

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА  
В АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШКАХ КАРОТИДНОГО СИНУСА  
НА ПОЗДНИХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ АТЕРОСКЛЕРОЗА

© 2022 г. А. Н. Евдокименко<sup>1</sup>\*, К. Н. Куличенкова<sup>1</sup>,  
Т. С. Гулевская<sup>1</sup>, М. М. Танашиян<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научный центр неврологии, Москва, Россия

\*E-mail: evdokimenko@neurology.ru

Поступила в редакцию 31.01.2022 г.

После доработки 07.04.2022 г.

Принята к публикации 07.04.2022 г.

Повышение неоваскуляризации атеросклеротической бляшки способствует дестабилизации ее структуры, прогрессированию атеросклероза и повышению риска осложнений, включая инфаркт миокарда и ишемический инсульт. Целью исследования стала комплексная оценка экспрессии разнонаправленных регуляторных факторов ангиогенеза в атеросклеротической бляшке каротидного синуса. В исследование включено 33 пациента с атеросклеротическим стенозом каротидного синуса  $\geq 60\%$ , которым была выполнена каротидная эндартерэктомия с последующим патоморфологическим исследованием удаленных атеросклеротических бляшек на всем их протяжении. Оценена структура бляшки, плотность расположения микрососудов в  $1 \text{ см}^2$  бляшки, а также экспрессия сосудистых эндотелиальных факторов роста (VEGFA, VEGFB, VEGFC и VEGFD) и их рецепторов (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), FGF2, PDGF-B и TSP-1 с последующим корреляционным анализом полученных результатов. По результатам гистологического исследования 13 бляшек отнесены к атероматозным (тип Va), 12 – к осложненным (с изъязвлением покрышки и/или массивным кровоизлиянием в бляшку, тип VI), 6 – к кальцинозным (тип Vb) и 2 – к фиброзным (тип Vc). Новообразованные сосуды выявлены во всех бляшках (267.5 сосудов/ $1 \text{ см}^2$  [Q1 – 140.9; Q3 – 534.8]). Большинство новообразованных сосудов имели высокопролиферабельный фенотип – нарушенная целостность эндотелия; отсутствие слоя перипитов; периваскулярные кровоизлияния. Обнаружена гиперэкспрессия VEGFD, значимо преобладавшая над прочими оцененными факторами ( $p < 0.001$ ), и выраженная экспрессия VEGFA, VEGFR2, VEGFR3, FGF2 и PDGF-B. Иммунореактивность к VEGFB, VEGFC и TSP-1 была выражена в наименьшей степени, VEGFR1 выявлялся в следовых количествах. Количество микрососудов в бляшке значимо коррелировало с экспрессией VEGFA, VEGFD, FGF2, PDGF-B и VEGFR2 ( $p < 0.01$ ). Связь прочих структурных компонентов бляшки с содержанием в ней ангиогенных факторов отсутствовала. Таким образом, в атеросклеротических бляшках каротидного синуса на поздних стадиях развития атеросклероза продемонстрирован резко выраженный проангиогенный профиль экспрессии различных регуляторных факторов ангиогенеза с несостоятельностью механизма стабилизации новообразованной сосудистой сети.

*Ключевые слова:* атеросклеротическая бляшка каротидного синуса, регуляция ангиогенеза, VEGF, VEGFR, FGF2, PDGF-B, TSP-1

DOI: 10.31857/S0869813922050041

Атеросклероз – хроническое, медленно прогрессирующее заболевание, ассоциированное с дисфункцией эндотелия; адгезией, активацией и миграцией моноцитов/макрофагов; окислительным стрессом; накоплением липидов в интиме; синтезом внеклеточного матрикса; миграцией и пролиферацией гладкомышечных клеток (ГМК) с формированием их секреторного фенотипа и пр. [1]. В процессе атерогенеза в бляшке создаются локальные условия (гипоксия, воспаление, окислительный стресс и др.), которые активируют ангиогенные факторы, запускающие образование сосудов преимущественно из предсуществующих *vasa vasorum* адвентиции [2]. Впервые новообразованные сосуды в атеросклеротической бляшке были обнаружены в 1936 г. [3], и в настоящее время повышение неоваскуляризации ассоциируется с ускорением прогрессирования атеросклероза, дестабилизацией структуры бляшки и повышением риска кардиальных и цереброваскулярных осложнений, включая инфаркт миокарда и ишемический инсульт [4–6].

Ангиогенез в бляшке исходно развивается как компенсаторная реакция, направленная на восстановление оксигенации и регенерацию интимы [3], и наблюдается уже на самых ранних его стадиях (стадия жировых пятен и полосок и ранее), что было продемонстрировано в ряде морфологических исследований [7]. Тем не менее, различные стимулы, в том числе гипоксия, воспаление, липопротеины низкой плотности и окислительный стресс, могут поддерживать длительный ангиогенный ответ, который приобретает патологический характер в связи с отсутствием фазы разрешения и стабилизации новообразованных сосудов и приводит к разрастанию “незрелой”, высокопроницаемой сосудистой сети [1].

Высокопроницаемый фенотип новообразованных сосудов в бляшках связан с многочисленными очагами нарушения целостности эндотелия, неполноценными плотными контактами между эндотелиальными клетками и отсутствием слоя перитицитов [4]. В недавно проведенных морфологических исследованиях продемонстрировано, что тонкостенные сосуды являются не только причиной кровоизлияний в бляшку, дополнительным источником поступления в бляшку липопротеидов, белков плазмы и воспалительных клеток, но также и источником эндотелиальных клеток-предшественников, принимающих активное участие в увеличении площади новообразованной “незрелой” сосудистой сети [8].

Ангиогенез – это динамический процесс, регулируемый неустойчивым равновесием между ангиогенными и ангиостатическими факторами, который в конечном итоге приводит к увеличению площади, стабилизации или регрессу сосудистой сети [1]. В многочисленных исследованиях определен широкий спектр регуляторов ангиогенеза, включая его стимуляторы, ингибиторы и стабилизаторы сосудистой сети [3], среди которых наиболее изученными являются сосудистый эндотелиальный фактор роста А (VEGFA), основной фактор роста фибробластов (FGF2), фактор роста тромбоцитов бета (PDGF-B) и тромбоспондин-1 (TSP-1). Большинство работ по изучению ангиогенеза посвящено ключевому, по общепринятому мнению, регуляторному пути VEGFA/VEGFR2, тогда как прочим членам семейства сосудистых эндотелиальных факторов роста (в частности, VEGFB, VEGFC и VEGFD) и их рецепторам (VEGFR1 и VEGFR3) до недавнего времени отводилась незначительная роль в регуляции ангиогенеза. Тем не менее, в последние годы стало появляться все больше работ, свидетельствующих об их активном участии в ангиогенезе, а также о сложной, во многом слабо изученной системе взаимодействий как между сосудистыми эндотелиальными факторами роста и их рецепторами, так и между ними и прочими регуляторами ангиогенеза, а именно FGF2, PDGF-B и TSP-1 [6, 9–11]. Кроме того, описан ряд компенсаторных механизмов, направленных на восстановление ангиогенеза в случае блокады одного из регуляторных путей [12], вследствие чего многие авторы указывают на необходимость комплексного изучения разнонаправленных регуляторных путей.

Несмотря на то, что пусковые факторы и механизмы регуляции ангиогенеза в целом являются универсальными вне зависимости от запустившего его патологического процесса, значительная роль в координации разнонаправленных путей принадлежит комплексу локальных, специфичных для каждого заболевания/состояния, факторов [1]. Большинство проведенных исследований касалось роли и регуляции ангиогенеза при онкологических заболеваниях и включало оценку одного, значительно реже двух из наиболее широко изученных регуляторных факторов. В то же время проблеме регуляции ангиогенеза в атеросклеротической бляшке посвящено значительно меньше работ. Исследования проводились преимущественно на клеточных и животных моделях атеросклероза, не способных в полной мере воспроизвести сложный и многокомпонентный процесс. В особенности это касается поздних стадий развития атеросклероза, а также изъязвления покрышки и неоваскуляризации бляшки, которые до недавнего времени были слабо воспроизводимы. У животных неоваскуляризация бляшки оценивалась преимущественно косвенно, в адвентиции, в связи с редкой встречаемостью сосудов в самой бляшке в большинстве классических животных моделей атеросклероза (ApoE<sup>-/-</sup> и LDLR<sup>-/-</sup>) [13]. Кроме того, комплексные исследования с одновременной оценкой разнонаправленных звеньев регуляции ангиогенеза в атеросклеротической бляшке человека отсутствуют, что в совокупности и определило цель данного исследования.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включено 33 пациента (22 мужчины и 11 женщин; средний возраст  $65 \pm 8.6$  лет) с атеростенозом каротидного синуса (КС)  $\geq 60\%$  ( $84\% \pm 9\%$ ) по данным дооперационного дуплексного сканирования ветвей дуги аорты, которым была выполнена операция каротидной эндартерэктомии с последующим патоморфологическим исследованием удаленных атеросклеротических бляшек на всем их протяжении. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствовали этическим стандартам Национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Бляшки в зависимости от длины разрезали на 4–9 поперечных блоков толщиной 0.3 см, которые фиксировали в 10%-ном забуференном растворе формалина по стандартной гистологической методике и заливали в парафин. С каждого парафинового блока делали серийные срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, по методам ван Гизона и Вейгерта для оценки структуры бляшки и выявления коллагеновых и эластических волокон соответственно, а также иммуногистохимически с использованием антител к CD34 (выявление кровеносных сосудов), CD68 (оценка общей макрофагальной реакции), сосудистым эндотелиальным факторам роста (VEGFA, VEGFB, VEGFC и VEGFD) и их рецепторам (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), FGF2, PDGF-B и TSP-1.

Для визуализации иммунопероксидазной реакции использовали систему детекции Ultravision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией следующим образом. Срезы депарафинировали, дегидратировали в ряду спиртов нисходящей концентрации, промывали в дистиллированной воде, обрабатывали раствором UltraVision Peroxide Block (Thermo Fisher Scientific, США) для инактивации тканевых пероксидаз, после чего демаскировали антиген в цитратном буфере с pH 6 (Abcam, США) на водяной бане при температуре 80°C в течение 20 мин. После остывания раствора (около 30 мин) препараты выдерживали в трис-буферном солевом растворе (TBS) с добавлением 0.1% раствора Triton x100 (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин, блокировали неспецифическое

**Таблица 1.** Подробная информация об использованных первичных антителах и условиях иммуногистохимической реакции

Антиген	Первичное антитело				
	Клон	Вид-хозяин	Производитель/ каталожный номер	Разведение	Время и условия инкубации
VEGF-A	VG-1	Мышь	Abcam, США/ab1316	1 : 200	4°C, в течение ночи
VEGF-B	J14-I	Мышь	Santa Cruz Biotechnology, США/sc-80442	1 : 50	4°C, в течение ночи
VEGF-C	MM0006-2 E65	Мышь	Santa Cruz Biotechnology, США/sc-101583	1 : 50	4°C, в течение ночи
VEGF-D	EPR8457	Кролик	Abcam, США/ab 155288	1 : 300	25°C, 20 мин
VEGFR1	D-2	Мышь	Santa Cruz Biotechnology, США/sc-271789	1 : 200	4°C, в течение ночи
VEGFR2	A-3	Мышь	Santa Cruz Biotechnology, США/sc-6251	1 : 50	4°C, в течение ночи
VEGFR3	D-6	Мышь	Santa Cruz Biotechnology, США/sc-28297	1 : 200	4°C, в течение ночи
FGF2	3D9	Мышь	GeneTex, США/GTX84502	1 : 50	25°C, на шейкере, 60 мин
TSP-1	3F357	Мышь	Santa Cruz Biotechnology, США/sc-73158	1 : 100	4°C, в течение ночи
PDGF-B	—	Кролик	GeneTex, США/GTX54575	1 : 200	25°C, на шейкере, 60 мин
CD34	QBEnd/10	Мышь	ThermoScientific, США/MS-363-P	1 : 200	4°C, в течение ночи
CD68	Кр-1	Мышь	CellMarque, США/188M-96	1 : 200	25°C, 30 мин

связывание раствором UltraVision Protein Block (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали срезы с раствором антител во влажной камере. Разведения антител, время и условия инкубации представлены в табл. 1.

После инкубации с антителами препараты промывали раствором TBST (трис-буфер с NaCl и Твин 20), помещали в раствор усилителя первичных антител Primary Antibody Amplifier Quanto (Thermo Fisher Scientific, США) на 10 мин, повторно промывали TBST, выдерживали 10 мин в конъюгированной с полимером пероксидазе хрена HRP polymer Quanto (Thermo Fisher Scientific, США), промывали в дистиллированной воде, окрашивали в течение 5 мин 3-3-диаминобензидином (DAB) в составе приготовленной согласно инструкции смеси DAB Quanto Substrate и DAB Quanto Chromogen (Thermo Fisher Scientific, США), после чего докрашивали гематоксилином. В качестве отрицательного контроля проводилась иммуногистохимическая реакция без первичных антител.

Окрашенные срезы переводили в цифровую форму с помощью сканера гистологических препаратов Panoramic MIDI II (3DHISTECH Ltd., Венгрия) при 400-кратном увеличении изображения и анализировали в программе CaseViewer (3DHISTECH Ltd., Венгрия). Оценивали объемную долю атероматоза (%), объемную долю кальцификатов (%), степень выраженности в бляшке пылевидного обызвествления (включая мелкие кальцификаты), свежих и организованных кровоизлияний, а также макрофагальной реакции.

Степень выраженности пылевидного обызвествления и кровоизлияний оценивали полуколичественно по 5-бальной шкале: 0 — компонент отсутствует, 1 — компонент присутствует в следовых количествах, 2 — компонент занимает до 25% площади среза, 3 — от 25 до 50% площади среза, 4 — более 50% площади среза.

Макрофагальную реакцию, а также экспрессию ангиогенных факторов и их рецепторов в бляшке также оценивали полуколичественно по 5-бальной шкале: 0 — отсутствие экспрессии или отдельные иммунореактивные клетки; 1 — единичные небольшие скопления иммунореактивных клеток; 2 — скопления иммунореактив-



**Таблица 2.** Характеристика структурных компонентов атеросклеротических бляшек каротидного синуса ( $n = 33$ )

№	Наименование компонента	№ бляшек, в которых компонент выявлен	% бляшек, в которых компонент выявлен	Me [Q1; Q3]
1	Атероматоз, % площади бляшки	31	94	27.6 [8.3; 38.5]
2	Очаги пылевидного обызвествления	30	91	НП
3	Кальцификаты различного размера, % площади бляшки	28	85	5.6 [2.5; 13.1]
4	Свежее/организующееся кровоизлияние	17	52	НП
5	Организованные кровоизлияния (скопления гемосидерина, сидерофагов)	19	58	НП
6	Изъязвление покрышки	7	21	НП
7	Неоваскуляризация, количество CD34 <sup>+</sup> сосудов в 1 см <sup>2</sup> бляшки	33	100	267.5 [140.9; 534.8]

НП – не применимо.

ных клеток занимают в совокупности до 15% площади среза; 3 – скопления иммунореактивных клеток занимают в совокупности от 15 до 30% площади среза; 4 – скопления иммунореактивных клеток занимают в совокупности более 30% площади среза. Интенсивность экспрессии маркеров оценивали полуколичественно: + слабая экспрессия; ++ умеренная экспрессия; +++ выраженная экспрессия.

С учетом крайне неравномерного расположения сосудов в бляшке, количество новообразованных сосудов (CD34<sup>+</sup>) анализировали во всех поперечных срезах бляшки и рассчитывали усредненную величину “количество сосудов в 1 см<sup>2</sup> бляшки” (сумма всех сосудов во всех срезах, разделенная на сумму площадей всех срезов в см<sup>2</sup>).

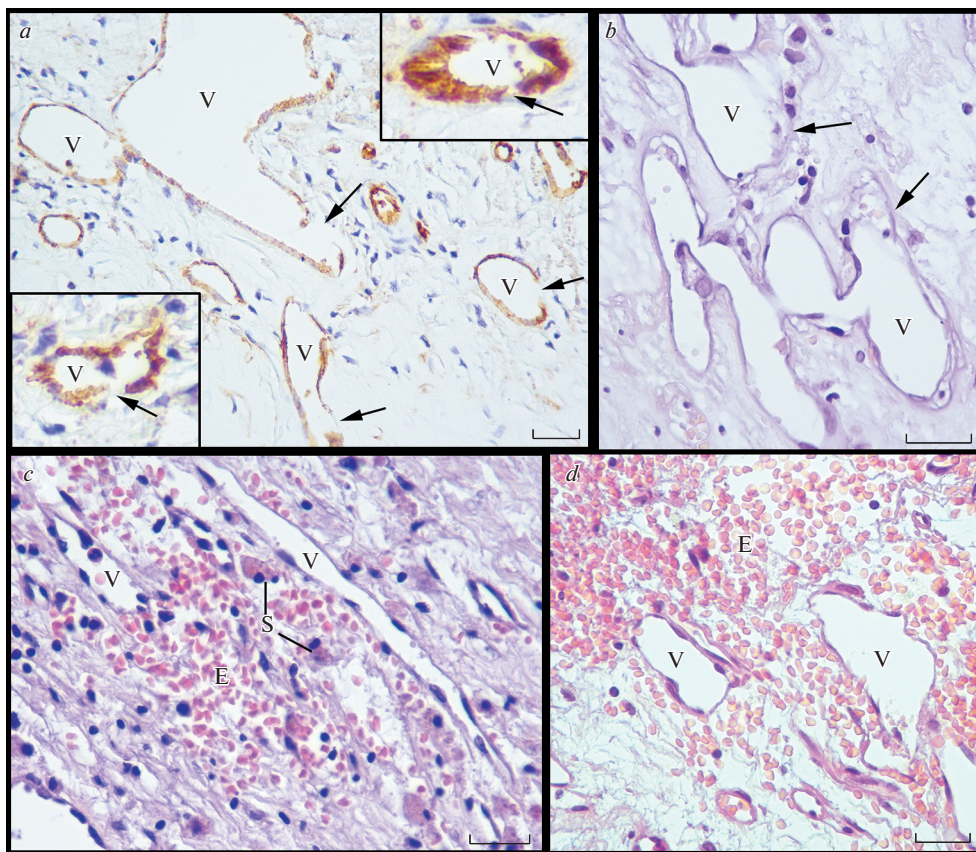
Статистическую обработку проводили в программе Statistica (StatSoft Inc., США) версии 13.3. Для выявления различий между независимыми группами применяли непараметрический критерий Манна–Уитни, анализа парных измерений – критерий Вилкоксона, зависимости – коэффициент корреляции Спирмена. Результаты статистического анализа считали значимыми при уровне  $p < 0.05$ . Результаты представлены в виде медианы [квартиль 1; квартиль 3] (Me [Q1; Q3]).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проанализирована структура 33 атеросклеротических бляшек. Результаты гистологического исследования бляшек представлены в табл. 2. В соответствии с международной классификацией [14], 13 бляшек отнесено к типу V (атероматозные бляшки), 12 – к типу VI (осложненные атеросклеротические поражения с изъязвлением покрышки и/или массивным кровоизлиянием в бляшку), 6 – к типу Vb или VII (кальцинозные бляшки) и 2 – к типу Vc или VIII (фиброзные бляшки).

Новообразованные сосуды обнаружены во всех бляшках. Количество сосудов варьировало в широких пределах, составив от 15 до 1320 в 1см<sup>2</sup>. Большинство из них имели незрелую структуру – тонкую стенку, представленную только слоем эндотелиальных клеток (ЭК), при этом слой перицитов, как правило, отсутствовал; целостность эндотелиального слоя во многих случаях была нарушена, между эндотелиоцитами наблюдались щели; отмечались признаки нарушения проницаемости – в 73% бляшек выявлены периваскулярные скопления эритроцитов, сидерофагов и/или глыбок гемосидерина (рис. 1).

Оценена экспрессия 4-х классических стимуляторов ангиогенеза – сосудистых эндотелиальных факторов роста (VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD) и рецепторов к ним (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), альтернативного активатора ангиогенеза



**Рис. 1.** Новообразованные сосуды (V) бляшки каротидного синуса человека с участками нарушения целостности эндотелиального слоя (указаны стрелками) и периваскулярными кровоизлияниями (скопления эритроцитов (E) и сидерофагов (S)). *a* – иммуногистохимическая реакция с антителами к CD34; *b–d* – окраска гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок соответствует 25 мкм.

неза (FGF2), ингибитора ангиогенеза (TSP-1) и стабилизатора новообразованной сосудистой сети (PDGF-B). Сводные данные по интенсивности и распространенности экспрессии ангиогенных факторов представлены в табл. 3 и 4.

Анализ экспрессии ангиогенных факторов продемонстрировал отчетливое преобладание экспрессии VEGFD над прочими оцененными факторами роста ( $p < 0.001$ ). Выраженная иммунореактивность к VEGFD наблюдалась во всех типах клеток, включая макрофаги и гигантские многоядерные клетки, ГМК/миофибробласты бляшки и ГМК средней оболочки, ЭК каротидного синуса и новообразованных сосудов бляшки (табл. 3). Следует также подчеркнуть распространенный характер иммунореактивности – в подавляющем большинстве бляшек наблюдалась субтотальная экспрессия маркера клеточными популяциями бляшки (табл. 4, рис. 2*d*).

В меньшей по сравнению с VEGFD, но также в значительной степени была выражена экспрессия VEGFA, FGF2 и PDGF-B (рис. 2*a*, 2*e* и 2*f* соответственно). Распространенность и интенсивность экспрессии данных факторов роста значительно между собой не различались ( $p < 0.05$ ). Положительная цитоплазматическая иммунореактивность, как и в случае VEGFD, наблюдалась в макрофагах и гигантских

**Таблица 3.** Экспрессия регуляторов ангиогенеза и их рецепторов в различных структурных компонентах атеросклеротической бляшки каротидного синуса человека

Фактор роста/ рецептор	Эндотелиоциты	Миофибробласты/ гладкомышечные клетки	Макрофаги	Внеклеточный мат- рикс
VEGFA ( <i>n</i> = 32)	++	++	+++	+
VEGFB ( <i>n</i> = 32)	+	+	++	–
VEGFC ( <i>n</i> = 27)	++	++	++	–
VEGFD ( <i>n</i> = 33)	+++	+++	+++	–
VEGFR1 ( <i>n</i> = 5)	–	–	+	–
VEGFR2 ( <i>n</i> = 32)	++	+++	++	++
VEGFR3 ( <i>n</i> = 33)	+	+	+++	–
FGF2 ( <i>n</i> = 32)	++	++	+++	+++
TSP-1 ( <i>n</i> = 17)	+	+	++	++
PDGF-B ( <i>n</i> = 33)	++	++	+++	+++

+ слабая экспрессия; ++ умеренная экспрессия; +++ выраженная экспрессия.

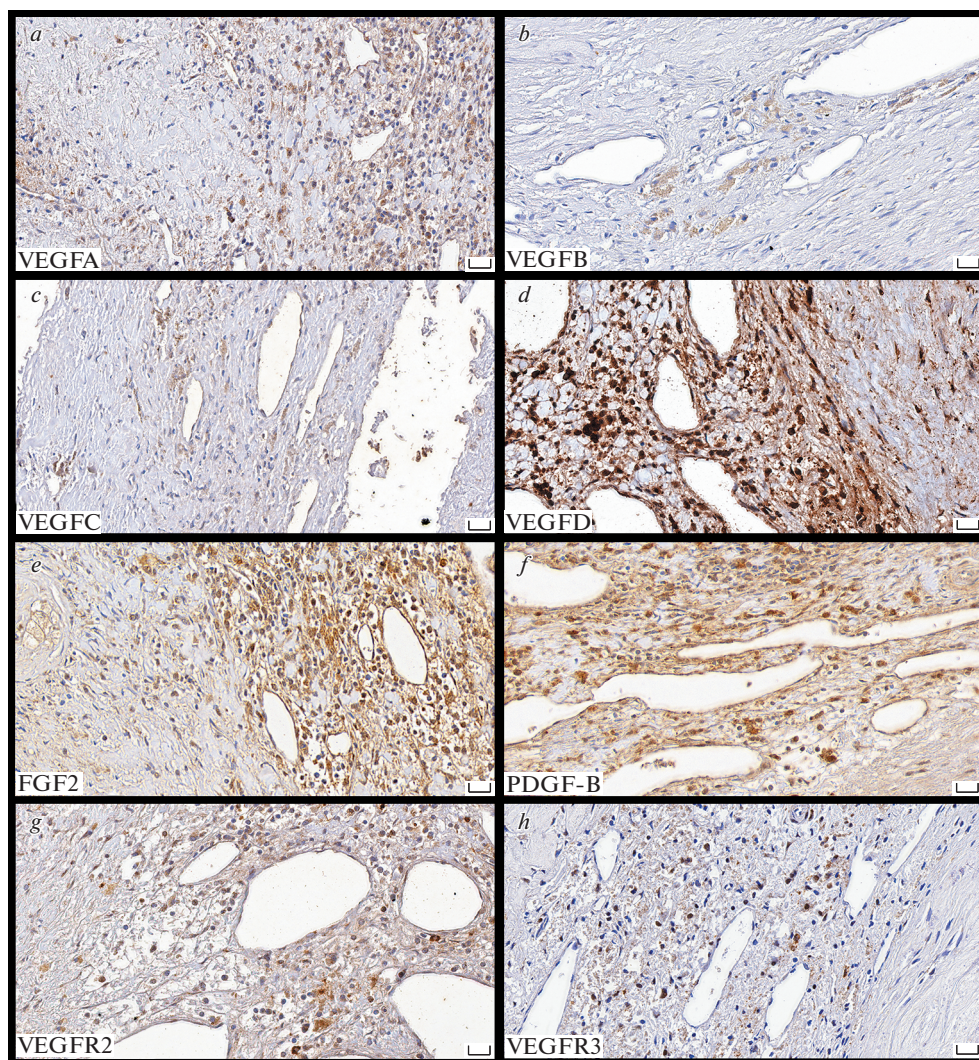
**Таблица 4.** Распространенность экспрессии регуляторов ангиогенеза и их рецепторов в клетках атеросклеротических бляшек каротидного синуса человека

Фактор роста/рецептор	Степень выраженности экспрессии*				
	0	1	2	3	4
VEGFA ( <i>n</i> = 32)	0	1 (3%)	14 (44%)	13 (41%)	4 (12%)
VEGFB ( <i>n</i> = 32)	6 (18%)	13 (41%)	13 (41%)	0	0
VEGFC ( <i>n</i> = 27)	1 (4%)	11 (40%)	14 (52%)	1 (4%)	0
VEGFD ( <i>n</i> = 33)	0	0	3 (9%)	12 (36%)	18 (55%)
VEGFR2 ( <i>n</i> = 32)	0	6 (19%)	17 (53%)	8 (25%)	1 (3%)
VEGFR3 ( <i>n</i> = 33)	1 (3%)	5 (15%)	12 (36%)	13 (40%)	2 (6%)
FGF2 ( <i>n</i> = 33)	0	4 (12%)	15 (46%)	13 (39%)	1 (3%)
TSP-1 ( <i>n</i> = 17)	3 (18%)	7 (41%)	7 (41%)	0	0
PDGF-B ( <i>n</i> = 33)	0	0	18 (55%)	11 (33%)	4 (12%)

0 – отсутствие экспрессии или отдельные иммунореактивные клетки; 1 – единичные небольшие скопления иммунореактивных клеток; 2 – иммунореактивные клетки занимают в совокупности до 15% площади среза; 3 – иммунореактивные клетки занимают в совокупности от 15 до 30% площади среза; 4 – иммунореактивные клетки занимают в совокупности более 30% площади среза.

многоядерных клетках, ГМК/миофибробластах бляшки и средней оболочки, ЭК новообразованных сосудов бляшки и каротидного синуса. При этом экспрессия маркеров наиболее стабильно выявлялась в макрофагах, тогда как в ГМК и ЭК значительно варьировала в разных бляшках – от отдельных иммунореактивных клеток и небольших их очаговых скоплений до субтотальной экспрессии клеточными популяциями бляшки. Наиболее выраженная экспрессия VEGFA, FGF2 и PDGF-B в ГМК и ЭК отмечалась в бляшках с многочисленными крупными скоплениями макрофагов, также экспрессирующих данные маркеры. Кроме того, при иммуногистохимической реакции наблюдалось окрашивание волокнистого компонента бляшки – преимущественно слабое очаговое в случае VEGFA, выраженное и распространенное в случае FGF2, а также выраженное и распространенное, но ассоциированное в наибольшей степени с эластическими волокнами, в случае PDGF-B.





**Рис. 2.** Экспрессия ангиогенных факторов и их рецепторов в кальцинозной атеросклеротической бляшке каротидного синуса (тип VII). Масштабный отрезок соответствует 20 мкм.

Содержание в бляшке VEGFA, VEGFD и FGF2 прямо коррелировало между собой ( $p < 0.05$ ), в особенности VEGFA с двумя другими факторами ( $p < 0.01$ ). Кроме того, экспрессия PDGF-B слабо коррелировала с экспрессией FGF2 ( $p < 0.05$ ), при этом в бляшках с многочисленными скоплениями PDGF-B<sup>+</sup> клеток было значимо больше FGF2 иммунопозитивных клеток ( $p < 0.05$ ). Результаты корреляционного анализа представлены в табл. 5.

В наименьшей степени среди активаторов ангиогенеза в бляшке экспрессировались VEGFB и VEGFC ( $p < 0.001$ ). Слабая или умеренная иммунореактивность к VEGFB (рис. 2b) отмечалась главным образом в макрофагах и отдельных ЭК или ГМК. Среди иммунореактивных к VEGFC клеток также преобладали макрофаги,

**Таблица 5.** Корреляционная матрица степени выраженности неоваскуляризации и экспрессии регуляторов ангиогенеза и их рецепторов в атеросклеротической бляшке каротидного синуса человека

	Коэффициент корреляции, <i>R</i>									
	VEGFA	VEGFB	VEGFC	VEGFD	FGF2	TSP-1	PDGF-B	VEGFR2	VEGFR3	Количество CD34 <sup>+</sup> сосудов в 1 см <sup>2</sup> бляшки
VEGFA	1.00	0.26	0.18	<b>0.62**</b>	<b>0.51**</b>	0.43	0.29	<b>0.39*</b>	<b>0.56**</b>	<b>0.48**</b>
VEGFB	0.26	1.00	<b>0.42*</b>	0.17	<b>0.35*</b>	0.46	-0.07	0.32	<b>0.41*</b>	0.34
VEGFC	0.18	<b>0.42*</b>	1.00	0.20	0.21	<b>0.79**</b>	0.34	0.13	0.13	0.24
VEGFD	<b>0.62**</b>	0.17	0.20	1.00	<b>0.42*</b>	0.31	<b>0.37*</b>	0.33	<b>0.42*</b>	<b>0.51**</b>
FGF2	<b>0.51**</b>	<b>0.35*</b>	0.21	<b>0.42*</b>	1.00	0.20	<b>0.37*</b>	<b>0.72**</b>	<b>0.58**</b>	<b>0.51**</b>
TSP-1	0.43	0.46	<b>0.79**</b>	0.31	0.20	1.00	<b>0.56*</b>	0.00	0.45	0.19
PDGF-B	0.29	-0.07	0.34	<b>0.37*</b>	<b>0.37*</b>	<b>0.56*</b>	1.00	0.32	0.24	<b>0.45**</b>
VEGFR2	<b>0.39*</b>	0.32	0.13	0.33	<b>0.72**</b>	0.00	0.32	1.00	<b>0.60**</b>	<b>0.59**</b>
VEGFR3	<b>0.56**</b>	<b>0.41*</b>	0.13	<b>0.42*</b>	<b>0.58**</b>	0.45	0.24	<b>0.60**</b>	1.00	<b>0.38*</b>
Количество CD34 <sup>+</sup> сосудов в 1 см <sup>2</sup> бляшки	<b>0.48**</b>	0.34	0.24	<b>0.51**</b>	<b>0.51**</b>	0.19	<b>0.45**</b>	<b>0.59**</b>	<b>0.38*</b>	1.00

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

однако экспрессия в ЭК и ГМК встречалась чаще и имела более выраженную интенсивность (табл. 3, рис. 2с), а доля иммунореактивных клеток больше, хотя различие в выраженности экспрессии данных факторов не достигало статистической значимости.

Экспрессия TSP-1 оценена только в 17 бляшках. Среди иммунореактивных клеток преобладали макрофаги, как правило формирующие немногочисленные небольшие скопления (табл. 4). Слабая экспрессия также наблюдалась в единичных ГМК и ЭК (табл. 3). Количество TSP-1 в бляшках было значимо ниже, чем прочих проанализированных регуляторов ангиогенеза ( $p < 0.001$  в случае VEGFA, VEGFD, FGF2 и PDGF-B;  $p < 0.05$  в случае VEGFC), за исключением VEGFB ( $p = 0.5$ ), и коррелировала с уровнем VEGFC ( $p < 0.001$ ) и PDGF-B ( $p < 0.05$ ) (табл. 5).

Помимо ангиогенных факторов была оценена экспрессия рецепторов к сосудистым эндотелиальным факторам роста. VEGFR1 выявлялся в бляшке в следовых количествах в макрофагах, поэтому было исследовано только 5 бляшек. В бляшках преобладала экспрессия VEGFR2 и VEGFR3, коррелировавшая между собой ( $p < 0.001$ , табл. 5). Иммунореактивность к обоим рецепторам наблюдалась в макрофагах, ГМК бляшки и средней оболочке, а также ЭК (рис. 1г, 1h), однако характер и интенсивность экспрессии различались (табл. 3). В то время как VEGFR2 активно экспрессировался во всех типах клеток, причем наиболее выражена экспрессия была в ГМК/миофибробластах, иммунореактивность к VEGFR3 главным образом отмечалась в макрофагах, значительно реже в ГМК и в отдельных бляшках в ЭК, причем экспрессия наблюдалась в отдельных клетках эндотелиальной выстилки новообразованного сосуда. С экспрессией обоих рецепторов в бляшках прямо коррелировало содержание в ней FGF2 ( $p < 0.001$ ), причем с VEGFR2 в большей степени, чем с VEGFR3 (табл. 5). Также отмечена прямая зависимость между экспрессией VEGFA и VEGFR3 ( $p < 0.001$ , табл. 5).

Содержание проанализированных факторов роста и их рецепторов значимо не различалось в бляшках разного типа, в зависимости от объема атероматоза, кальцификатов, степени выраженности воспаления (размера скоплений CD68<sup>+</sup> макрофагов). В то же время отмечена прямая зависимость между плотностью расположения новообразованных сосудов в бляшке (количеством сосудов в 1 см<sup>2</sup> бляшки) и со-

держанием в ней VEGFA, VEGFD, FGF2, PDGF-B, VEGFR2 ( $p < 0.01$ ) и VEGFR3 ( $p < 0.05$ , табл. 5).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ангиогенез представляет собой сложный процесс, регулируемый про- и антиангиогенными факторами, которые включают динамическое взаимодействие между многочисленными клетками, факторами роста и внеклеточным матриксом [15]. Ключевым фактором запуска ангиогенеза считается VEGFA, который при взаимодействии с VEGFR2 вызывает пролиферацию, миграцию и инвазию ЭК в окружающие ткани, способствует привлечению воспалительных клеток, а также стимулирует синтез матриксных металлопротеиназ, необходимых для деградации базальной мембраны и внеклеточного матрикса, обязательного этапа ангиогенеза [16]. VEGFA является наиболее изученным ангиогенным фактором в семействе сосудистых эндотелиальных факторов роста [3]. Связывание VEGFA с VEGFR2 также приводит к выраженному повышению проницаемости эндотелия [16], вследствие чего он также известен как фактор сосудистой проницаемости.

VEGFA в норме экспрессируется преимущественно в ЭК и перицитах, однако в условиях гипоксии и воспаления также отмечена его продукция моноцитами/макрофагами и ГМК [17]. Согласно ранее проведенным исследованиям, VEGFA в большом количестве представлен в бляшках сонных артерий на поздних стадиях развития атеросклероза, где он выявлялся в ЭК, ГМК и макрофагах [18]. Мы также отметили выраженную экспрессию VEGFA в бляшках каротидного синуса, при этом иммунореактивность наиболее стабильно наблюдалась в макрофагах, тогда как в ГМК и ЭК варьировала в широких пределах, но увеличивалась с повышением количества иммунореактивных макрофагов.

Прямая зависимость между уровнем VEGFA и выраженностью неоваскуляризации продемонстрирована в многочисленных работах при широком спектре различных заболеваний, включая атеросклероз [17]. Кроме того, применение моноклональных антител к VEGFA приводило к уменьшению неоваскуляризации и размера бляшки [13], подчеркивая значимость фактора в ангиогенезе при атеросклерозе. Полученные нами данные подтверждают описанную закономерность – выраженность экспрессии VEGFA коррелировала с количеством микрососудов в бляшке. Активация VEGFA в бляшках приводит к формированию высокопроницаемых, структурно неполноценных микрососудов, которые способствуют усилению воспаления, окислительного стресса и, в целом, прогрессированию атеросклероза [16]. В этой связи неудивительно, что VEGFA рассматривался как многообещающая мишень терапевтического воздействия для блокады ангиогенеза в бляшке. Тем не менее, спектр побочных эффектов, выявленных в клинических исследованиях при онкологических и офтальмологических заболеваниях [17], исключает использование блокаторов VEGFA/VEGFR2 для длительного лечения атеросклероза.

Экспрессия VEGFR2 в проанализированных бляшках также была выражена в значительной степени, наблюдалась в ЭК, макрофагах и особенно ГМК, а также коррелировала с количеством микрососудов. По данным литературы, VEGFR2 преимущественно выявляется в ЭК, но не в макрофагах или ГМК, опосредуя передачу сигнала VEGFA [16]. Тем не менее, экспрессия VEGFR2 в ГМК была отмечена в немногочисленных исследованиях. В частности, в одном исследовании на культуре ГМК продемонстрировано резкое повышение экспрессии VEGFR2 под действием гипоксии, что в сочетании с повышенным уровнем VEGFA приводило к активации пролиферации ГМК [19]. Кроме того, экспрессия рецептора была зафиксирована в ГМК аорты кроликов WHHL (генетически гиперлипемичные кролики Ватанаба) [20]. Таким образом, персистирующая резко выраженная гипоксия

в бляшке каротидного синуса на поздних стадиях развития атеросклероза может стимулировать экспрессию VEGFR2 в ГМК с последующей их пролиферацией, что, возможно, объясняет выявленную нами экспрессию рецептора в ГМК и требует дополнительного подтверждения.

В моноцитах/макрофагах и ГМК наряду с ЭК чаще описывается экспрессия другого рецептора VEGFA – VEGFR1 [16]. VEGFR1 имеет в 10 раз более высокое сродство к VEGFA, чем VEGFR2, однако результирующий сигнал является слабым [17]. Растворимая форма рецептора связывает VEGFA, предотвращая его связывание с полноразмерной формой VEGFR1 и VEGFR2 [21]. Кроме того, гетеродимеры VEGFR1/VEGFR2 блокируют передачу сигнала VEGFA, предотвращая VEGFR2 гомодимерную активность [12]. В этой связи VEGFR1 известен своей негативной регуляторной ролью в ангиогенезе. В проведенном исследовании VEGFR1 выявлялся в бляшках в следовых количествах, что могло дополнительно стимулировать ангиогенез и ускорить прогрессирование атеросклероза вследствие усиления сигнала VEGFA/VEGFR2. Имеются данные о деградации рецептора при связывании с липопротеинами низкой плотности [15], широко представленными в бляшках, что может отчасти объяснить отмеченный в нашем исследовании столь низкий уровень VEGFR1.

Мы также проанализировали содержание в бляшках других членов семейства VEGF, а именно VEGFB, VEGFC и VEGFD, с неожиданным результатом – из всех проанализированных сосудистых эндотелиальных факторов роста, включая VEGFA, отмечено ранее не описанное отчетливое преобладание VEGFD с субтотальной выраженной экспрессией маркера всеми типами клеточных популяций в большинстве исследованных бляшек.

VEGFD очень близок по структуре и рецепторной специфичности к VEGFC, и основным его биологическим эффектом при взаимодействии с VEGFR3 ранее считался лимфангиогенез [17]. Тем не менее, было продемонстрировано, что VEGFD является эффективным ангиогенным фактором, реализующим свое действие через посредство VEGFR2 или гетеродимеров VEGFR2/VEGFR3 либо опосредованно, повышая экспрессию других факторов роста, включая VEGFA [16]. Полученные нами данные о наличии корреляции между уровнями VEGFD и VEGFA в бляшке могут косвенно подтверждать ранее отмеченную другими авторами взаимосвязь двух факторов. Прямая зависимость степени выраженности неоваскуляризации в бляшке и экспрессии в ней VEGFD также может указывать на активное участие VEGFD в регуляции ангиогенеза при атеросклерозе.

Большинство опубликованных результатов исследований по механизму действия VEGFD посвящено его роли в канцерогенезе, в том числе в аспекте патологического ангио- и лимфангиогенеза, а также в патогенезе других заболеваний, включая сердечно-сосудистые [16, 22]. Данные о роли VEGFD в атерогенезе и прогрессировании атеросклероза, в том числе в неоваскуляризации бляшки, единичны. В частности, на кроличьей модели сахарного диабета в атеросклеротических бляшках каротидного синуса продемонстрировано, что экспрессия VEGFD в атеросклеротических бляшках была повышена и наблюдалась в ЭК, ГМК и макрофагах [20, 23], это согласуется с полученными нами данными по характеру экспрессии маркера. Проатерогенное действие VEGFD также показано на модели каротидной гиперплазии у кроликов, у которых введение в адвентицию аденовируса, кодирующего VEGFD, приводило к утолщению интимы [1]. Помимо ангио- и лимфангиогенного действия, сигнальный путь VEGFD/VEGFR3 вовлечен в стимуляцию миграции и пролиферации миофибробластов, а также стимуляцию синтеза коллагена I типа в культуре миофибробластов сердца, способствуя фиброзу [24]. VEGFD также обладает антиоксидантной активностью и регулирует липидный обмен [16].

В целом, имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о потенциально значительной роли VEGFD в атерогенезе и неоваскуляризации, что требует дополнительного изучения и делает его привлекательной мишенью терапевтического воздействия при атеросклерозе, в особенности с учетом широкого спектра уже разработанных препаратов, направленных на активацию или подавление VEGFD/VEGFR3 сигнального пути. Препараты данного типа успешно прошли доклинические исследования и применяются в клинических исследованиях I/IIa фазы при онкологических, офтальмологических (влажная возрастная макулярная дегенерация) и сердечно-сосудистых заболеваниях (рефрактерная стенокардия) [22].

По нашим данным, содержание VEGFC в бляшках было значимо ниже, чем VEGFD и VEGFA. VEGFC считается ключевым фактором лимфангиогенеза, реализующим свое действие через взаимодействие с VEGFR3 [16]. Тем не менее, VEGFC может связываться с VEGFR2, хотя и с более низкой афинностью, чем с VEGFR3, и запускать ангиогенез [16]. Отмечена обратная связь между ангиогенезом и лимфангиогенезом, а именно значимое снижение ангиогенеза при активном развитии лимфатической сети и наоборот. Поэтому ангиогенез, опосредуемый VEGFC, преимущественно происходил вдали от очагов лимфангиогенеза [16]. Кроме того, получены данные о возможности запуска ангиогенеза при связывании VEGFC с VEGFR3 за счет стимуляции экспрессии PDGF-B, вовлеченного в активацию ЭК [25], или под действием атерогенной микроРНК MiR-27b, которая усиливала экспрессию VEGFC с последующей стимуляцией пролиферации и миграции клеток и ангиогенеза в культуре НМЕС-1 [26]. В дополнение к регуляции ангио-/лимфангиогенеза и воспаления, VEGFC, как и VEGFD, обладает фиброгенной активностью – непосредственно способствует пролиферации, миграции и синтезу коллагена фибробластами [16].

Обнаруженное нами высокое содержание в бляшках каротидного синуса VEGFR3 – основного рецептора VEGFC и VEGFD, сопоставимое с уровнем VEGFR2, указывало на его потенциально значимую роль в ангиогенезе и атерогенезе. VEGFR3 преимущественно экспрессируется в лимфатических ЭК, стимулируя их дифференцировку, пролиферацию, миграцию и выживаемость при связывании с VEGFC и VEGFD, тем самым стимулируя лимфангиогенез [16]. Маркер также отмечен в макрофагах [16]. Мы получили сходные данные по экспрессии рецептора – в атеросклеротической бляшке VEGFR3 главным образом выявлялся в макрофагах, значительно реже в ГМК и лишь в единичных ЭК, которые также экспрессировали CD34 (сосудистые ЭК). При этом экспрессия VEGFR3, согласно полученным нами результатам, коррелировала с содержанием в бляшке VEGFR2 и VEGFA. О наличии модулирующей роли VEGFR3 в передаче сигнала VEGFA/VEGFR2, а также тесной связи VEGFR2 и VEGFR3 свидетельствовали результаты ряда ранее проведенных исследований [27, 28]. В частности, отмечено взаимодействие VEGFR2 и VEGFR3 по системе обратной связи – VEGFR2 стимулировал экспрессию VEGFR3, который затем подавлял экспрессию VEGFR2 [27]. VEGFA, VEGFC и VEGFD стимулировали образование гетеродимеров VEGFR2/VEGFR3, которые активируют пролиферацию ЭК, способствуя новообразованию сосудов [28]. При этом гетеродимеры могут активировать ангиогенез даже при блокаде VEGFR2, вероятно, вследствие усиления тирозинкиназной активности VEGFR3 при связывании с VEGFR2 [27].

В наименьшей степени среди сосудистых эндотелиальных факторов роста в бляшках был представлен VEGFB, который выявлялся главным образом в макрофагах и единичных ГМК и ЭК. Тем не менее, экспрессия VEGFB значимо не отличалась от экспрессии VEGFC. VEGFB является гомологом VEGFA и реализует свое действие только через взаимодействие с VEGFR1 [16]. Он широко экспрессируется в различных типах клеток, включая ГМК сосудов и ЭК, и обладает слабой



ангиогенной активностью [16]. Проангиогенный эффект VEGFB может быть связан с подавлением апоптоза/стимуляцией выживаемости клеток или с вытеснением VEGFA из комплекса с VEGFR1, что может усилить передачу сигнала VEGFA/VEGFR2 [29]. Наиболее значимая роль VEGFB в атерогенезе и неоваскуляризации бляшки может быть связана с недавно выявленными его антиатерогенными эффектами – сильным антиоксидантным действием и регуляцией метаболизма клеток [29]. Тем не менее, VEGFR1, необходимый для реализации эффекта VEGFB, выявлялся в бляшках в следовых количествах.

Помимо классических (семейство VEGF) был оценен уровень альтернативного ангиогенного фактора – FGF2, который является сильным активатором ангиогенеза [11]. Ранее проведенные исследования продемонстрировали, что FGF2 является сильным митогеном для различных клеток, включая ЭК [10]; стимулирует пролиферацию и структурную организацию ЭК в тубулярные структуры, а также рост, дифференцировку и выживание ассоциированных с кровеносными сосудами клеток [30]; оказывает антифиброзное действие [31]. При этом FGF2 регулирует ангиогенез опосредованно, в том числе за счет активации высвобождения других ангиогенных факторов, и относится к “непрямым” ангиогенным факторам [6, 10, 32].

Нами выявлена выраженная экспрессия FGF2 в исследованных бляшках каротидного синуса, которая по степени и характеру значимо не отличалась от экспрессии VEGFA и коррелировала с ней, а также с экспрессией VEGFR2 и VEGFR3. Полученные данные согласуются с результатами опубликованных работ, в которых указан синергетический эффект FGF2 и VEGFA, обуславливающий стимуляцию миграции ЭК, перицитов и ГМК [32], а также корреляция экспрессии VEGFA/VEGFR2 и FGF2/FGFR1 [6]. В ряде исследований также продемонстрирована сложная и тесная взаимосвязь между сигнальными путями FGF2 и VEGFA в ходе ангиогенеза. В частности, для поддержания экспрессии VEGFR2 необходима стимуляция ЭК FGF2 [10]; FGF2 регулирует сплайсинг VEGFR1 с активацией образования растворимых форм рецептора, которые поддерживают градиент VEGFA для навигации образующихся сосудов [10]; FGF2 стимулирует синтез VEGFA [32].

Исследования членов семейства FGF при атеросклерозе немногочисленны, а полученные результаты зачастую противоречивы, хотя исследователи сходятся во мнении относительно повышенного содержания и критической роли членов FGF в атеросклеротических бляшках [33]. К примеру, имеются данные о ключевой роли FGF2 в неоваскуляризации бляшки [3, 6] и об отсутствии экспрессии FGF2 в бляшках [3].

PDGF-B – наиболее хорошо охарактеризованный фактор роста для привлечения периваскулярных клеток и стабилизации новообразованной сосудистой сети [11, 30]. ЭК в составе развивающегося сосуда секретируют PDGF-B, который связывается с гепарансульфат-протеогликанами внеклеточного матрикса и поверхности клеток, тем самым создавая градиент, необходимый для навигации перицитов в направлении развивающегося сосуда [34], нарушение которого приводило к образованию высокопроницаемых сосудов. Также показано, что VEGFA стимулирует экспрессию рецептора PDGF, тем самым регулируя миграцию и пролиферацию фибробластов и ГМК, а также образование внеклеточного матрикса [35].

Описанное в литературе связывание PDGF-B, FGF2 и VEGFA с внеклеточным матриксом создает депо данных факторов роста в межклеточном веществе [34, 36], что может объяснить иммунореактивность волокнистого компонента бляшки к вышеуказанным факторам, обнаруженное в проведенном нами исследовании, и подчеркивает возможность резкого повышения ангиогенного сигнала при их высвобождении из депо под действием протеаз. Экспрессия PDGF-B описана в многочисленных клетках, включая ЭК, ГМК и макрофаги [37], что также было отмечено и нами. Дисфункция сигнального пути PDGF-B выявляется при широком спектре заболеваний, включая

атеросклероз, при котором отмечено повышение экспрессии фактора [38]. Ряд авторов также указывает на сходный характер экспрессии PDGF-В и VEGFA [18], что также подтверждали результаты нашего исследования.

PDGF-В, как и FGF2, считается “непрямым” ангиогенным фактором [6]. Показано, что он может стимулировать экспрессию VEGFA и FGF2 [35], при этом на кроличьей модели атеросклероза недавно был продемонстрирован синергетический эффект PDGF-В и FGF2 в части привлечения перицитов, стабилизации новообразованной сосудистой сети и уменьшении площади сосудистой сети [11]. Несмотря на то, что FGF2 и PDGF-В считаются важными регуляторами ангиогенеза в бляшке, их точная роль в регуляции и координации этого сложного процесса остается во многом слабо изученной [1, 6]. В последние годы получены данные о том, что в бляшках на поздних стадиях развития атеросклероза была снижена экспрессия рецептора PDGF-В, несмотря на относительно высокий уровень экспрессии самого фактора [6]. Кроме того, описана возможность образования нефункциональных гетеродимеров VEGFR2/PDGFR-бета в перицитах под действием VEGFA [39]. Окисленные липопротеины низкой плотности при краткосрочной инкубации с ГМК индуцировали активацию PDGFR-бета, тогда как длительная инкубация приводила к подавлению фосфорилирования рецептора [6].

Мы оценивали экспрессию рецепторов только сосудистых эндотелиальных факторов роста, что ограничивает возможности интерпретации результатов активации сигнальных путей других факторов. При высоком уровне PDGF-В и FGF2 (с учетом их синергетического эффекта) мы зачастую наблюдали в бляшках многочисленные тонкостенные сосуды с нарушенной целостностью эндотелиальной выстилки без слоя перицитов и периваскулярными кровоизлияниями разной давности. В совокупности это свидетельствует о незрелой структуре новообразованных сосудов с повышением проницаемости их стенки, что может быть связано с нарушением передачи сигнала PDGF-В вследствие снижения экспрессии, стимуляции деградации его рецептора или подавления фосфорилирования рецептора под действием VEGFA/VEGFR2, липопротеинов низкой плотности и других возможных факторов на поздних стадиях развития атеросклероза.

TSP-1 считается сильным ингибитором ангиогенеза, действие которого может быть реализовано различными путями при атеросклерозе: подавление экспрессии VEGFA, снижение уровня липопротеинов низкой плотности, клиренс матриксных металлопротеиназ, индукция апоптоза ЭК, подавление их миграции и пролиферации [40]. Экспрессия TSP-1 выявляется в клетках различных типов, включая ЭК, макрофаги и ГМК [9], что подтверждалось в проведенном исследовании. TSP-1 модулирует клеточный ответ на факторы внешней среды, конкурентно связываясь с клеточными рецепторами, компонентами внеклеточного матрикса, протеолитическими ферментами и растворимыми факторами [36]. Данные по экспрессии и значимости TSP-1 при атеросклерозе и неоваскуляризации бляшки немногочисленны. Ряд авторов указывает на повышение экспрессии маркера в атеросклеротической бляшке [41], что может быть связано с его активацией в ответ на действие факторов роста (PDGF-В, FGF2) и гипоксии [9]. Тем не менее, содержание в бляшках TSP-1 по нашим данным было низким, а интенсивность экспрессии слабой. Значимость TSP-1 в ангиогенезе в бляшке неоднозначна, поскольку помимо антиангиогенного действия фактор также опозиционируется как проатерогенный, стимулирующий миграцию и пролиферацию ГМК с формированием секреторного фенотипа, в особенности под влиянием глюкозы [41]. Неоднозначная роль TSP-1 в атерогенезе и неоваскуляризации бляшки, а также его тесная связь с ключевыми регуляторными сигнальными путями ангиогенеза при атеросклерозе свидетельствует о необходимости дополнительного изучения механизмов его действия в комплексе с другими ангиогенными факторами.

Нами также была оценена взаимосвязь различных ангиогенных факторов со структурными компонентами бляшки, однако выявить какую-либо зависимость (за исключением неоваскуляризации), в том числе с выраженностью воспалительной реакции (содержание CD68<sup>+</sup> макрофагов) нам не удалось. Возможной причиной такого результата может быть небольшой объем выборки, в особенности малое количество стабильных бляшек. Кроме того, мы не выделяли различные подтипы макрофагов и не оценивали содержание в бляшке провоспалительных цитокинов, которые играют значимую роль в ангиогенезе.

Таким образом, в проведенном исследовании продемонстрирован резко выраженный проангиогенный профиль экспрессии различных регуляторных факторов ангиогенеза в атеросклеротических бляшках каротидного синуса на поздних стадиях развития атеросклероза со значимым преобладанием VEGFD иммунореактивности на фоне резкого дефицита антиангиогенного фактора TSP-1. Высокое содержание в бляшках VEGFA, VEGFR2/3, FGF2 и PDGF-B, а также относительно низкий уровень VEGFC/VEGFB и следовые количества VEGFR1 на фоне высокопроницаемой новообразованной сосудистой сети свидетельствует о резком смещении равновесия в сторону стимуляторов ангиогенеза и неполноценности механизма стабилизации новообразованной сосудистой сети.

С учетом сложной системы взаимодействия между различными ангиогенными факторами и их рецепторами, а также наличием многочисленных локальных модуляторов процесса при атеросклерозе, необходимо дальнейшее изучение регуляции неоваскуляризации атеросклеротических бляшек с обязательным комплексным анализом разнонаправленных звеньев регуляции ангиогенеза, в том числе на клеточных и животных моделях атеросклероза. В этой связи стоит обратить особое внимание на механизм действия VEGFD, гиперэкспрессия которого была впервые нами продемонстрирована в бляшках каротидного синуса наряду с выраженной экспрессией его рецепторов (VEGFR2/VEGFR3). Широкий спектр эффектов VEGFD, отмеченный при различных патологиях, указывает на его возможно значимую роль как в ангиогенезе, так и атерогенезе, что делает его многообещающей мишенью терапевтического воздействия при атеросклерозе.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работы выполнены в рамках государственного задания ФГБНУ НЦН на проведение фундаментальных научных исследований.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

А.Н.Е. — идея работы и планирование исследования, сбор и обработка данных, написание манускрипта; К.Н.К. — сбор и обработка данных, написание манускрипта; Т.С.Г. — идея работы и планирование исследования, написание и редактирование манускрипта; М.М.Т. — идея работы и планирование исследования, написание и редактирование манускрипта.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Camaré C, Pucelle M, Nègre-Salvayre A, Salvayre R* (2017) Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. *Redox Biol* 12: 18–34. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.007>
2. *Sedding DG, Boyle EC, Demandt JAF, Sluimer JC, Dutzmann J, Haverich A, Bauersachs J* (2018) Vasa Vasorum Angiogenesis: Key Player in the Initiation and Progression of Atherosclerosis

- and Potential Target for the Treatment of Cardiovascular Disease. *Front Immunol* 9: 706. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00706>
3. *Van der Veken B, De Meyer GR, Martinet W* (2016) Intraplaque neovascularization as a novel therapeutic target in advanced atherosclerosis. *Expert Opin Ther Targets* 20: 1247–1257. <https://doi.org/10.1080/14728222.2016.1186650>
  4. *Sluimer JC, Kolodgie FD, Bijmens APJJ, Maxfield K, Pacheco E, Kutys B, Duimel H, Frederik PM, van Hinsbergh VWM, Virmani R, Daemen MJAP* (2009) Thin-Walled Microvessels in Human Coronary Atherosclerotic Plaques Show Incomplete Endothelial Junctions. *J Am Coll Cardiol* 53: 1517–1527. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.12.056>
  5. *Parma L, Baganha F, Quax PHA, de Vries MR* (2017) Plaque angiogenesis and intraplaque hemorrhage in atherosclerosis. *Eur J Pharmacol* 816: 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.04.028>
  6. *Mao Y, Liu X, Song Y, Zhai C, Zhang L* (2018) VEGF-A/VEGFR-2 and FGF-2/FGFR-1 but not PDGF-BB/PDGFR- $\beta$  play important roles in promoting immature and inflammatory intraplaque angiogenesis. *PLoS One* 13: e0201395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201395>
  7. *Jeziorska M, Woolley DE* (1999) Neovascularization in early atherosclerotic lesions of human carotid arteries: Its potential contribution to plaque development. *Hum Pathol* 188: 189–196. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(99\)90245-9](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(99)90245-9)
  8. *Kashiwazaki D, Koh M, Uchino H, Akioka N, Kuwayama N, Noguchi K, Kuroda S* (2018) Hypoxia accelerates intraplaque neovascularization derived from endothelial progenitor cells in carotid stenosis. *J Neurosurg* 131: 884–891. <https://doi.org/10.3171/2018.4.JNS172876>
  9. *Adams JC, Lawler J* (2004) The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 961–968. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.01.004>
  10. *Jia T, Jacquet T, Dalonneau F, Coudert P, Vaganay E, Exbrayat-Héritier C, Vollaire J, Josserand V, Ruggiero F, Coll J-L, Eymine B* (2021) FGF-2 promotes angiogenesis through a SRSF1/SRSF3/SRPK1-dependent axis that controls VEGFR1 splicing in endothelial cells. *BMC Biol* 19: 173. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01103-3>
  11. *Mao Y, Liu XQ, Song Y, Zhai CG, Xu XL, Zhang L, Zhang Y* (2020) Fibroblast growth factor-2/platelet-derived growth factor enhances atherosclerotic plaque stability. *J Cell Mol Med* 24: 1128–1140. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14850>
  12. *Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L* (2016) Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17: 611–625. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.87>
  13. *Perrotta P, Emini Veseli B, Van der Veken B, Roth L, Martinet W, De Meyer GRY* (2019) Pharmacological strategies to inhibit intra-plaque angiogenesis in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol* 112: 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.06.014>
  14. *Stary HC* (2000) Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1177–1178. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.5.1177>
  15. *Camaré C, Pucelle M, Nègre-Salvayre A, Salvayre R* (2017) Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. *Redox Biol* 12: 18–34. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.007>
  16. *Zhou Y, Zhu X, Cui H, Shi J, Yuan G, Shi S, Hu Y* (2021) The Role of the VEGF Family in Coronary Heart Disease. *Front Cardiovasc Med* 8: 738325. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.738325>
  17. *Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mihu C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Mihu CM* (2018) Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol* 59: 455–467. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30173249>
  18. *Pelisek J, Well G, Reeps C, Rudelius M, Kuehnl A, Culmes M, Poppert H, Zimmermann A, Berger H, Eckstein H-H* (2012) Neovascularization and angiogenic factors in advanced human carotid artery stenosis. *Circ J* 76: 1274–1282. <https://doi.org/10.1253/circj.cj-11-0768>
  19. *Chanakira A, Dutta R, Charboneau R, Barke R, Santilli SM, Roy S* (2012) Hypoxia differentially regulates arterial and venous smooth muscle cell proliferation via PDGFR- $\beta$  and VEGFR-2 expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H1173–H1184. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00411.2011>
  20. *Roy H, Bhardwaj S, Babu M, Kokina I, Uotila S, Ahtialansaari T, Laitinen T, Hakumaki J, Laakso M, Herzig K-H, Ylä-Herttuala S* (2006) VEGF-A, VEGF-D, VEGF receptor-1, VEGF receptor-2, NF-kappaB, and RAGE in atherosclerotic lesions of diabetic Watanabe heritable hyperlipid-

- emic rabbits. *FASEB J* 20: 2159–2161.  
<https://doi.org/10.1096/fj.05-5029fje>
21. *Claesson-Welsh L* (2016) VEGF receptor signal transduction – A brief update. *Vascul Pharmacol* 2001: re21.  
<https://doi.org/10.1126/stke.2001.112.re21>
  22. *Stacker SA, Achen MG* (2018) Emerging Roles for VEGF-D in Human Disease. *Biomolecules* 8: 1.  
<https://doi.org/10.3390/biom8010001>
  23. *Rutanan J, Leppänen P, Tuomisto TT, Rissanen TT, Hiltunen MO, Vajanto I, Niemi M, Häkkinen T, Karkola K, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K, Ylä-Herttuala S* (2003) Vascular endothelial growth factor-D expression in human atherosclerotic lesions. *Cardiovasc Res* 59: 971–979.  
[https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(03\)00518-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(03)00518-2)
  24. *Zhao T, Zhao W, Meng W, Liu C, Chen Y, Bhattacharya SK, Sun Y* (2016) Vascular endothelial growth factor-D mediates fibrogenic response in myofibroblasts. *Mol Cell Biochem* 413: 127–135.  
<https://doi.org/10.1007/s11010-015-2646-1>
  25. *Engelmann D, Mayoli-Nüssle D, Mayrhofer C, Fürst K, Alla V, Stoll A, Spitschak A, Abshagen K, Vollmar B, Ran S, Pützer BM* (2013) E2F1 promotes angiogenesis through the VEGF-C/VEGFR-3 axis in a feedback loop for cooperative induction of PDGF-B. *J Mol Cell Biol* 5: 391–403.  
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt035>
  26. *Liu J, Sun F, Wang X, Bi Q* (2020) miR-27b promotes angiogenesis and skin repair in scalded rats through regulating VEGF-C expression. *Lasers Med Sci* 35: 1577–1588.  
<https://doi.org/10.1007/s10103-020-02991-7>
  27. *Zarkada G, Heinolainen K, Makinen T, Kubota Y, Alitalo K* (2015) VEGFR3 does not sustain retinal angiogenesis without VEGFR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 761–766.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1423278112>
  28. *Nilsson I, Bahram F, Li X, Gualandi L, Koch S, Jarvius M, Söderberg O, Anisimov A, Kholová I, Pytowski B, Baldwin M, Ylä-Herttuala S, Alitalo K, Kreuger J, Claesson-Welsh L* (2010) VEGF receptor 2/-3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts. *EMBO J* 29: 1377–1388.  
<https://doi.org/10.1038/emboj.2010.30>
  29. *Chen R, Lee C, Lin X, Zhao C, Li X* (2019) Novel function of VEGF-B as an antioxidant and therapeutic implications. *Pharmacol Res* 143: 33–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.03.002>
  30. *Fallah A, Sadeghinia A, Kahroba H, Samadi A, Heidari HR, Bradaran B, Zeinali S, Molavi O* (2019) Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases. *Biomed Pharmacother* 110: 775–785.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.022>
  31. *Dolivo DM, Larson SA, Dominko T* (2017) Fibroblast Growth Factor 2 as an Antifibrotic: Antagonism of Myofibroblast Differentiation and Suppression of Pro-Fibrotic Gene Expression. *Cytokine Growth Factor Rev* 38: 49–58.  
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.09.003>
  32. *Presta M, Dell’Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M* (2005) Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 159–178.  
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.004>
  33. *Chen P, Qin L, Li G, Tellides G, Simons M* (2016) Smooth muscle FGF/TGFβ cross talk regulates atherosclerosis progression. *EMBO Mol Med* 8: 712–728.  
<https://doi.org/10.15252/emmm.201506181>
  34. *Tillie RJHA, Theelen TL, van Kuijk K, Temmerman L, de Bruijn J, Gijbels M, Betsholtz C, Biesse EAL, Sluimer JC* (2021) A Switch from Cell-Associated to Soluble PDGF-B Protects against Atherosclerosis, despite Driving Extramedullary Hematopoiesis. *Cells* 10: 1746.  
<https://doi.org/10.3390/cells10071746>
  35. *Laddha AP, Kulkarni YA* (2019) VEGF and FGF-2: Promising targets for the treatment of respiratory disorders. *Respir Med* 156: 33–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2019.08.003>
  36. *Margosio B, Marchetti D, Vergani V, Giavazzi R, Rusnati M, Presta M, Taraboletti G* (2003) Thrombospondin 1 as a scavenger for matrix-associated fibroblast growth factor 2. *Blood* 102: 4399–4406.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0893>
  37. *Heldin CH, Westermark B* (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79: 1283–1316.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1283>
  38. *Papadopoulos N, Lennartsson J* (2018) The PDGF/PDGFR pathway as a drug target. *Mol Aspects Med* 62: 75–88.  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.007>

39. Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, Acevedo LM, Murphy E, Huang J, Schepke L, Stockmann C, Johnson RS, Angle N, Cheresh DA (2008) A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature* 456: 809–813.  
<https://doi.org/10.1038/nature07424>
40. Greenaway J, Lawler J, Moorehead R, Bornstein P, Lamarre J, Petrik J (2007) Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). *J Cell Physiol* 210: 807–818.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.20904>
41. Ganguly R, Sahu S, Ohanyan V, Haney R, Chavez RJ, Shah S, Yalamanchili S, Raman P (2017) Oral chromium picolinate impedes hyperglycemia-induced atherosclerosis and inhibits proatherogenic protein TSP-1 expression in STZ-induced type 1 diabetic ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Sci Rep* 7: 45279.  
<https://doi.org/10.1038/srep45279>

### Defining Characteristics of Angiogenesis Regulation in Advanced Human Carotid Plaques

A. N. Evdokimenko<sup>a, \*</sup>, K. N. Kulichenkova<sup>a</sup>, T. S. Gulevskaya<sup>a</sup>, and M. M. Tanashyan<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Research Center of Neurology, Moscow, Russia

\*e-mail: [evdokimenko@neurology.ru](mailto:evdokimenko@neurology.ru)

Increased neovascularization of atherosclerotic plaque contributes to plaque vulnerability, atherosclerosis progression and enhance complications risk including myocardial infarction and ischaemic stroke. However, studies of angiogenesis dynamics in atherosclerosis are scarce, and the data obtained require clarification. The aim of our study was a comprehensive assessment of the expression of multidirectional regulatory factors of angiogenesis in carotid atherosclerotic plaque. The study included 33 patients with carotid atherosclerotic stenosis exceeding 60%, who were subjected to carotid endarterectomy followed by pathomorphological examination of removed atherosclerotic plaques throughout their length. The structure of plaques, the number of microvessels per 1 cm<sup>2</sup> of the plaque, as well as the expression of vascular endothelial growth factors (VEGFA, VEGFB, VEGFC, and VEGFD) and their receptors (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), FGF2, PDGF-B, and TSP-1 were assessed. Correlation analysis of the obtained data was performed. Histological examination demonstrated that there were 13 atheromatous plaques (type Va), 12 complicated plaques with either fibrous cap ulceration or massive intraplaque haemorrhage (type VI), 6 calcified plaques (type Vb), and 2 fibrous plaques (type Vc). Neovessels were found in all plaques (267.5 сосудов/1 см<sup>2</sup> [140.9; 534.8]). Most of the neovessels possessed a highly permeable phenotype with such features as loss of integrity of endothelium; lack of pericyte layer and perivascular hemorrhage. VEGFD was overexpressed and prevailed over the other assessed factors ( $p < 0.001$ ). Pronounced expression of VEGFA, VEGFR2, VEGFR3, FGF2 and PDGF-B was also found in plaques. Immunoreactivity to VEGFB, VEGFC and TSP-1 was the weakest, VEGFR1 was detected in trace amounts. The number of microvessels in the plaque significantly correlated with the expression of VEGFA, VEGFD, FGF2, PDGF-B and VEGFR2 ( $p < 0.01$ ). Other structural components of plaques were not related to the level of angiogenic factors in plaques. Conclusion. We demonstrated a pronounced proangiogenic expression profile of various angiogenic factors in association with failure of the neovessel stabilization mechanism in advanced human carotid atherosclerotic plaques.

**Keywords:** carotid plaque, regulation of angiogenesis, VEGF, VEGFR, FGF2, PDGF-B, TSP-1