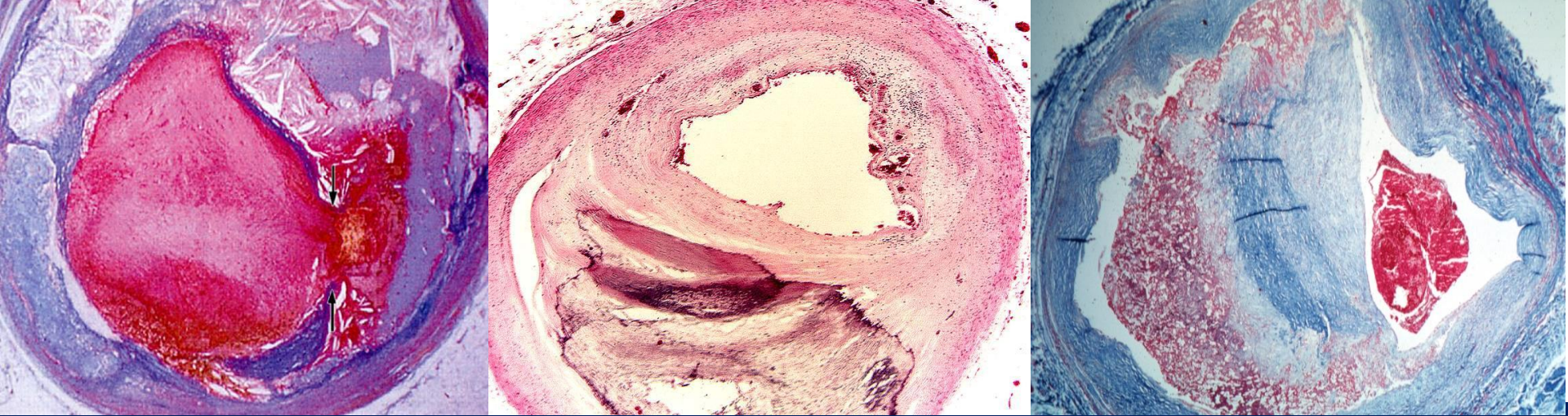
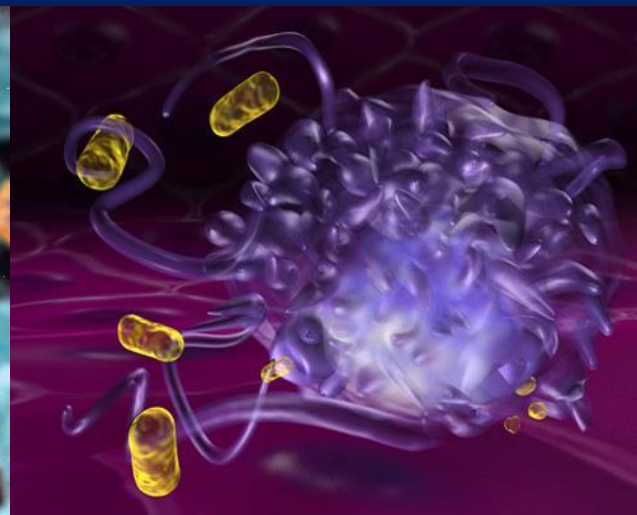
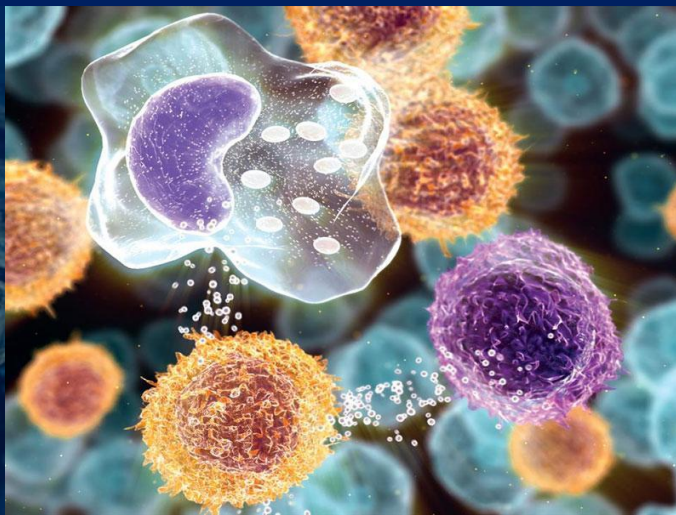
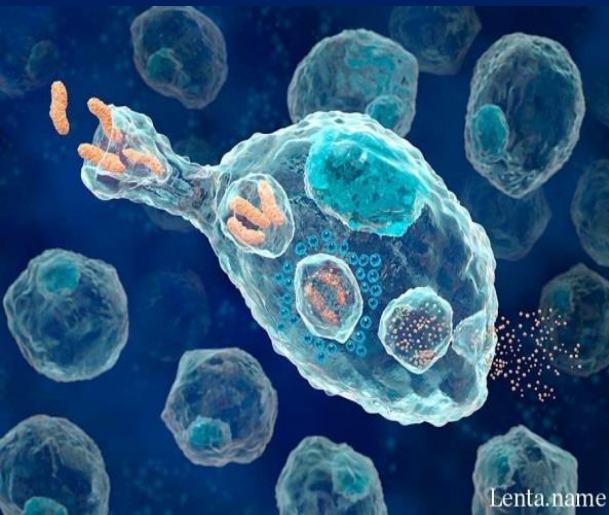


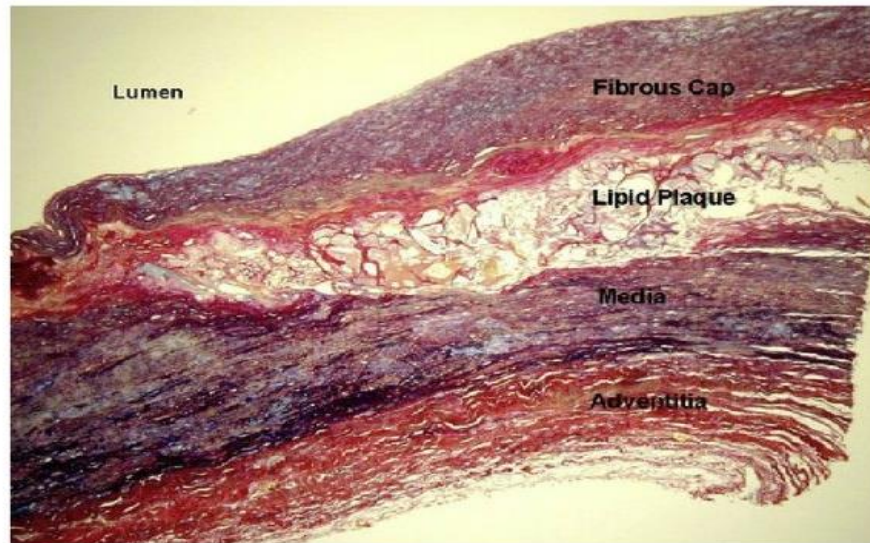
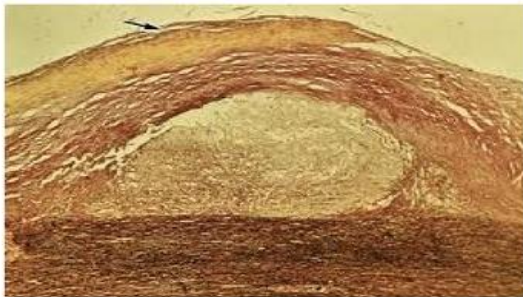


МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК: АКТУАЛЬНОСТЬ И ПЕРСПЕКТИВЫ

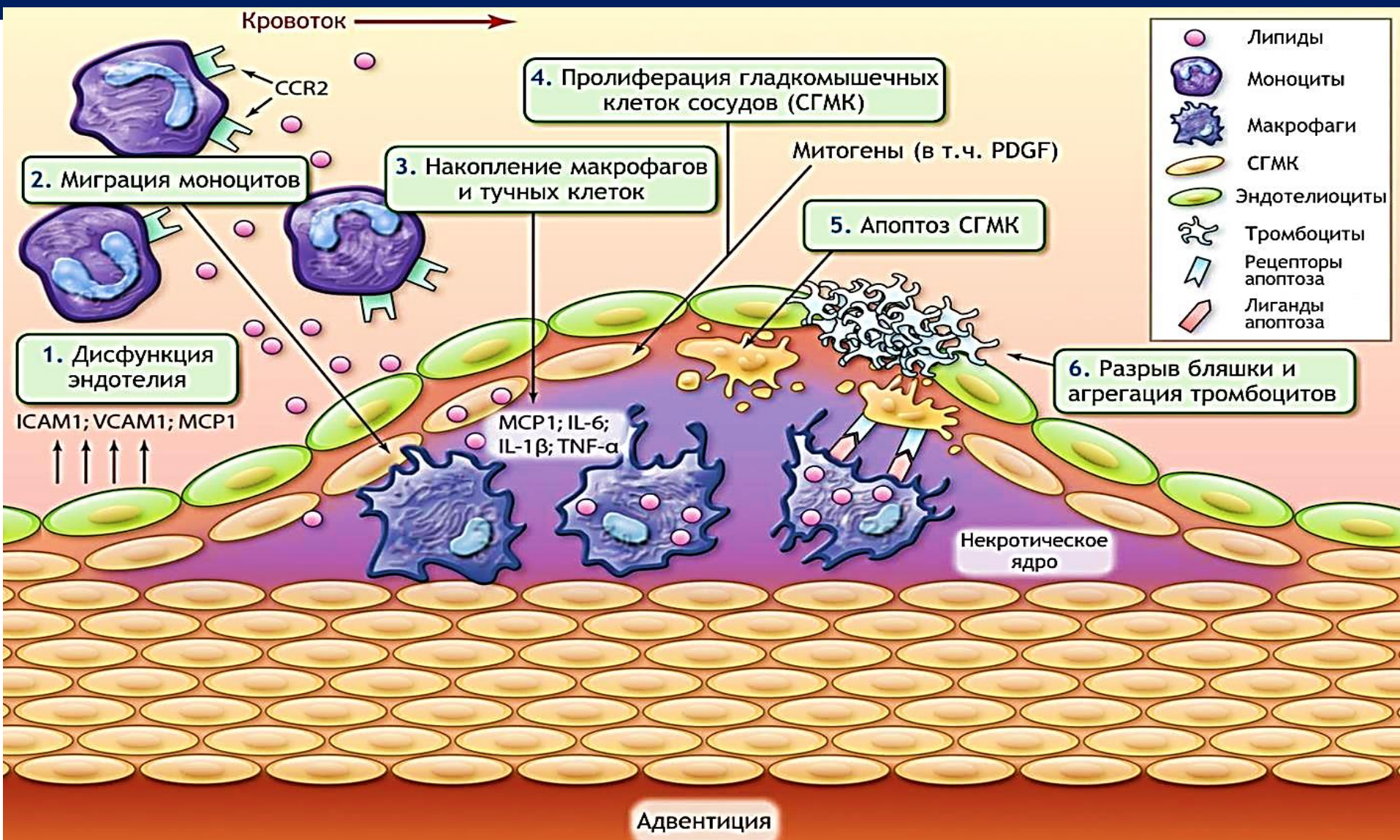


Атеросклеротическая бляшка (АСБ)

- это изменение стенки сосуда в результате накопления в ней липидов, фибрина, гладкомышечных, пенистых клеток и ионов кальция.



Формирование АСБ



Последствия формирования АСБ:

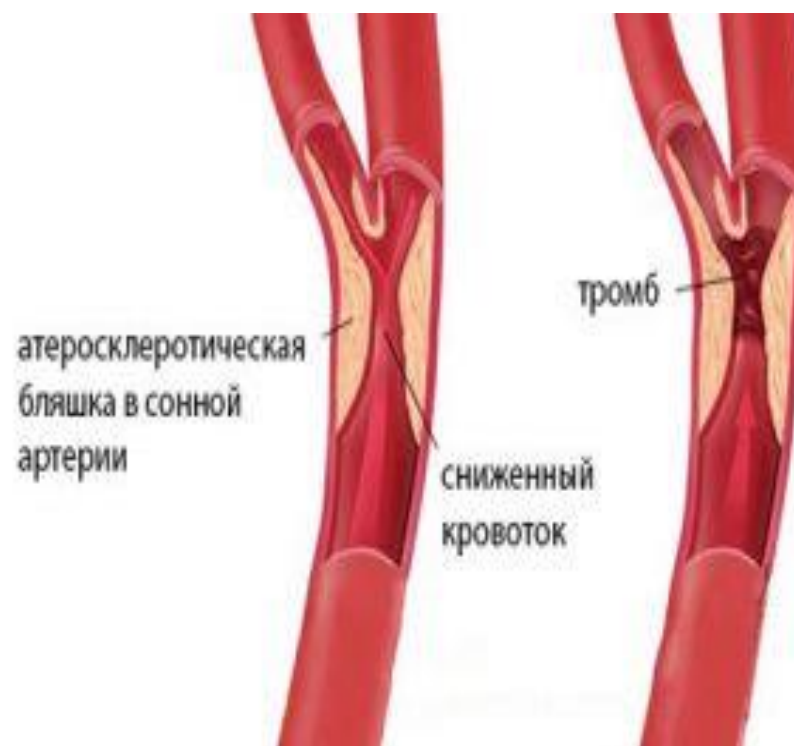
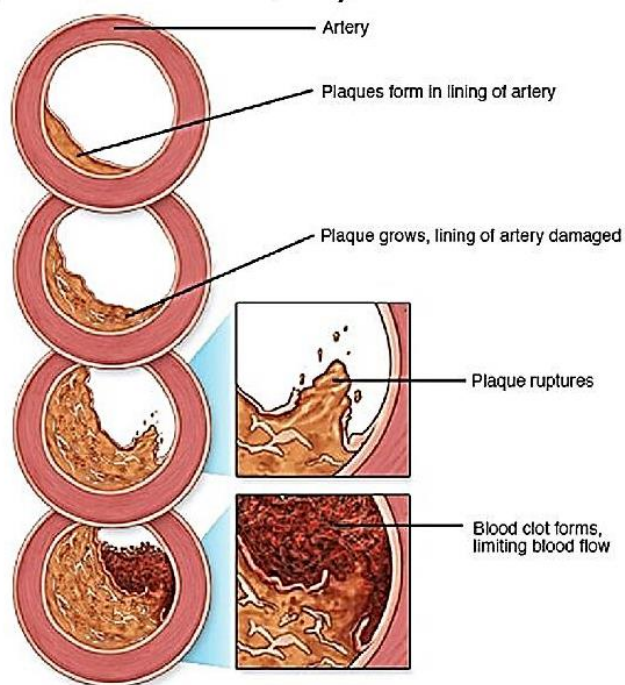
1. АСБ выступая в просвет сосуда, вызывает его сужение и затрудняет нормальный кровоток.
2. Развитие ишемии органов.



Последствия формирования АСБ:

3. Формирование тромба на поверхности АСБ и закупорка сосуда.

4. При повреждении АСБ содержимое может попасть в кровь и стать причиной тромбоза артерий сердца, мозга и других органов.



Виды АСБ:

ПО СТРУКТУРЕ (ПО ЭХОГЕННОСТИ):

гомогенные и гетерогенные;

ПО РАСПРОСТРАНЕННОСТИ

(относительно поперечного сечения сосуда):

локальные, концентрические, полуконцентрические;

ПО ФОРМЕ ПОВЕРХНОСТИ:

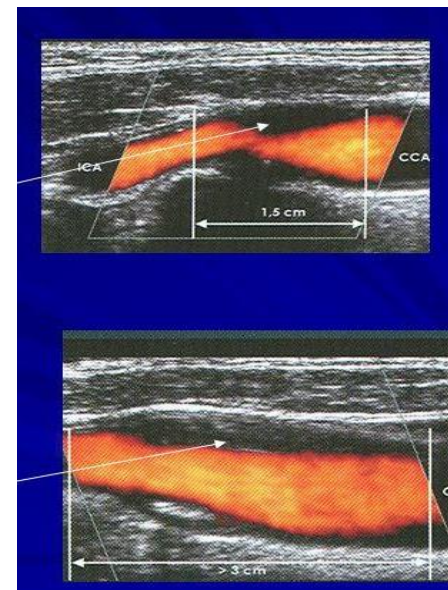
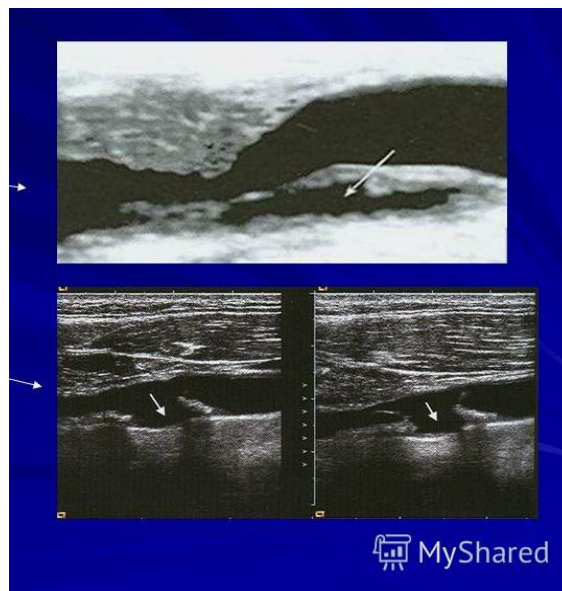
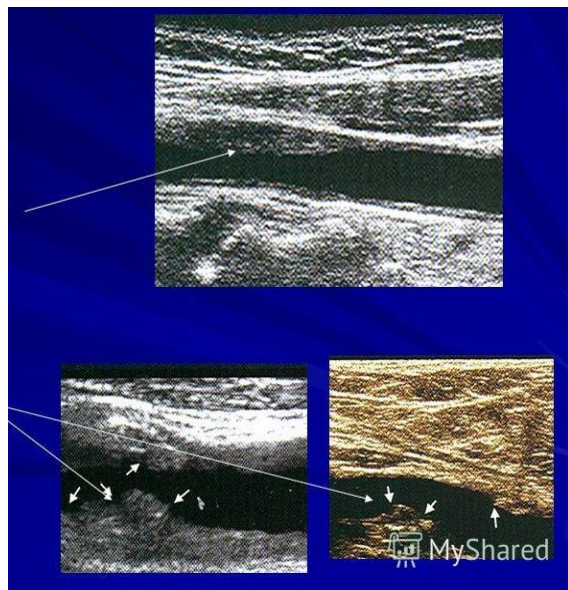
с ровной и неровной

ОСЛОЖНЕННЫЕ:

с кровоизлияниями и с изъязвлениями.

ПО РАСПРОСТРАНЕННОСТИ

(относительного продольного сечения сосуда):
локальные и пролонгированные



Методы изучения АСБ

```
graph TD; A[Методы изучения АСБ] --> B[Инструментальные]; A --> C[Лабораторные]; B --> D[различные виды томографии: позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), магнитно-резонансная томография (МРТ), мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ), а также внутрисосудистое ультразвуковое исследование]; D --> E[Основная цель: установление местоположения, визуализация, оценка риска дестабилизации и разрыва бляшки]; C --> F[Гистологическое исследование, иммуногистохимия и проточная цитометрия]; F --> G[Основная цель: количественная и качественная оценка клеточного состава бляшек];
```

Инструментальные

различные виды томографии: позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), магнитно-резонансная томография (МРТ), мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ), а также внутрисосудистое ультразвуковое исследование

Основная цель:
установление местоположения, визуализация, оценка риска дестабилизации и разрыва бляшки

Лабораторные

Гистологическое исследование, иммуногистохимия и проточная цитометрия

Основная цель:
количественная и качественная оценка клеточного состава бляшек

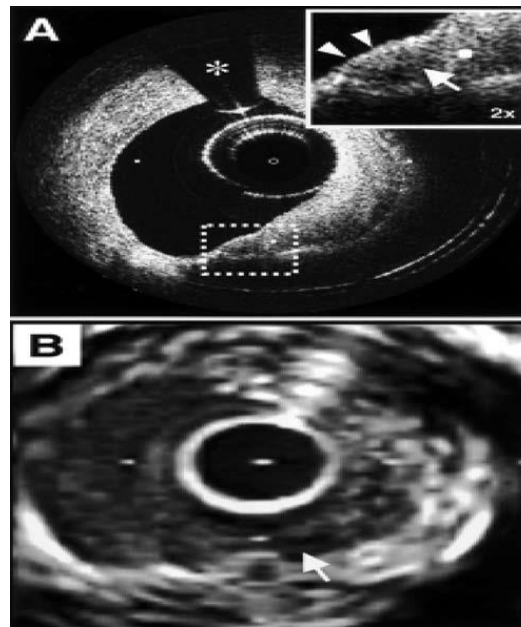
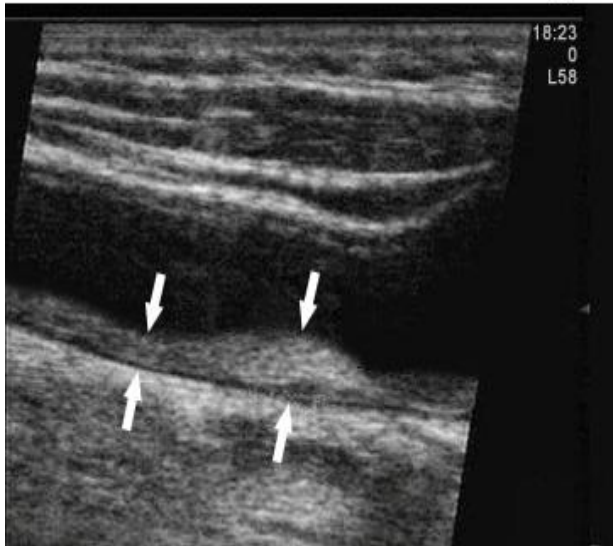
Инструментальные методы изучения АСБ

УЗИ

Оптическая когерентная томография (ОКТ)

Ангиография

Результаты исследования УЗИ отражающие наског после 3-х месячного курса /



Основная цель: установление местоположения, визуализация, оценка риска дестабилизации и разрыва бляшки

Лабораторные методы изучения АСБ

Гистологическое исследование

Основная цель: изучение
качественного состава АСБ



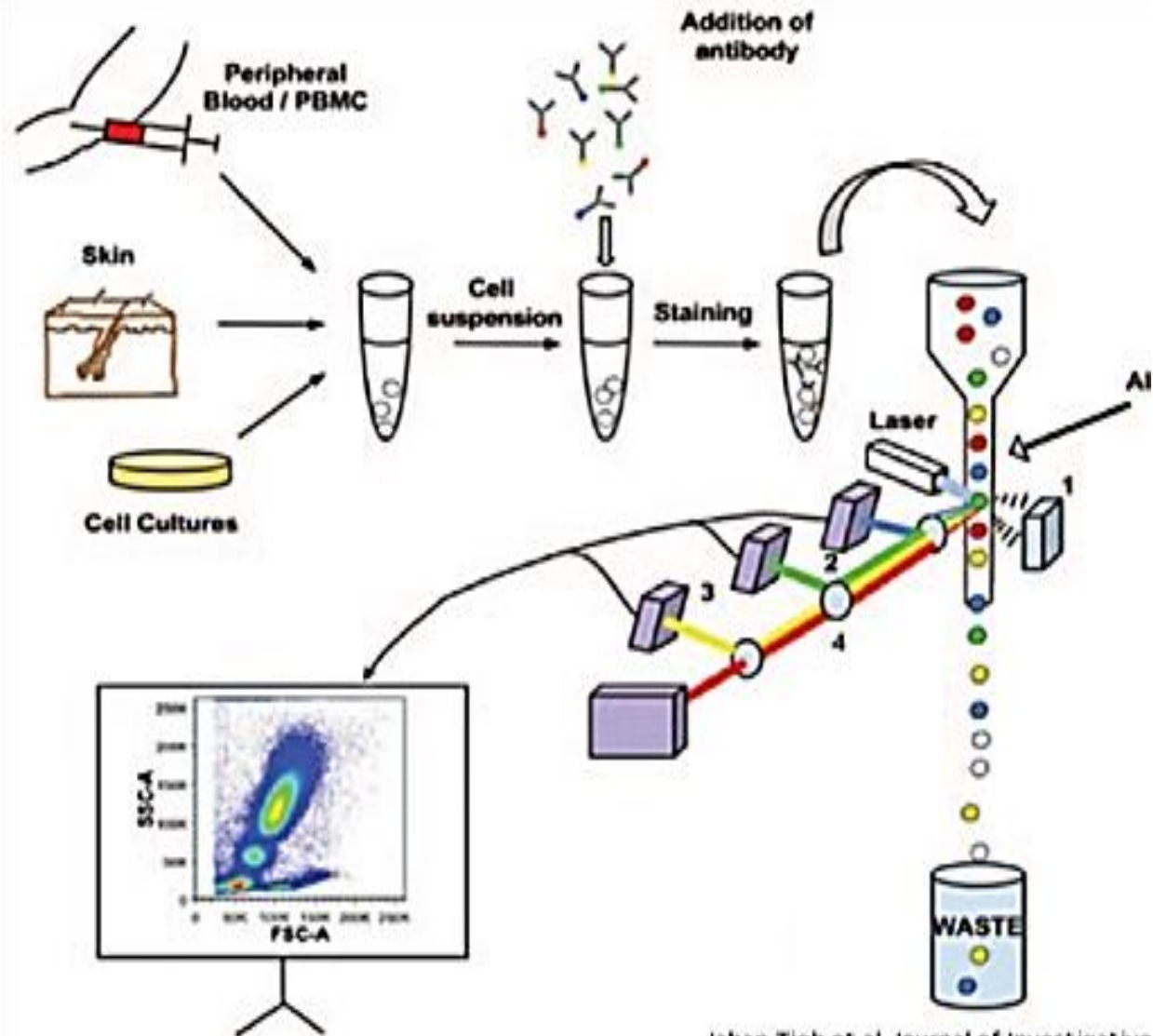
Гистологическая картина атеросклеротической бляшки в коронарной артерии.

(а) Общий вид поперечного среза сосуда и бляшки. Видны фиброзная покрышка (F) и зона центрального некроза (C), состоящая в основном из липидов (липидное ядро). Просвет (L) умеренно сужен. Обратите внимание, что сегмент сосудистой стенки свободен от бляшки (стрелка), т.е. бляшка расположена по краю стенки.

На этом срезе коллаген имеет синий цвет (окрашивание по Массону). (б) Тот же срез при большем увеличении. Видно, что внутренняя и наружная эластические мембраны изменены, а медиа стенки артерии истончена под наиболее развитой частью бляшки (стрелка) (окрашивание на эластин). (в) Место соединения фиброзной покрышки и центральной части при еще большем увеличении. Видны рассеянные воспалительные клетки, кальцификаты (острия стрелок) и новообразованные сосуды (стрелки).

Лабораторные методы изучения АСБ

Проточная цитометрия



Методы изучения АСБ

```
graph TD; A[Методы изучения АСБ] --> B[Инструментальные]; A --> C[Лабораторные]
```

Инструментальные

Лабораторные

ВОПРОСЫ:

?

Какова
функциональная
активность клеток,
входящих в состав
АСБ?

?

Какими методами
можно оценить
функциональную
активность клеток,
входящих в состав
АСБ?

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: разработка способа оценки функциональной активности клеток, выделенных из АСБ

Задачи:

1

- провести обзор имеющихся методов исследования АСБ;

2

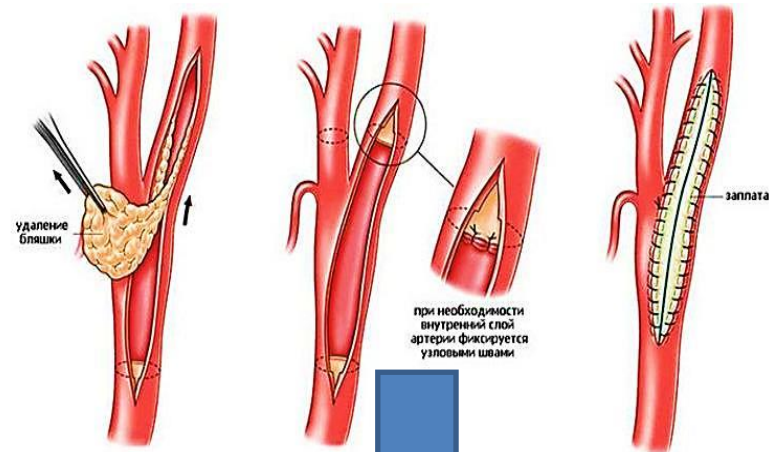
- разработать новый способ исследования АСБ;

3

- оценить функциональную активность клеток, выделенных из АСБ с помощью нового способа.

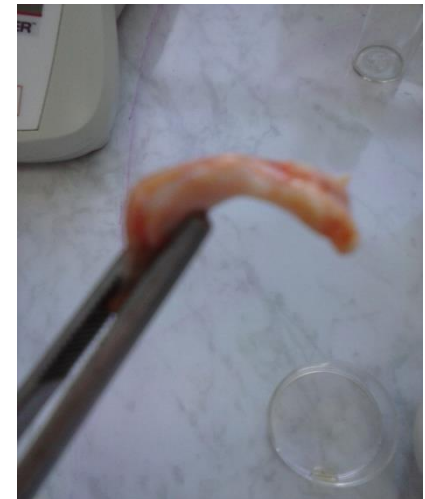
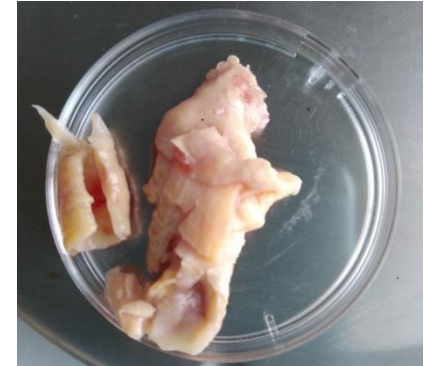
Методы получения бляшек

- АСБ получают в ходе плановых операций в результате **эндартерэктомии**.
- Транспортировка в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI) - 1640 при комнатной температуре.
- Использование этой среды обусловлено тем, что ее состав разработан для культивирования именно лимфоидных клеток.



Методы предварительной обработки АСБ

- Полученный материал подвергают **обработке в фосфатно-солевом буфере (ФСБ)** для удаления мононуклеарных клеток периферической крови.
- При необходимости проводят **декальцинирование** в этилендиаминтетрауксусной кислоте.
- АСБ обязательно подвергают **макроскопическому исследованию**.
- При этом оцениваются изъязвления поверхности бляшек, наличие тромбов, кровоизлияния в бляшки, разрывы и надрывы, степень стенозирования просвета артерий, наличие обызвествления и другие изменения.



Виды исследования АСБ

Измельчение биоптатов
АСБ и обработка
моноклональными
флюоресцентными
антителами

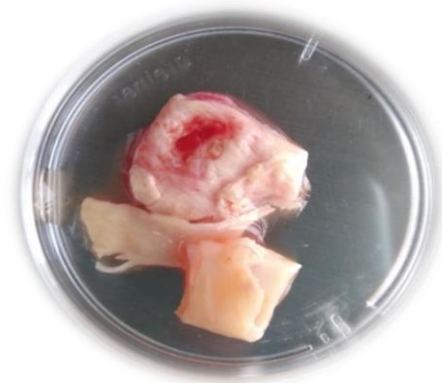
Гистологическое
исследование, ИГХ и ПЦ

Заморозка АСБ в жидком
азоте

Изучение биохимического
состава и продукции
цитокинов (ИФА)

Культивирование
выделенных из АСБ
клеток

Изучение качественного и
количественного состава



Методы выделения клеток

Механическое экстрагирование

Для культивирования используют эндотелиальные, гладкомышечные клетки стенок интима медиа, а также лейкоциты (лимфоциты, макрофаги), входящие в состав АСБ или биоптата артерии.



Лабораторный гомогенизатор



Ферментативная дезагрегация (коллагеназа)

1. коллагеназа IV («Invitrogen») сохранение большинства поверхностных маркеров (Ж.-Ш. Гривель и др., 2012);
2. коллагеназы II типа (Worthington Diagnostic System, США) (Чернова Е.В. и др. (2013).

Методы оценки жизнеспособности выделенных клеток

Для определения фенотипа
лимфоцитов – реактив,
реагирующий с
аминогруппой **PACIFIC
ORANGE** («Invitrogen», США)
(Лебедева А.М. и др., 2012).

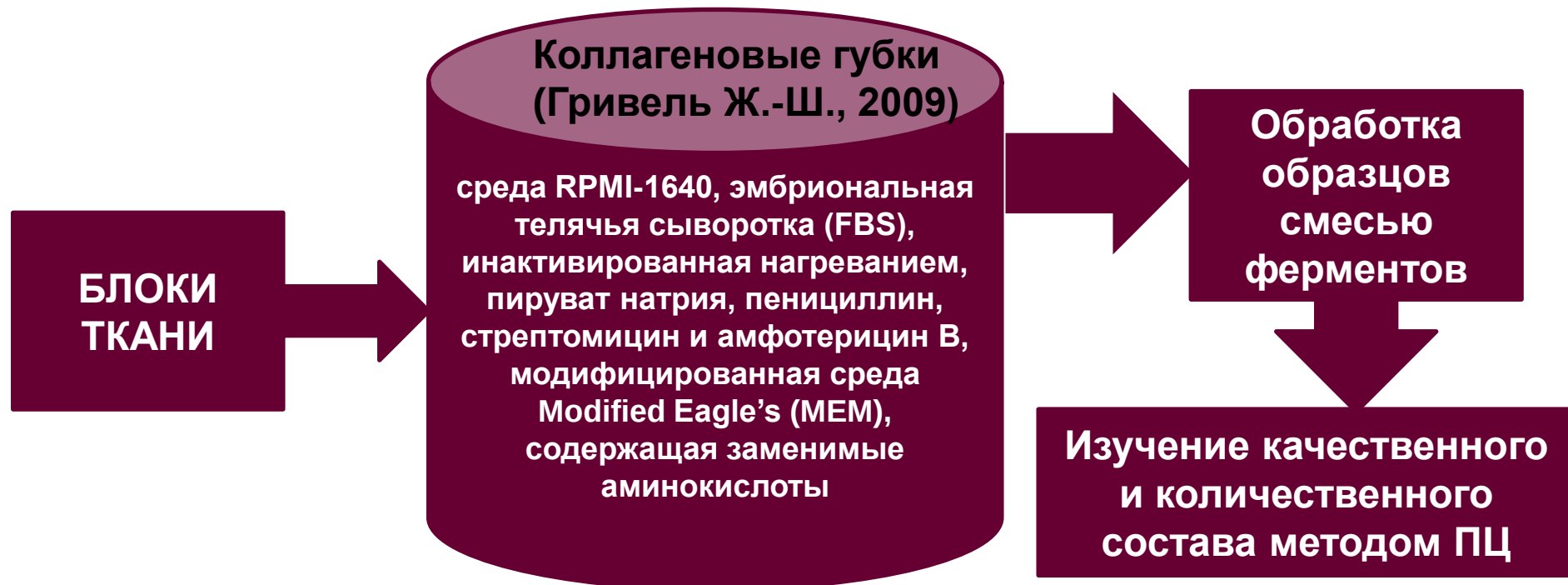
Для оценки
жизнеспособности клеток
использовались
ТРИПАНОВЫЙ СИНИЙ и
флуоресцентные красители
(пропидий йодида)
(Shalhoub J., et. al. 2016).

**ВО ВСЕХ ОБРАЗЦАХ ВЫЖИВАЕМОСТЬ
КЛЕТОК ДОСТИГАЛА БОЛЕЕ 95%**

Методы культивирования участков артерий, пораженных атеросклерозом

Методы культивирования участков артерий с АСБ с целью изучения развития АСБ описаны в работах Лебедевой А.М. и др. (2012).

Инкубация 12 дней с 5% CO₂ при 37°C, каждые три дня образцы тканей фиксировались в 2% параформальдегиде и их жизнеспособность оценивалась с помощью гистологии.

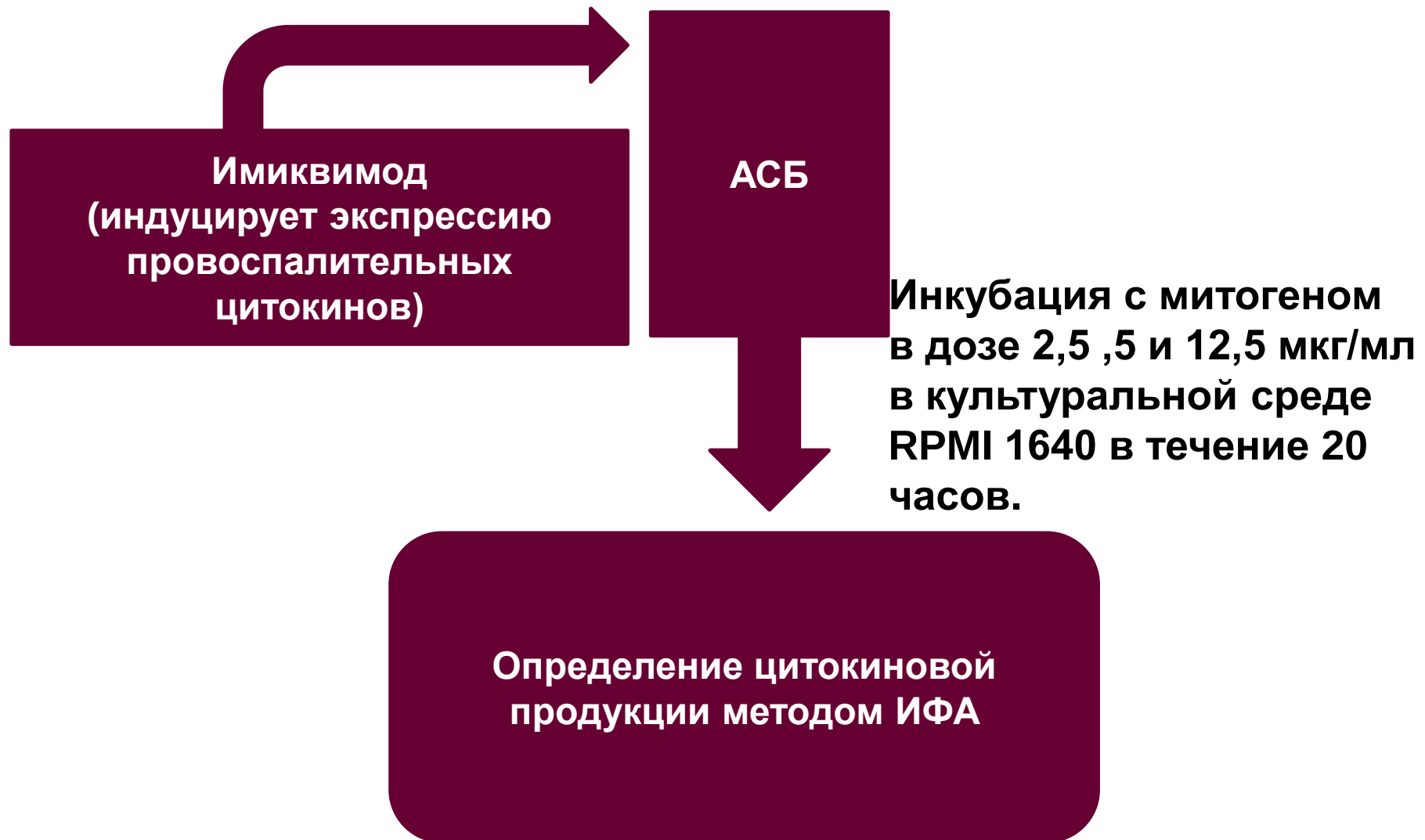


**Таблица 1 – Клетки, входящие в состав АСБ
(на основании данных ИГХ и ПЦ)**

Кластеры дифференцировки (маркеры)	Клетки врожденного иммунитета
M1 (CD 68) и M2 (CD 163)	Макрофаги
CD66b	Гранулоциты
CD16,CD56	Натуральные киллеры NK – клетки
CD1a, CD1c, CD1d и молекул CD83, CD80, CD86 и DC-SIGN	Дендритные клетки
Кластеры дифференцировки (маркеры)	Клетки адаптивного иммунитета
CD3+ CD4+	Т – лимфоциты хелперы (Th1)
CD3+ CD8+	Т – лимфоциты киллеры (Th2)
CD19	В-лимфоциты
CD4+CD25+	Treg (Th3)
(D57+ CD8+	NKT – клетки

По данным: Гривель Ж.-Ш., Иванова О. И., Пинегина Н. В. и др., 2012; Profumo E., Buttari B, Tosti ME et al., 2012; Vorobyova D.A., Lebedev A.M., Vagida M.S., et al. 2016; Karadimou G., Folkersen L., Berg M. et.al. 2017; Leroyer A.S., Isobe H., Lesèche G. et.al., 2007, Cai L, Yu L, Liu S, 2017.

Культивирование клеток с добавлением стимуляторов пролиферации (G. Karadimou, et. al., 2017)



Методы определения цитокинов в АСБ

(Рагино Ю.И. (2012) и Шишкина В.С. и др. (2014))

Замороженные в жидком азоте образцы АСБ



```
graph TD; A[Замороженные в жидком азоте образцы АСБ] --> B[Гомогенизация в ФСБ с коктейлем ингибиторов протеаз]; B --> C[Центрифугирование]; C --> D[Супернатант используется для определения цитокинов в гомогенате методом ИФА с использованием наборов ELISA (наборы фирм BCM Diagnostics, Bender Medsystems, Biomedica)];
```

Гомогенизация в ФСБ с коктейлем ингибиторов протеаз

Центрифугирование

Супернатант используется для определения цитокинов в гомогенате методом ИФА с использованием наборов ELISA (наборы фирм BCM Diagnostics, Bender Medsystems, Biomedica)

Таблица 2 – Цитокины, обнаруженные в АСБ

ЦИТОКИНЫ

ПРОВОСПАЛ ИТЕЛЬНЫЕ ИЛ:

TNF - А,
IFN-Г,
IL-1В, IL-2, IL-
4, IL-5, IL-6,
IL-7, IL-8, IL-
12, IL-15, IL-
17, IL-18:

ПРОТИВОСП АЛИТЕЛЬНЫ Е ИЛ: IL-10

ФАКТОРЫ РОСТА: GM-CSF, TGFB-1, M-CSF

ХЕМОКИНЫ: MCP-1, CРБ, EMAP-II, SICAM-1, SVCAM-1, CCL3, CCL18, CCL24, CCL5, CCL20, CXCL9

ФЕРМЕНТЫ: MMP-3, MMP-9

Гривель Ж.-Ш., Иванова О. И., Пинегина Н. В. и др., 2012; Рагино Ю.И., Чернявский А.М., Полонская Я.В. и др., 2012, Profumo E., Buttari B., Tosti M.E. et al., 2012; Шишкина В.С., Челомбитько М.А., Ефремова Ю.Е. и др., 2014 ; Auguet T., Aragonès G., Guiu-Jurado E., et al. 2016
Vorobyova D.A., Lebedev A.M., Vagida M.S., et al., 2016; Shalhoud J., Viiri L.E., Cross A.J.et. al., 2016
Cai L., Yu L., Liu S., et al. 2017; Maione A. S., Cipolletta E., Sorriento D. et al., 2017; Karadimou G., Folkersen L., Berg M. et.al. 2017

Решение задачи 1



Этапы работы с атеросклеротическими бляшками

(по данным Leroyer A.S. et.al., 2007; Гривель Ж.-Ш. и др., 2012; Profumo E. et.al., 2012; Рагино Ю.И. и др. 2014; Шишкина В.С. и др., 2014; Vorobyova D.A. et.al., 2016; Shalhoud J.et. al., 2016; Karadimou G. et.al. 2017)

Решение задачи 1

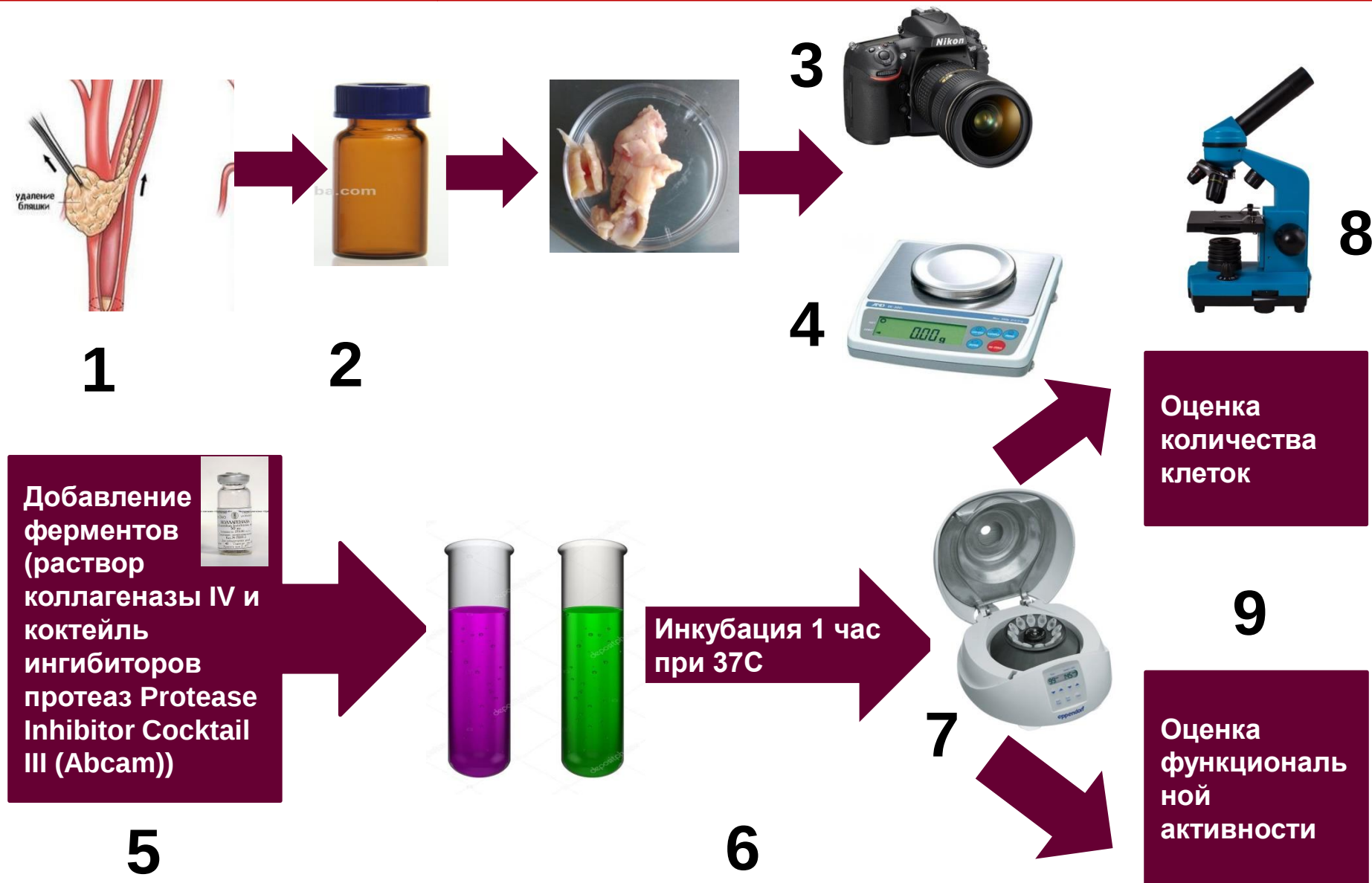


Этапы работы с атеросклеротическими бляшками

(по данным Leroyer A.S. et.al., 2007; Гривель Ж.-Ш. и др., 2012; Profumo E. et.al., 2012; Рагино Ю.И. и др. 2014; Шишкина В.С. и др., 2014; Vorobyova D.A. et.al., 2016; Shalhoud J.et. al., 2016; Karadimou G. et.al. 2017)

Решение задачи 2

Способ оценки функциональной активности лейкоцитов, входящих в состав атеросклеротических бляшек



**Способ оценки функциональной активности
лейкоцитов, входящих в состав
атеросклеротических бляшек**

Изучение выделенных клеток

**1. Оценка
количества
выделенных
клеток**

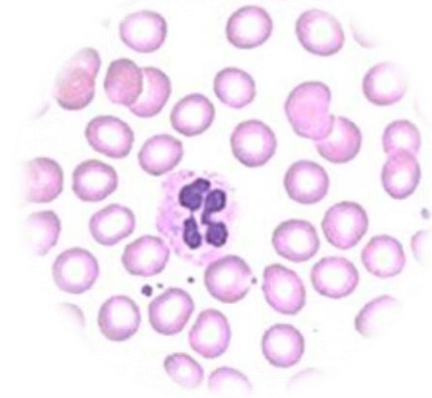
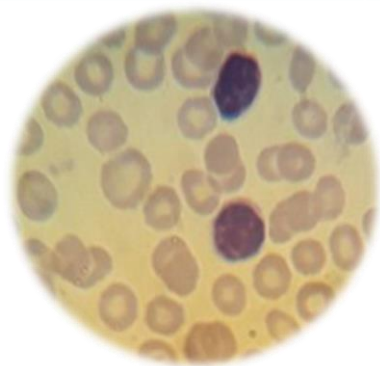
**2. Оценка
резервных
возможностей
клеток**

**3. Оценка
фагоцитарной
активности
клеток**

Решение задачи 3

Таблица 3 - Результаты количественного содержания и фагоцитарной активности лейкоцитов, выделенных из АСБ

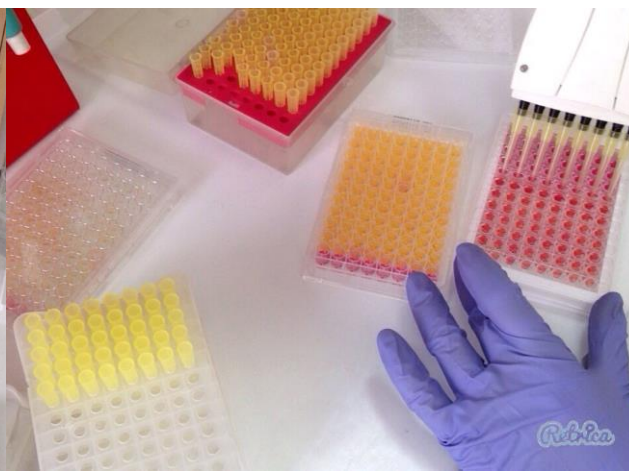
Выживаемо сть клеток, %	Количество жизнеспособ ных клеток, лейк./г	Фагоцитарны й индекс, %	Фагоцитарное число, абс. ед.
96	$15,3 \times 10^4$	58	2
98	$542,5 \times 10^4$	52	3



Решение задачи 3

Таблица 4 - Результаты определения цитокиновой продукции лейкоцитами, выделенными из АСБ методом ИФА

Цитокины	Спонтанная продукция (ср.арифм., мин. и макс.)	ФГА-индуцированная (ср. арифм.)	Индекс стимуляции
ИЛ-1 β	21,4 (15,5; 45,3)	15,5	0,83
ИЛ-18	18,6 (0,0; 34,9)	1,2	0,10
ФНО α	12,1 (10,8; 46,4)	12,1	0,85

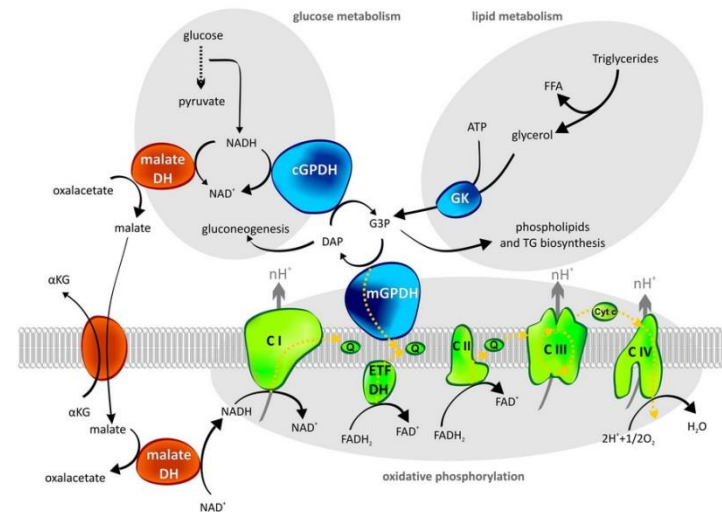
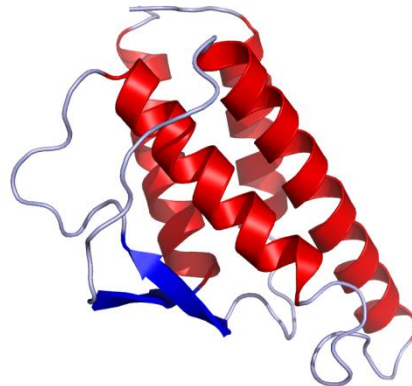
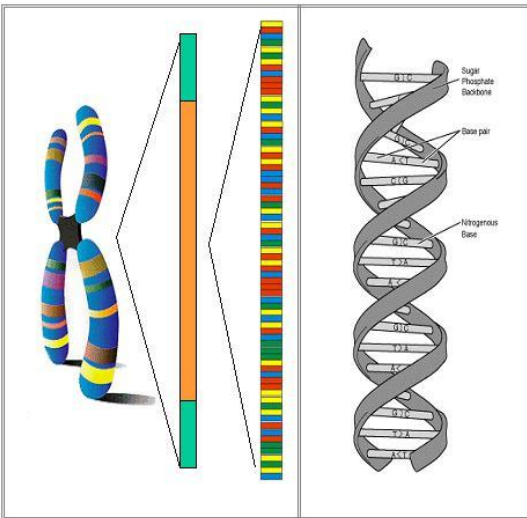


ВЫВОДЫ:

- 1. Имеющиеся методы исследования направлены на изучение локализации и клеточного состава АСБ.**
- 2. Разработан новый способ исследования АСБ, а именно способ оценки функциональной активности клеток, выделенных из АСБ.**
- 3. Фагоцитарная активность и резервные возможности лейкоцитов, входящих в состав АСБ снижены.**

Перспективы исследования:

- Разработка методов таргетной терапии на основе новых знаний об иммунопатогенезе АСБ
- Изучение метаболической активности лейкоцитов, выделенных из АСБ;
- Изучение полиморфизма генов цитокинов, принимающих участие в развитии атеросклероза.





СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!