряжением сдвига и циклическим растяжением, именно различная устойчивость к различным триггерам дисфункции эндотелия и определяет гетерогенность эндотелиальных клеток внутри одного дифферона [20, 21]. В пользу этой концепции свидетельствует конкордантность молекулярных и электронно-микроскопических данных, поскольку нарушения сигнальных путей механотрансдукции эндотелиальных клеток являются одним из наиболее частых последствий моделирования провоспалительной дисфункции эндотелия [2, 22–24], а сохранность ориентации эндотелиальных клеток вдоль направления потока крови была обяза-

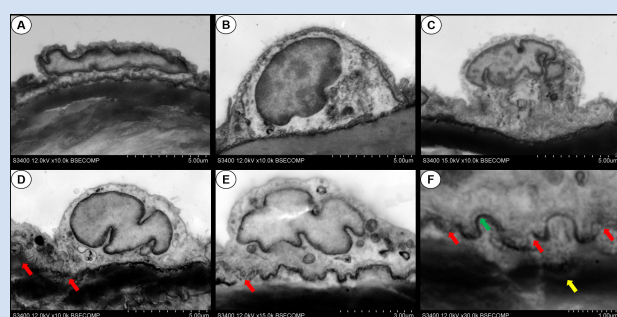


Рисунок 6. Электронно-микроскопическая визуализация эндотелиальных клеток в различном состоянии в сочетании с интактной или поврежденной базальной мембраной. *A* – нормальная эндотелиальная клетка с продолговатым ядром, вытянутая вдоль направления потока и распластанная на четко очерченной интактной базальной мембране; *B* – нормальная эндотелиальная клетка полукруглой формы с бобовидным ядром, прикрепленная к интактной базальной мембране; *C* – дисфункциональная эндотелиальная клетка с полиморфным ядром и нарушенным прикреплением к интактной базальной мембране; *D* – нормальная эндотелиальная клетка с полиморфным ядром, прикрепленная к частично деградировавшей с одной из сторон базальной мембране (красная стрелка); *E* – нормальная эндотелиальная клетка с полиморфным ядром, прикрепленная к базальной мембране с видимым дефектом (локальным нарушением целостности, красная стрелка); *F* – визуализация базальной мембраны (зеленая стрелка), ее дефектов (красная стрелка) и внутренней эластической мембраны (желтая стрелка)

Figure 6. Electron microscopic visualization of endothelial cells in various states combined with intact or damaged basement membranes. *A* – Normal endothelial cell with an elongated nucleus, stretched along the direction of flow and flattened on a clearly defined intact basement membrane; *B* – Normal semicircular endothelial cell with a kidney-shaped nucleus, attached to an intact basement membrane; *C* – Dysfunctional endothelial cell with a polymorphic nucleus and disrupted attachment to an intact basement membrane; *D* – Normal endothelial cell with a polymorphic nucleus, attached to a partially degraded basement membrane on one side (red arrow); *E* – Normal endothelial cell with a polymorphic nucleus, attached to a basement membrane with a visible defect (local disruption of integrity, red arrow); *F* – Visualization of the basement membrane (green arrow), its defects (red arrow), and the internal elastic membrane (yellow arrow)

тельным признаком нормального эндотелиального фенотипа.

Таким образом, адекватная механотрансдукция эндотелиальных клеток является наиболее чувствительным признаком, отличающим нормальную эндотелиальную клетку от дисфункциональной. Тем не менее дисфункциональные эндотелиальные клетки также могут сохранять ориентацию вдоль направления потока крови, однако иметь целый ряд выраженных структурных признаков: множественные вакуоли и даже крупные пустоты в цитоплазме, дефекты плазматической мембраны, нарушение контакта с базальной мембраной (при интактности самой базальной мембраны) и сниженную контрастность между ядром и цитоплазмой. Данные признаки соответствуют ассоциированному со старением секреторному фенотипу (senescence-associated secretory phenotype), который сопровождается повышенным выделением провоспалительных цитокинов, в частности интерлейкина-6, интерлейкина-8 и MCP-1/CCL2 [2, 25]. Подводя итог вышесказанному, можно предположить, что нормальная эндотелиальная клетка всегда сохраняет ориентацию вдоль направления потока крови, но не всякая клетка с адекватной механотрансдукцией является нормальной.

Достаточно интересным является неизменное или во всяком случае малоизмененное состояние органелл в дисфункциональных эндотелиальных клетках, а также отсутствие связи между повреждениями базальной мембраны и дисфункциональным фенотипом эндотелиальных клеток. Отсутствие видимых изменений органелл может быть объяснено недостаточным разрешением при электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах в сравнении с анализом ультратонких срезов при трансмиссионной электронной микроскопии. В отношении базальной мембраны следует отметить, что даже при выраженной провоспалительной дисфункции эндотелиальных клеток в культуре нарушения баланса между протеазами и их ингибиторами не наблюдается, поэтому лизис базальной мембраны с большой вероятностью не определяется собственно дисфункцией эндотелия. С учетом важности гликокаликса для эндотелиальной механотрансдукции определенные перспективы в качестве чувствительных и специфичных циркулирующих маркеров имеют компоненты гликокаликса (в частности синдекан-1), хотя их специфичность для эндотелиального гликокаликса в сравнении с эритроцитарным вызывает вопросы. К сожалению, даже отсутствие резки на микротоме или ультрамикротоме не позволяет стабильно сохранять целостность эндотелиального гликокаликса в достаточной степени для объективного анализа, хотя отдельные образцы характеризуются его высокой сохранностью. Именно этим объясняется вариабельность толщины эндотелиального гликокаликса в различных исследованиях [22–24].

Таким образом, чувствительные и специфичные электронно-микроскопические признаки дисфункционального эндотелия относятся исключительно к самой эндотелиальной клетке, а не к ее базальной мембране или гликокаликсу.

Заключение

На основании электронно-микроскопического анализа целесообразно выделить три основных морфотипа нормальных эндотелиальных клеток: 1) вытянутая вдоль направления потока крови форма и продолговатое ядро; 2) полукруглая форма и овальное, круглое, бобовидное или полиморфное ядро с менее выраженной, но ясно видимой ориентацией вдоль направления потока крови; 3) крупное ядро и еще менее выраженная, но видимая ориентация вдоль направления потока крови. При этом базальная мембрана нормальных эндотелиальных клеток часто содержала различные дефекты, в том числе микроразрывы. Таким образом, основным признаком нормальных эндотелиальных клеток является их ориентация вдоль направления потока крови при отсутствии иных признаков дисфункциональных эндотелиальных клеток. К таким признакам (и их сочетанию) представляется справедливым отнести приобретение шарообразной формы и потерю ориентации клетки вдоль направления потока крови, вакуолизацию цитоплазмы, нарушение целостности плазматической мембраны, снижение контрастности между ядром и цитоплазмой и частичное открепление эндотелиальной клетки от базальной мембраны. При этом сама базальная мембрана дисфункциональных эндотелиальных клеток, а также структура их органелл часто являются неизменными.

Конфликт интересов

В.А. Кошелев заявляет об отсутствии конфликта интересов. Л.А. Богданов заявляет об отсутствии конфликта интересов. Р.А. Мухамадияров заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.И. Лазебная заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Д. Степанов заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Г. Кутихин входит в редакционную коллегию журнала «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний».

Финансирование

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 24-75-10057 «Идентификация клеточных маркеров дисфункции эндотелия», <https://rscf.ru/project/24-75-10057/>.

Funding

This research was funded by the Russian Science Foundation, grant number 24-75-10057 “Cellular markers of endothelial dysfunction” (Leo Bogdanov), <https://rscf.ru/project/24-75-10057/>.

Информация об авторах

Коселев Владислав Александрович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-6840-1116

Богданов Лев Александрович, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-4124-2316

Мухамадияров Ринат Авахдиевич, кандидат биологических наук старший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-5558-3229

Лазебная Анастасия Ивановна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1867-6354

Степанов Александр Денисович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0009-7947-5917

Кутихин Антон Геннадьевич, доктор медицинских наук заведующий отделом экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Author Information Form

Koshelev Vladislav A., Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-6840-1116

Bogdanov Leo A., PhD, Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-4124-2316

Mukhamadiyarov Rinat A., PhD, Senior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-5558-3229

Lazebnaya Anastasia I., Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1867-6354

Stepanov Alexander D., Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0009-0009-7947-5917

Kutikhin Anton G., PhD, Head of the Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Вклад авторов в статью

КВА – получение данных исследования, коррективировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

БЛА – вклад в дизайн исследования, анализ данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

МРА – интерпретация данных исследования, коррективировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ЛАИ – анализ и интерпретация данных исследования, коррективировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

САД – анализ и интерпретация данных исследования, коррективировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КАГ – вклад в дизайн исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

KVA – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

BLA – contribution to the design of the study, data analysis, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

MRA – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

LAI – data analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

SAD – data analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

KAG – contribution to the design of the study, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cahill P.A., Redmond E.M. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016;248:97-109. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.
2. Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Velikanova E.A., Sinitsky M.Y., Sinitskaya A.V., Markova V.E. Endothelial Dysfunction in the Context of Blood-Brain Barrier Modeling. *J Evol Biochem Physiol*. 2022;58(3):781-806. doi: 10.1134/S0022093022030139.
3. Gimbrone M.A.Jr., García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
4. Ungvari Z., Tarantini S., Kiss T., Wren J.D., Giles C.B., Griffin C.T., Murfee W.L., Pacher P., Csiszar A. Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(9):555-565. doi: 10.1038/s41569-018-0030-z.
5. Bonaventura A., Vecchié A., Dagna L., Martinod K., Dixon D.L., Van Tassell B.W., Dentali F., Montecucco F., Massberg S., Levi M., Abbate A. Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(5):319-329. doi: 10.1038/s41577-021-00536-9.
6. Baaten C.C.F.M.J., Vondenhoff S., Noels H. Endothelial Cell Dysfunction and Increased Cardiovascular Risk in Patients With Chronic Kidney Disease. *Circ Res*. 2023;132(8):970-992. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.123.321752.
7. Segers V.F.M., Bringmans T., De Keulenaer G.W. Endothelial dysfunction at the cellular level in three dimensions: severity, acuteness, and distribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2023;325(2):H398-H413. doi: 10.1152/ajpheart.00256.2023.
8. Kozlov S., Okhota S., Avtaeva Y., Melnikov I., Matroze E., Gabbasov Z. Von Willebrand factor in diagnostics and treatment of cardiovascular disease: Recent advances and prospects. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:1038030. doi: 10.3389/fcvm.2022.1038030.
9. Goncharov N.V., Popova P.I., Kudryavtsev I.V., Golovkin A.S., Savitskaya I.V., Avdonin P.P., Korf E.A., Voitenko N.G., Belinskaia D.A., Serebryakova M.K., Matveeva N.V., Gerlakh N.O., Anikievich N.E., Gubatenko M.A., Dobrylko I.A., Trulioff A.S., Aquino A.D., Jenkins R.O., Avdonin P.V. Immunological Profile and Markers of Endothelial Dysfunction in Elderly Patients with Cognitive Impairments. *Int J Mol Sci*. 2024;25(3):1888. doi: 10.3390/ijms25031888.
10. Alexander Y., Osto E., Schmidt-Trucksäss A., Shechter M., Trifunovic D., Duncker D.J., Aboyans V., Bäck M., Badimon L., Cosentino F., De Carlo M., Dorobantu M., Harrison D.G., Guzik T.J., Hoefer I., Morris P.D., Norata G.D., Suades R., Taddei S., Vilahur G., Waltenberger J., Weber C., Wilkinson F., Bochaton-Piallat M.L., Evans P.C. Endothelial function in cardiovascular medicine: a consensus paper of the European Society of Cardiology Working Groups on Atherosclerosis and Vascular Biology, Aorta and Peripheral Vascular Diseases, Coronary Pathophysiology and Microcirculation, and Thrombosis. *Cardiovasc Res*. 2021;117(1):29-42. doi: 10.1093/cvr/cvaa085.
11. Janaszak-Jasiecka A., Siekierzycka A., Płoska A., Dobrucki I.T., Kalinowski L. Endothelial Dysfunction Driven by Hypoxia-The Influence of Oxygen Deficiency on NO Bioavailability. *Biomolecules*. 2021;11(7):982. doi: 10.3390/biom11070982.
12. Dowsett L., Higgins E., Alanazi S., Alshuwayr N.A., Leiper F.C., Leiper J. ADMA: A Key Player in the Relationship between Vascular Dysfunction and Inflammation in Atherosclerosis. *J Clin Med*. 2020;9(9):3026. doi: 10.3390/jcm9093026.
13. Evans P.C., Rainger G.E., Mason J.C., Guzik T.J., Osto E., Stamataki Z., Neil D., Hoefer I.E., Fragiadaki M., Waltenberger J., Weber C., Bochaton-Piallat M.L., Bäck M. Endothelial dysfunction in COVID-19: a position paper of the ESC Working Group for Atherosclerosis and Vascular Biology, and the ESC Council of Basic Cardiovascular Science. *Cardiovasc Res*. 2020;116(14):2177-2184. doi: 10.1093/cvr/cvaa230.
14. Feenstra L., Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Buikema H., Zeper L.W., Bourgonje A.R., Krenning G., Hillebrands J.L. Calciprotein Particles Induce Endothelial Dysfunction by Impairing Endothelial Nitric Oxide Metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2023;43(3):443-455. doi: 10.1161/ATVBAHA.122.318420.
15. Kostyunin A., Glushkova T., Velikanova E., Mukhamadiyarov R., Bogdanov L., Akentyeva T., Ovcharenko E., Evtushenko A., Shishkova D., Markova Y., Kutikhin A. Embedding and Backscattered Scanning Electron Microscopy (EM-BSEM) Is Preferential over Immunophenotyping in Relation to Bioprosthetic Heart Valves. *Int J Mol Sci*. 2023;24(17):13602. doi: 10.3390/ijms241713602.
16. Bogdanov L., Shishkova D., Mukhamadiyarov R., Velikanova E., Tsepokina A., Terekhov A., Koshelev V., Kanonykina A., Shabaev A., Frolov A., Zagorodnikov N., Kutikhin A. Excessive Adventitial and Perivascular Vascularisation Correlates with Vascular Inflammation and Intimal Hyperplasia. *Int J Mol Sci*. 2022;23(20):12156. doi: 10.3390/ijms232012156.
17. Mukhamadiyarov R.A., Bogdanov L.A., Glushkova T.V., Shishkova D.K., Kostyunin A.E., Koshelev V.A., Shabaev A.R., Frolov A.V., Stasev A.N., Lyapin A.A., Kutikhin A.G. 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.
18. Trimm E., Red-Horse K. Vascular endothelial cell development and diversity. *Nat Rev Cardiol*. 2023;20(3):197-210. doi: 10.1038/s41569-022-00770-1.
19. Ricard N., Bailly S., Guignabert C., Simons M. The quiescent endothelium: signalling pathways regulating organ-specific endothelial normalcy. *Nat Rev Cardiol*. 2021;18(8):565-580. doi: 10.1038/s41569-021-00517-4.
20. Gao Y., Galis Z.S. Exploring the Role of Endothelial Cell Resilience in Cardiovascular Health and Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(1):179-185. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314346.
21. Tombor L.S., Dimmeler S. Why is endothelial resilience key to maintain cardiac health? *Basic Res Cardiol*. 2022;117(1):35. doi: 10.1007/s00395-022-00941-8.
22. McQueen A., Warboys C.M. Mechanosignalling pathways that regulate endothelial barrier function. *Curr Opin Cell Biol*. 2023;84:102213. doi: 10.1016/j.ceb.2023.102213.
23. Hamrangsekachae M., Wen K., Bencherif S.A., Ebong E.E. Atherosclerosis and endothelial mechanotransduction: current knowledge and models for future research. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2023;324(2):C488-C504. doi: 10.1152/ajpcell.00449.2022.
24. Wang X., Shen Y., Shang M., Liu X., Munn L.L. Endothelial mechanobiology in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2023;119(8):1656-1675. doi: 10.1093/cvr/cvad076.
25. Bloom S.I., Islam M.T., Lesniewski L.A., Donato A.J. Mechanisms and consequences of endothelial cell senescence. *Nat Rev Cardiol*. 2023;20(1):38-51. doi: 10.1038/s41569-022-00739-0.

REFERENCES

1. Cahill P.A., Redmond E.M. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016;248:97-109. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.
2. Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Velikanova E.A., Sinitsky M.Y., Sinitskaya A.V., Markova V.E. Endothelial Dysfunction in the Context of Blood-Brain Barrier Modeling.

J Evol Biochem Physiol. 2022;58(3):781-806. doi: 10.1134/S0022093022030139.

3. Gimbrone M.A.Jr., García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):620-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.

4. Ungvari Z., Tarantini S., Kiss T., Wren J.D., Giles C.B., Griffin C.T., Murfee W.L., Pacher P., Csiszar A. Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(9):555-565. doi: 10.1038/s41569-018-0030-z.

5. Bonaventura A., Vecchié A., Dagna L., Martinod K., Dixon D.L., Van Tassell B.W., Dentali F., Montecucco F., Massberg S., Levi M., Abbate A. Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(5):319-329. doi: 10.1038/s41577-021-00536-9.

6. Baaten C.C.F.M.J., Vondenhoff S., Noels H. Endothelial Cell Dysfunction and Increased Cardiovascular Risk in Patients With Chronic Kidney Disease. *Circ Res.* 2023;132(8):970-992. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.123.321752.

7. Segers V.F.M., Bringmans T., De Keulenaer G.W. Endothelial dysfunction at the cellular level in three dimensions: severity, acuteness, and distribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2023;325(2):H398-H413. doi: 10.1152/ajpheart.00256.2023.

8. Kozlov S., Okhota S., Avtaeva Y., Melnikov I., Matroze E., Gabbasov Z. Von Willebrand factor in diagnostics and treatment of cardiovascular disease: Recent advances and prospects. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:1038030. doi: 10.3389/fcvm.2022.1038030.

9. Goncharov N.V., Popova P.I., Kudryavtsev I.V., Golovkin A.S., Savitskaya I.V., Avdonin P.P., Korf E.A., Voitenko N.G., Belinskaia D.A., Serebryakova M.K., Matveeva N.V., Gerlakh N.O., Anikievich N.E., Gubatenko M.A., Dobrylko I.A., Trulioff A.S., Aquino A.D., Jenkins R.O., Avdonin P.V. Immunological Profile and Markers of Endothelial Dysfunction in Elderly Patients with Cognitive Impairments. *Int J Mol Sci.* 2024;25(3):1888. doi: 10.3390/ijms25031888.

10. Alexander Y., Osto E., Schmidt-Trucksäss A., Shechter M., Trifunovic D., Duncker D.J., Aboyans V., Bäck M., Badimon L., Cosentino F., De Carlo M., Dorobantu M., Harrison D.G., Guzik T.J., Hoefer I., Morris P.D., Norata G.D., Suades R., Taddei S., Vilahur G., Waltenberger J., Weber C., Wilkinson F., Bochaton-Piallat M.L., Evans P.C. Endothelial function in cardiovascular medicine: a consensus paper of the European Society of Cardiology Working Groups on Atherosclerosis and Vascular Biology, Aorta and Peripheral Vascular Diseases, Coronary Pathophysiology and Microcirculation, and Thrombosis. *Cardiovasc Res.* 2021;117(1):29-42. doi: 10.1093/cvr/cvaa085.

11. Janaszak-Jasiecka A., Siekierzycka A., Płoska A., Dobrucki I.T., Kalinowski L. Endothelial Dysfunction Driven by Hypoxia-The Influence of Oxygen Deficiency on NO Bioavailability. *Biomolecules.* 2021;11(7):982. doi: 10.3390/biom11070982.

12. Dowsett L., Higgins E., Alanazi S., Alshuwayer N.A., Leiper F.C., Leiper J. ADMA: A Key Player in the Relationship between Vascular Dysfunction and Inflammation in Atherosclerosis. *J Clin Med.* 2020;9(9):3026. doi: 10.3390/jcm9093026.

13. Evans P.C., Rainger G.E., Mason J.C., Guzik T.J., Osto E., Stamataki Z., Neil D., Hoefer I.E., Fragiadaki M.,

Waltenberger J., Weber C., Bochaton-Piallat M.L., Bäck M. Endothelial dysfunction in COVID-19: a position paper of the ESC Working Group for Atherosclerosis and Vascular Biology, and the ESC Council of Basic Cardiovascular Science. *Cardiovasc Res.* 2020;116(14):2177-2184. doi: 10.1093/cvr/cvaa230.

14. Feenstra L., Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Buikema H., Zeper L.W., Bourgonje A.R., Krenning G., Hillebrands J.L. Calciprotein Particles Induce Endothelial Dysfunction by Impairing Endothelial Nitric Oxide Metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2023;43(3):443-455. doi: 10.1161/ATVBAHA.122.318420.

15. Kostyunin A., Glushkova T., Velikanova E., Mukhamadiyarov R., Bogdanov L., Akentyeva T., Ovcharenko E., Evtushenko A., Shishkova D., Markova Y., Kutikhin A. Embedding and Backscattered Scanning Electron Microscopy (EM-BSEM) Is Preferential over Immunophenotyping in Relation to Bioprosthetic Heart Valves. *Int J Mol Sci.* 2023;24(17):13602. doi: 10.3390/ijms241713602.

16. Bogdanov L., Shishkova D., Mukhamadiyarov R., Velikanova E., Tsepokina A., Terekhov A., Koshelev V., Kanonykina A., Shabaev A., Frolov A., Zagorodnikov N., Kutikhin A. Excessive Adventitial and Perivascular Vascularisation Correlates with Vascular Inflammation and Intimal Hyperplasia. *Int J Mol Sci.* 2022;23(20):12156. doi: 10.3390/ijms232012156.

17. Mukhamadiyarov R.A., Bogdanov L.A., Glushkova T.V., Shishkova D.K., Kostyunin A.E., Koshelev V.A., Shabaev A.R., Frolov A.V., Stasev A.N., Lyapin A.A., Kutikhin A.G. 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.

18. Trimm E., Red-Horse K. Vascular endothelial cell development and diversity. *Nat Rev Cardiol.* 2023;20(3):197-210. doi: 10.1038/s41569-022-00770-1.

19. Ricard N., Bailly S., Guignabert C., Simons M. The quiescent endothelium: signalling pathways regulating organ-specific endothelial normalcy. *Nat Rev Cardiol.* 2021;18(8):565-580. doi: 10.1038/s41569-021-00517-4.

20. Gao Y., Galis Z.S. Exploring the Role of Endothelial Cell Resilience in Cardiovascular Health and Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(1):179-185. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314346.

21. Tombar L.S., Dimmeler S. Why is endothelial resilience key to maintain cardiac health? *Basic Res Cardiol.* 2022;117(1):35. doi: 10.1007/s00395-022-00941-8.

22. McQueen A., Warboys C.M. Mechanosignalling pathways that regulate endothelial barrier function. *Curr Opin Cell Biol.* 2023;84:102213. doi: 10.1016/j.ceb.2023.102213.

23. Hamrangsekachae M., Wen K., Bencherif S.A., Ebong E.E. Atherosclerosis and endothelial mechanotransduction: current knowledge and models for future research. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2023;324(2):C488-C504. doi: 10.1152/ajpcell.00449.2022.

24. Wang X., Shen Y., Shang M., Liu X., Munn L.L. Endothelial mechanobiology in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2023;119(8):1656-1675. doi: 10.1093/cvr/cvad076.

25. Bloom S.I., Islam M.T., Lesniewski L.A., Donato A.J. Mechanisms and consequences of endothelial cell senescence. *Nat Rev Cardiol.* 2023;20(1):38-51. doi: 10.1038/s41569-022-00739-0.

Для цитирования: Кошелев В.А., Богданов Л.А., Мухамадияров Р.А., Лазебная А.И., Степанов А.Д., Кутихин А.Г. Ультразвуковые признаки нормальных и дисфункциональных эндотелиальных клеток аорты крысы. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2024;13(4): 191-203. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-4-191-203

To cite: Koshelev V.A., Bogdanov L.A., Mukhamadiyarov R.A., Lazebnaya A.I., Stepanov A.D., Kutikhin A.G. Electron microscopy signs of normal and dysfunctional rat aortic endothelium. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2024;13(4): 191-203. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-4-191-203