



УДК 57.086.16, 611.13, 611.14, 611.161

DOI 10.17802/2306-1278-2022-11-3-162-176

СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ СОСУДИСТЫХ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК – УНИВЕРСАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ СОСУДОВ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА

Л.А. Богданов, Е.А. Великанова, А.Ю. Каноныкина, А.В. Фролов, Д.К. Шишкова,
А.И. Лазебная, А.Г. Кутихин

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновый бульвар, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Основные положения

- Показано, что использование маркеров сосудистых гладкомышечных клеток, к примеру тяжелых цепей миозина гладких мышц (SM-МНС) и альфа-актина гладких мышц (α -SMA), для иммунодетекции сосудов микроциркуляторного русла сосудистой стенки (vasa vasorum) предпочтительнее применения эндотелиальных маркеров (CD31 и VE-кадгерин), поскольку позволяет определять сосудистую геометрию вне зависимости от артефактов пробоподготовки и обеспечивает идеальное соотношение «сигнал – шум».
- За исключением эластических мембран, позволяющих дифференцировать артериолы от венул и капилляров, в тканях сосудов взрослого человека не выявлено специфичных маркеров артериальной, венозной и капиллярной дифференцировки, хотя в аортах крыс маркерами венозной дифференцировки служили транскрипционные факторы KLF2 и PROX1, а маркером капиллярной дифференцировки – транскрипционный фактор HEY1.

Цель

Разработать оптимальный способ детекции сосудов микроциркуляторного русла и оценить подходы к дифференциальному окрашиванию артериол, венул и капилляров на примере сети vasa vasorum большой подкожной вены (БПВ) человека и аорты крысы.

Материалы и методы

Для исследования использовали сегменты БПВ, извлеченные в процессе коронарного шунтирования, а также аорты нормолипидемических и нормотензивных крыс Wistar. Серийные криосрезы анализировали при помощи окрашивания гематоксилином и эозином, пентахромного окрашивания по Расселлу – Мовату, иммунофлюоресцентного окрашивания на маркеры эндотелиальных клеток (ЭК) (CD31 и VE-кадгерин), сосудистых гладкомышечных клеток (СГМК) (SM-МНС и α -SMA), механочувствительных транскрипционных факторов (KLF2 и KLF4), транскрипционные факторы артериальной дифференцировки (HES1, HEY1, ERG), транскрипционные факторы и маркеры венозной дифференцировки (NR2F2, NRP2), транскрипционные факторы и маркеры лимфатической дифференцировки (PROX1, LYVE1, VEGFR3), а также иммуногистохимического окрашивания на маркеры венозной дифференцировки NR2F2. Готовые микропрепараты анализировали посредством световой и конфокальной микроскопии.

Результаты

В сравнении с маркерами ЭК (CD31 и VE-кадгерин) маркеры СГМК (SM-МНС и α -SMA) позволяли осуществлять объективную визуализацию и оценку сосудистой геометрии и обеспечивали максимальное соотношение «сигнал – шум» независимо от вида маркера, типа сосуда или антитела. Аутофлюоресценция и специфичный гистологический паттерн эластических мембран в ходе окрашивания по Расселлу – Мовату позволяли дифференцировать артериолы от остальных сосудов микроциркуляторного русла. Несмотря на то что иммуноокрашивание аорт крыс показало специфичные маркеры венозного (KLF2 и PROX1) и капиллярного (HEY1) эндотелия, данные находки не нашли подтверждения при иммуноокрашивании БПВ человека. Таким образом, специфичных маркеров венул и капилляров в тканях взрослого человека не идентифицировано, несмотря на анализ широкой палитры классических маркеров различных эндотелиальных дифферонов.

Для корреспонденции: Лев Александрович Богданов, bogdanovleone@gmail.com; адрес: Сосновый бульвар, 6, Кемерово, Россия, 650002

Corresponding author: Leo A. Bogdanov, bogdanovleone@gmail.com; address: 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russia, 650002

Заключение

Для иммунодетекции сосудов микроциркуляторного русла целесообразно использовать маркеры СГМК (SM-МНС и α -SMA), а не маркеры ЭК (CD31 и VE-кадгерин). Отсутствие специфичных маркеров дифференцировки микрососудов (в частности vasa vasorum) позволяет предположить пентахромное окрашивание по Расселлу – Мовату в качестве оптимальной опции для машинного обучения нейронных сетей с целью анализа сосудов микроциркуляторного русла.

Ключевые слова

Vasa vasorum • Сосуды микроциркуляторного русла • CD31 • VE-кадгерин • SM-МНС • α -SMA

Поступила в редакцию: 30.06.2022; поступила после доработки: 15.08.2022; принята к печати: 06.09.2022

VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL CONTRACTILE PROTEINS AS UNIVERSAL MARKERS OF VESSELS OF MICROCIRCULATORY BED

L.A. Bogdanov, E.A. Velikanova, A.Yu. Kanonykina, A.V. Frolov, D.K. Shishkova, A.I. Lazebnaya, A.G. Kutikhin

Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

Highlights

- The use of vascular smooth muscle cell markers, e.g. smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC) and alpha smooth muscle actin (α -SMA) for immunodetection of adventitial and perivascular microvessels (vasa vasorum) is preferable over endothelial markers (CD31 and VE-cadherin) as it allows to define vascular geometry regardless of sectioning artifacts and provides ideal signal-to-noise ratio.
- Aside from elastic laminae which discriminate arterioles from venules and capillaries, we were unable to confirm any specific markers of arterial, venous, and capillary differentiation, although KLF2 and PROX1 transcription factors indicated venous specification and HEY1 suggested capillary identity in rat aortas.

Aim

To develop an optimal approach to detection of microvessels and to evaluate the techniques for the differential immunostaining of arterioles, venules, and capillaries in human saphenous veins and rat aortas.

Methods

Saphenous veins excised during the coronary artery bypass graft surgery were used for the study. Serial cryosections were analyzed by means of haematoxylin and eosin and Russell-Movat's pentachrome stainings and by immunofluorescent staining for endothelial cell markers (CD31 and VE-cadherin), vascular smooth muscle cell markers (SM-MHC and α -SMA), mechanosensitive transcription factors (KLF2 and KLF4), transcription factors of arterial specification (HES1, HEY1, ERG), transcription factors and markers of venous identity (NR2F2, NRP2), and transcription factors and markers of lymphatic lineage (PROX1, LYVE1, VEGFR3). Samples were visualized by light and confocal microscopy.

Results

In comparison with endothelial cell markers (CD31 and VE-cadherin), vascular smooth muscle cell markers (SM-MHC and α -SMA) permitted objective evaluation of vascular geometry and maximized signal-to-noise ratio irrespective of specific marker, microvessel specification or antibody used. Autofluorescence and specific histological pattern of elastic membranes at Russell-Movat's pentachrome staining allowed to discriminate arterioles from venules and capillaries. Albeit immunostaining of rat aortas found specific markers of venous endothelial cells (KLF2 and PROX1) and capillary endothelial cells (HEY1), these findings have not been confirmed in saphenous veins. We were unable to find specific markers of human venules and capillaries among the saphenous vein vasa vasorum despite an extensive screening of multiple markers.

Conclusion

Immunodetection of microvessels (e.g., vasa vasorum) should be performed by using vascular smooth muscle cell markers (SM-MHC and α -SMA) rather than endothelial cell markers (CD31 and VE-cadherin). Lack of specific markers to discern microvessels of different lineages suggests Russell-Movat's pentachrome staining as an optimal option for the machine learning of neural networks to analyse the microvessels including vasa vasorum.

Keywords

Vasa vasorum • Microvessels • CD31 • VE-cadherin • SM-MHC • α -SMA

Received: 30.06.2022; received in revised form: 15.08.2022; accepted: 06.09.2022

Список сокращений

БПВ – большая подкожная вена

ЭК – эндотелиальные клетки

СГМК – сосудистые гладкомышечные клетки

Введение

Микроциркуляция сосудистой стенки представлена в виде vasa vasorum (VV) и может иметь как нормальную, так и патологическую природу [1]. В физиологических условиях сосуды микроциркуляторного русла встречаются в первую очередь в сосудах, диаметр которых превышает 0,5 мм [2], однако в результате гипоксии или воспаления их можно встретить даже в сосудах, толщина стенки которых меньше диффузионного предела [1]. У человека VV присутствуют в стенках крупных артериальных и венозных сосудов, включая коронарные артерии, аорту и ее ветви, в том числе межреберные артерии, отходящие от грудной аорты [2]. Различают артериальные, венозные и капиллярные VV, при этом артериальные подразделяются на vasa vasorum interna, которые берут свое начало из просвета сосуда, и vasa vasorum externa, расположенные в адвентиции и околососудистой жировой ткани. Также VV ветвятся на несколько порядков, где VV первого порядка располагаются вдоль сосуда, а второго – по его окружности [3]. Рост VV стимулируется ангиогенными факторами – например, индуцируемым гипоксией транскрипционным фактором HIF-1 α , а также основным фактором роста фибробластов (FGF2) и фактором роста сосуди-стого эндотелия (VEGF), экспрессируемыми сосуди-стыми гладкомышечными клетками (СГМК) мидии и фибробластами и макрофагами адвентиции. При ингибировании ангиогенеза в первую очередь подвергаются инволюции VV второго порядка [4].

При повреждении или дисфункции эндотелия патофизиологический ответ сосудистой стенки возникает прежде всего в адвентиции: в частности, увеличиваются количество и диаметр просвета VV, что приводит к миграции макрофагов в интиму, накоплению в сосуде воспалительных клеток, ацидификации (закислению) микроокружения и расширению сети VV по принципу положительной обратной связи [5]. Таким образом, VV являются ключевыми анатомическими путями формирова-

ния и гипертрофии неоинтимы при сосуди-стом воспалении, рестенозе и атеросклерозе [2–4]. Можно предположить, что разные типы VV, представленные артериолами, венаулами и капиллярами, могут вносить различный вклад в патогенез заболеваний сосуди-стой стенки.

В патоморфологической диагностике с целью дифференцировки лимфатических и кровеносных сосудов используют различные сосуди-стые маркеры [6]. В качестве маркеров эндотелия лимфатических сосудов, как правило, рассматривают PROX1 (Prospero homeobox protein 1), LYVE1 (рецептор лимфатического эндотелия к гиалуроно-вой кислоте) [7], VEGFR3 (рецептор 3 к фактору роста сосуди-стого эндотелия) и подоплатин (один из гликозилированных мембранных гликопротеинов) [8]. Маркерами кровеносных сосудов являются панэн-дотелиальный рецептор CD31 (PECAM1, тром-боцитарно-эндотелиальная молекула клеточной адгезии), CD34 (трансмембранный фосфогликози-лированный рецептор, обильно экспрессируемый в эндотелиальных клетках-предшественниках) и фактор фон Виллебранда (vWF), также экспресси-руемый в эндотелиальных клетках (ЭК) и обеспе-чивающий агрегацию тромбоцитов и их адгезию к клеточной стенке поврежденных сосудов с целью формирования тромба [9].

Несмотря на теоретическую обоснованность и широкое распространение в патоморфологии, вышеуказанные подходы к определению кровенос-ных сосудов обладают рядом недостатков. Так, при микро- или криотомной резке гистологических препаратов (в особенности препаратов элементов системы кровообращения) просвет кровеносных сосудов часто спадается или вовсе исчезает, что не позволяет адекватно оценить их геометрию. Дан-ная проблема имеет особую актуальность при под-готовке серийных срезов, требующих максимально близкого совпадения гистологической картины для сравнительного анализа, в особенности иммуно-гистохимического или иммунофлюоресцентного.

Кроме того, размеры ЭК ограничивают работу с некоторыми антителами, не позволяя получать качественное соотношение «сигнал – шум» в случае недостаточной специфичности антител.

Отдельной проблемой патоморфологического анализа служит несоответствие описываемых в литературе маркеров сосудов артериального и венозного русла (зачастую идентифицированных на моделях для изучения биологии развития) реальным окрашивания клинических образцов. По этой причине не будет преувеличением говорить об отсутствии специфических маркеров, способных дифференцировать артериолы и венулы в элементах системы кровообращения человека (к примеру, с целью уточнения вклада различных типов сосудов внутри микрососудистой сети в развитие сосудистого воспаления).

Цель данной работы – разработка оптимальных способов детекции кровеносных сосудов и оценка подходов к дифференциальному окрашиванию артериальных, венозных и капиллярных сосудов микроциркуляторного русла (на примере сети VV большой подкожной вены (БПВ) человека и аорты крысы).

Материалы и методы

В работе использованы сегменты БПВ ($n = 13$), полученные в процессе коронарного шунтирования (кардиохирургическое отделение федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (НИИ КПССЗ)), а также сегменты брюшной аорты нормолипидемических и нормотензивных крыс Wistar (самцы, возраст 3–4 мес., масса тела 300–350 г). Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (протокол № 06217-АФ). До включения в исследование от всех пациентов получено письменное информированное согласие.

Оптимальным подходом к приготовлению срезов для иммунофлюоресцентного окрашивания является моментальное замораживание биоптатов в криосреде с последующей криотомной резкой, поскольку фиксация в формалине неизбежно приводит к скрыванию части эпитопов в результате сшивания белков; кроме того, процедура демаскировки эпитопов требует длительной оптимизации для каждого вида ткани и неизбежно сопряжена с нарушением целостности срезов [26]. Помимо этого, именно криосрезы целесообразно использовать для последующего виртуального гистологического окрашивания в случае разработки соответствующей технологии [27]. Поэтому после извлечения биоптаты немедленно промывали в физрастворе при помощи шприца и замораживали в специальной металлической форме с криогелем Tissue-Tek (4583, Sakura, США) при температуре $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$ пу-

тем погружения в сосуд Дьюара с жидким азотом. Полученные замороженные блоки хранили в низкотемпературной морозильной камере при температуре $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ до момента подготовки серийных гистологических срезов. Серийные срезы (по 20 стекол в серии) толщиной 7 мкм готовили при помощи криотома (CryoStar NX50, Thermo Scientific, США). До момента окрашивания стекла хранили в пластиковых контейнерах при температуре $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для оценки общего состояния тканей гематоксилином и эозином срезы фиксировали в 4% параформальдегиде, отмывали в бидистиллированной воде в течение 15 мин и далее проводили окрашивание по модифицированному протоколу производителя: ядра контрастировали гематоксилином Майера (DiaPath, Италия) на протяжении 10 мин, затем производили подсинение в проточной воде 5 мин, инкубировали в водно-спиртовом растворе эозина в течение минуты, обезвоживали в трех сменах 95% этанола по 15 с в каждой, просветляли в ксилоле в течение 3 мин и заключали под покровное стекло при помощи монтирующей среды Diamount на основе лимонена (DiaPath, Италия). Кроме того, фиксированные 4% параформальдегидом и отмытые срезы также окрашивали по Расселлу – Мовату посредством соответствующего набора (ab245884, Abcam, Великобритания) согласно протоколу производителя. Готовые микропрепараты анализировали при помощи светового микроскопа (AxioImager.A1, Carl Zeiss, Германия) на увеличениях $\times 200$ и $\times 400$.

Перед иммунофлюоресцентным окрашиванием стекла подогревали до комнатной температуры в течение 10 мин для предотвращения открепления срезов и далее фиксировали в ледяном ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) ацетоне в течение еще 10 мин, что обеспечивало фиксацию и пермеабиллизацию клеток. После этого стекла отмывали в трех сменах фосфатно-солевого буфера с pH 7,4, затем проводили блокировку неспецифического связывания антител путем инкубации с 1% солевым раствором бычьего сывороточного альбумина. В качестве первичных антител использовали моноклональные кроличьи и мышьиные антитела компаний Abcam и Novus Biologicals, разведенные в 1% солевом растворе бычьего сывороточного альбумина и таргетирующие следующие антигены:

Аорта крысы:

1) KLF2 (NBP2-61812, 1:200) в моноокрашивании и в сочетании с PROX1 (ab199359, 1:50), HEY1 (ab154077, 1:50), ERG (ab92513, 1:50) и KLF4 (ab215036, 1:50);

2) HES1 (ab108937, 1:50) в моноокрашивании.

БПВ человека:

1) CD31 (ab28364, 1:100 или ab9498, 1:500) в сочетании с SM-MHC (ab683, 1:250 или ab224804, 1:250);

2) VE-кадгерин (2500S, 1:250 или ab33168, 1:750) в сочетании с α -SMA (ab7817, 1:250);

3) KLF2 (NBP2-61812, 1:200) в моноокрашивании и в сочетании с HEY1 (ab154077, 1:100);

4) PROX1 (ab199359, 1:100) в моноокрашивании;

5) CD31 (ab9498, 1:500) в сочетании с LYVE1 (ab14917, 1:100), VEGFR3 (ab27278, 1:100) и NRP2 (ab185710, 1:100);

6) KLF4 (ab215036, 1:100) в моноокрашивании;

7) NR2F2 (ab41859, 1:50) в сочетании с HES1 (ab108937, 1:50) и ERG (ab92513, 1:50).

Антитела инкубировали во влажном закрытом коробе в течение 16 ч при температуре +4 °С. После трехкратной отмывки в фосфатно-солевом буфере с pH 7,4 стекла инкубировали со вторичными преадсорбированными антителами, конъюгированными с флюорофорами Alexa Fluor 488 (ab150061 и ab150109) и Alexa Fluor 555 (ab150062 и ab150110), в разведении 1:500 (1 час во влажном закрытом коробе при комнатной температуре). Далее стекла трехкратно отмывали в фосфатно-солевом буфере и производили контрастирование ядер путем инкубации в солевом растворе 0,01% DAPI (Sigma-Aldrich, D9542) в течение 30 мин. После отмывки в трех сменах фосфатно-солевого буфера с pH 7,4 стекла заключали в монтирующую среду ProLong Gold Antifade (Invitrogen, США). Готовые микропрепараты визуализировали при помощи конфокального микроскопа (LSM 700, Carl Zeiss) на увеличении $\times 400$.

После фиксации в ледяном ацетоне срезы также подвергали иммуногистохимическому окрашиванию с использованием набора Novolink Polymer Detection Systems Novocastra (RE7150-CE, Leica Biosystems, Германия) согласно модифицированному протоколу производителя. После блокировки эндогенной пероксидазы 4% раствором пероксида водорода в течение 5 мин (Peroxidase Block) срезы дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере, производили блокировку неспецифического связывания антител 0,4% солевым раствором казеина со вспомогательными реагентами (Protein Block) в течение часа и инкубировали с первичным антителом мыши к транскрипционному фактору венозной дифференцировки NR2F2 (ab41859, 1:500) в течение ночи в накрытом влажном коробе при температуре +4 °С. На следующий день срезы трижды отмывали в фосфатно-солевом буфере и инкубировали со вторичными антителами против мыши (Post Primary) в течение 30 мин. После трехкратной отмывки в фосфатно-солевом буфере инкубировали с третичным антителом кролика против мыши (Novolink Polymer) в течение 30 мин с последующей трехкратной отмывкой.

Далее срезы обрабатывали 0,087% раствором диаминобензидина (после разведения 1,74% диаминобензидина в его растворителе из набора) в течение 2 мин. Затем срезы отмывали бидистиллированной водой и помещали в гематоксилин Майера (DiaPath, Италия) на 10 мин. После подсинения в проточной

воде срезы обезвоживали в трех сменах 95% этанола (5 мин каждая), просветляли в трех сменах ксилола (5 мин каждая) и заключали под покровное стекло в монтирующую жидкость на основе заменителя ксилола (DiaPath). Готовые микропрепараты анализировали при помощи светового микроскопа (Axio Imager.A1, Carl Zeiss) и объектива EC Plan-Neofluar 20x/0.50 M27 (Carl Zeiss) на увеличении $\times 200$.

Результаты

Окрашивание гематоксилином и эозином позволило выявить развитую микрососудистую сеть в адвентиции венозной стенки, включающую в себя разные типы VV: артериолы (рис. 1, A), венулы (рис. 1, B) и капилляры (рис. 1, C). В отличие от окрашивания гематоксилином и эозином пентахромное окрашивание по Расселлу – Мовату позволило отчетливо визуализировать внутреннюю эластическую мембрану, являющуюся характерным признаком артериол (рис. 1, D–F).

Отличительной чертой внутренней эластической мембраны также была ее выраженная аутофлюоресценция в зеленом или синем каналах, позволяющая дифференцировать артериолы от других сосудов даже без специфического окрашивания флюоресцентно меченным антителом к эластину (рис. 2, A–D).

Окрашивание эндотелиальными и гладкомышечными маркерами показало непрерывный монослой ЭК, окруженных несколькими концентрически ориентированными слоями СГМК, при этом окрашивание на CD31/PECAM1 (тромбоцитарно-эндотелиальную молекулу клеточной адгезии) позволяло идентифицировать значительно более выраженный, но менее детализированный сигнал,

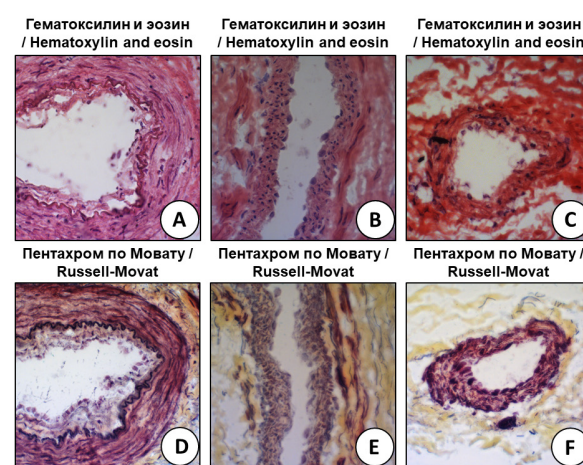


Рисунок 1. Адвентиция большой подкожной вены человека, сосуды микроциркуляторного русла: A, D – артериола; B, E – венула; C, F – капилляр. A–C: окрашивание гематоксилином и эозином, ув. $\times 400$; D–F: пентахромное окрашивание по Расселлу – Мовату, ув. $\times 400$

Figure 1. Vasa vasorum within the adventitia of the human saphenous vein: A, D – arteriole; B, E – venule; C, F – capillary. A–C: staining with hematoxylin and eosin, magnification $\times 400$; D–F: Russell-Movat pentachrome staining, magnification $\times 400$

чем окрашивание на белок межэндотелиальных контактов VE-кадгерин, независимо от видового происхождения первичного антитела (кролик или мышь) или флюоресцентной метки (Alexa Fluor 555 или Alexa Fluor 488) (рис. 2, *A–L*). Иными словами, флюоресцентно меченные антитела к CD31 позволяют более ярко окрасить эндотелий, а аналогичные антитела к VE-кадгерину – более тонко детализировать межклеточные контакты (рис. 2, *A–L*). Следует отметить, что антитела к CD31, как правило, окрашивают как латеральные поверхности, так и базальную поверхность ЭК, в то время как антитела к VE-кадгерину – исключительно латеральные поверхности (рис. 2, *A–L*). Окрашивание СГМК флюоресцентно мечеными антителами к тяжелым цепям миозина гладких мышц (SM-МНС) и альфа-актину гладких мышц (α -SMA) характеризовалось высокой интенсивностью вне зависимости от выбранного маркера, видового происхождения первичного антитела (кролик или мышь) или флюоресцентной метки (Alexa Fluor 555 или Alexa Fluor 488) (рис. 2, *A–L*). Несмотря на активные дискуссии в профильном научном сообществе сосудистых биологов (личное общение), полученные в данном исследовании результаты показывают, что любой из этих двух классических маркеров окрашивает как непосредственно СГМК, так и внеклеточный матрикс мышечной оболочки сосудов (медии) (рис. 2, *A–L*).

Следует отметить, что антителами к ЭК и СГМК окрашивались как артериолы (рис. 2, *A–D*) и венулы (рис. 2, *E–H*), так и капилляры (рис. 2, *I–L*), однако при этом окрашивание на маркеры СГМК независимо от выбранного маркера (SM-МНС или α -SMA), видового происхождения первичного антитела (кролик или мышь) или флюоресцентной метки (Alexa Fluor 555 или Alexa Fluor 488) в силу больших размеров СГМК и многослойности их расположения позволяло получить кратно более высокое соотношение «сигнал – шум» в сравнении с окрашиванием антителами к ЭК, что ясно сигнализировало о наличии кровеносного сосуда внутри определенной области (рис. 2, *A–L*).

Кроме того, окрашивание антителами к СГМК позволяло значительно более отчетливо визуализировать геометрию капилляров в сравнении с классическим окрашиванием антителами к ЭК, поскольку именно капиллярный эндотелий наиболее часто спадается при подготовке гистологических срезов, закрывая просвет сосуда и не позволяя провести полуколичественный анализ его площади, а также толщины сосудистой стенки (рис. 3, *A–H*). Таким образом, окрашивание антителами к СГМК может быть предложено в качестве альтернативного и более эффективного способа детекции сосудов микроциркуляторного русла в сравнении с окрашиванием антителами к ЭК независимо от экспериментальных условий. Наиболее правильным с позиции теоре-

тического обоснования маркером при этом является SM-МНС, поскольку отражает исключительно функциональную специализацию клеток, не являясь при этом белком внеклеточного матрикса (в отличие от α -SMA). Тем не менее, как показало в том числе и описываемое исследование, на практике паттерн окрашивания СГМК не зависит от выбранного маркера. Поэтому, с позиции авторов, при окрашивании кровеносных сосудов допустимо использование в качестве их маркера как SM-МНС, так и α -SMA и, вероятно, также и других маркеров СГМК.

Следующим этапом исследования стала попытка идентификации специфичных маркеров венозного и капиллярного эндотелия (дифференцировку

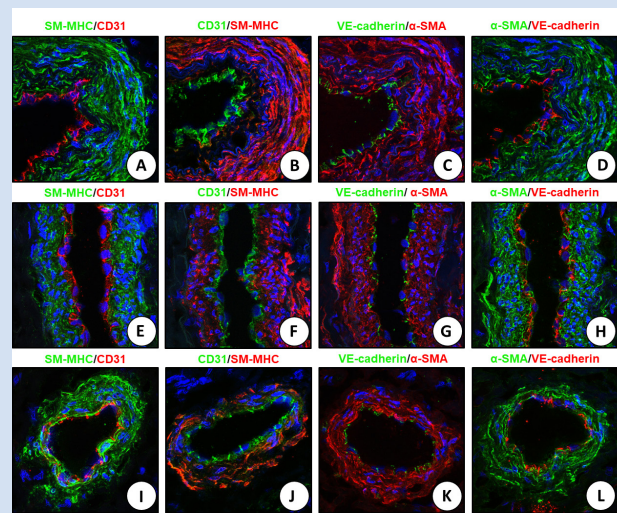


Рисунок 2. Сравнение эндотелиальных и гладкомышечных маркеров при окрашивании различных видов сосудов микроциркуляторного русла (vasa vasorum) большой подкожной вены человека: *A* – артериола, окрашивание антителами к CD31 и SM-МНС; *B* – артериола, окрашивание антителами к SM-МНС и CD31; *C* – артериола, окрашивание антителами к VE-кадгерину и α -SMA; *D* – артериола, окрашивание антителами к α -SMA и VE-кадгерину; *E* – венула, окрашивание антителами к CD31 и SM-МНС; *F* – венула, окрашивание антителами к SM-МНС и CD31; *G* – венула, окрашивание антителами к VE-кадгерину и α -SMA; *H* – венула, окрашивание антителами к α -SMA и VE-кадгерину; *I* – капилляр, окрашивание антителами к CD31 и SM-МНС; *J* – капилляр, окрашивание антителами к SM-МНС и CD31; *K* – капилляр, окрашивание антителами к VE-кадгерину и α -SMA; *L* – капилляр, окрашивание антителами к α -SMA и VE-кадгерину. Иммунофлюоресцентное окрашивание, конфокальная микроскопия, ув. $\times 400$

Figure 2. Comparison of endothelial and vascular smooth muscle cell markers when staining vasa vasorum of the human saphenous vein: *A* – arteriole, staining with antibodies to CD31 and SM-MHC; *B* – arteriole, staining with antibodies to SM-MHC and CD31; *C* – arteriole, staining with antibodies to VE-cadherin and α -SMA; *D* – arteriole, staining with antibodies to α -SMA and VE-cadherin; *E* – venule, stained with antibodies to CD31 and SM-MHC; *F* – venule, staining with antibodies to SM-MHC and CD31; *G* – venule, staining with antibodies to VE-cadherin and α -SMA; *H* – venule, stained with antibodies to α -SMA and VE-cadherin; *I* – capillary stained with antibodies to CD31 and SM-MHC; *J* – capillary, stained with antibodies to SM-MHC and CD31; *K* – capillary, stained with antibodies to VE-cadherin and α -SMA; *L* – capillary, stained with antibodies to α -SMA and VE-cadherin. Immunofluorescent staining, confocal microscopy, magnification $\times 400$

данных сосудов от артериол целесообразно осуществлять по характерной исключительно для сосудов артериального русла эластической мембране). Предварительный анализ адвентиции и околососудистой жировой ткани аорт крыс Wistar продемонстрировал высокую специфичность механочув-

ствительного транскрипционного фактора KLF2 и транскрипционного фактора венозно-лимфатической дифференцировки PROX1 как маркеров венозного эндотелия (рис. 4, A–F) и транскрипционного

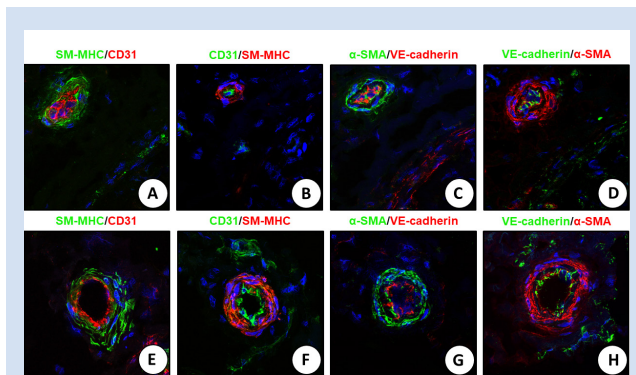


Рисунок 3. Эффективность окрашивания спавшихся (без сосудистого просвета) и неспавшихся капилляров (с сохраненным сосудистым просветом): *A* – спавшийся капилляр без сосудистого просвета, окрашивание антителами к CD31 и SM-MHC; *B* – спавшийся капилляр без сосудистого просвета, окрашивание антителами к SM-MHC и CD31; *C* – спавшийся капилляр без сосудистого просвета, окрашивание антителами к VE-кадгерину и α -SMA; *D* – спавшийся капилляр без сосудистого просвета, окрашивание антителами к α -SMA и VE-кадгерину; *E* – неспавшийся капилляр с сосудистым просветом, окрашивание антителами к CD31 и SM-MHC; *F* – неспавшийся капилляр с сосудистым просветом, окрашивание антителами к SM-MHC и CD31; *G* – неспавшийся капилляр с сосудистым просветом, окрашивание антителами к VE-кадгерину и α -SMA; *H* – неспавшийся капилляр с сосудистым просветом, окрашивание антителами к α -SMA и VE-кадгерину. Иммунофлюоресцентное окрашивание, конфокальная микроскопия, ув. $\times 400$

Figure 3. Efficiency of staining collapsed and uncollapsed capillaries: *A* – collapsed capillary, staining with antibodies to CD31 and SM-MHC; *B* – collapsed capillary, staining with antibodies to SM-MHC and CD31; *C* – collapsed capillary, staining with antibodies to VE-cadherin and α -SMA; *D* – collapsed capillary, staining with antibodies to α -SMA and VE-cadherin; *E* – uncollapsed capillary, staining with antibodies to CD31 and SM-MHC; *F* – uncollapsed capillary, staining with antibodies to SM-MHC and CD31; *G* – uncollapsed capillary, staining with antibodies to VE-cadherin and α -SMA; *H* – uncollapsed capillary, staining with antibodies to α -SMA and VE-cadherin. Immunofluorescent staining, confocal microscopy, magnification $\times 400$

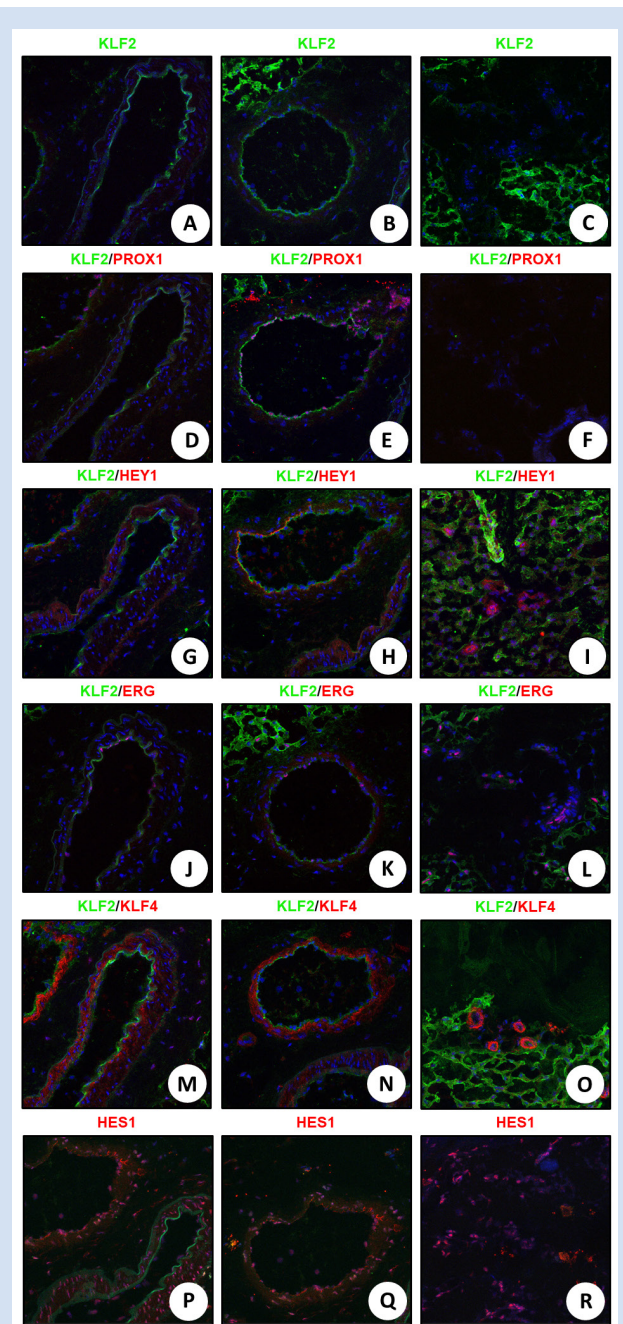


Рисунок 4. Аорта крысы, сосуды микроциркуляторного русла: *A* – артериола, окрашивание антителами к KLF2; *B* – венула, окрашивание антителами к KLF2; *C* – капилляр, окрашивание антителами к KLF2; *D* – артериола, окрашивание антителами к KLF2 и PROX1; *E* – венула, окрашивание антителами к KLF2 и PROX1; *F* – капилляр, окрашивание антителами к KLF2 и PROX1; *G* – артериола, окрашивание антителами к KLF2 и HEY1; *H* – венула, окрашивание антителами к KLF2 и HEY1; *I* – капилляр, окрашивание антителами к KLF2 и HEY1; *J* – артериола, окрашивание антителами к KLF2 и ERG; *K* – венула, окрашивание антителами к KLF2 и ERG; *L* – капилляр, окрашивание антителами к KLF2 и ERG; *M* – артериола, окрашивание антителами к KLF2 и KLF4; *N* – венула, окрашивание антителами к KLF2 и KLF4; *O* – капилляр, окрашивание антителами к KLF2 и KLF4; *P* – артериола, окрашивание антителами к HES1; *Q* – венула, окрашивание антителами к HES1; *R* – капилляр, окрашивание антителами к HES1. Иммунофлюоресцентное окрашивание, конфокальная микроскопия, ув. $\times 400$

Figure 4. Vasa vasorum within the rat aorta: *A* – arteriole, staining with antibodies to KLF2; *B* – venule, stained with antibodies to KLF2; *C* – capillary, stained with antibodies to KLF2; *D* – arteriole, staining with antibodies to KLF2 and PROX1; *E* – venule, stained with antibodies to KLF2 and PROX1; *F* – capillary, stained with antibodies to KLF2 and PROX1; *G* – arteriole, staining with antibodies to KLF2 and HEY1; *H* – venule, stained with antibodies to KLF2 and HEY1; *I* – capillary, stained with antibodies to KLF2 and HEY1; *J* – arteriole, staining with antibodies to KLF2 and ERG; *K* – venule, staining with antibodies to KLF2 and ERG; *L* – capillary, staining with antibodies to KLF2 and ERG; *M* – arteriole, staining with antibodies to KLF2 and KLF4; *N* – venule, stained with antibodies to KLF2 and KLF4; *O* – capillary, stained with antibodies to KLF2 and KLF4; *P* – arteriole, stained with antibodies to HES1; *Q* – venule, stained with antibodies to HES1; *R* – capillary, staining with antibodies to HES1. Immunofluorescent staining, confocal microscopy, magnification $\times 400$

фактора артериальной дифференцировки HEY1 как маркера клеток стенки капилляров (рис. 4, *G–I*), в то время как транскрипционный фактор артериальной дифференцировки ERG детектировался во всех видах ЭК (рис. 4, *J–L*), механочувствительный

транскрипционный фактор KLF4 – во всех видах СГМК и перицитах (рис. 4, *M–O*), а транскрипционный фактор артериальной дифференцировки HES1 – во всех видах сосудистых клеток (рис. 4, *P–R*).

Тем не менее при окрашивании тканей БПВ человека механочувствительный транскрипционный фактор KLF2 идентифицирован в сосудистой стенке артериол и капилляров и не был специфичен для эндотелия (рис. 5, *A–C*), экспрессия транскрипционного фактора HEY1 в стенке капилляров была в лучшем случае умеренной (рис. 5, *B*), а транскрипционный фактор венозно-лимфатической дифференцировки PROX1 не детектирован ни в одном из видов кровеносных сосудов (рис. 5, *D–F*). Другие маркеры венозно-лимфатической дифференцировки LYVE1 (рис. 5, *G–I*), VEGFR3 (рис. 5, *J–L*) и NRP2 (рис. 5, *M–O*) не были специфичны для эндотелия и с разной степенью выраженности детектировались во всех видах кровеносных сосудов, при этом экспрессия

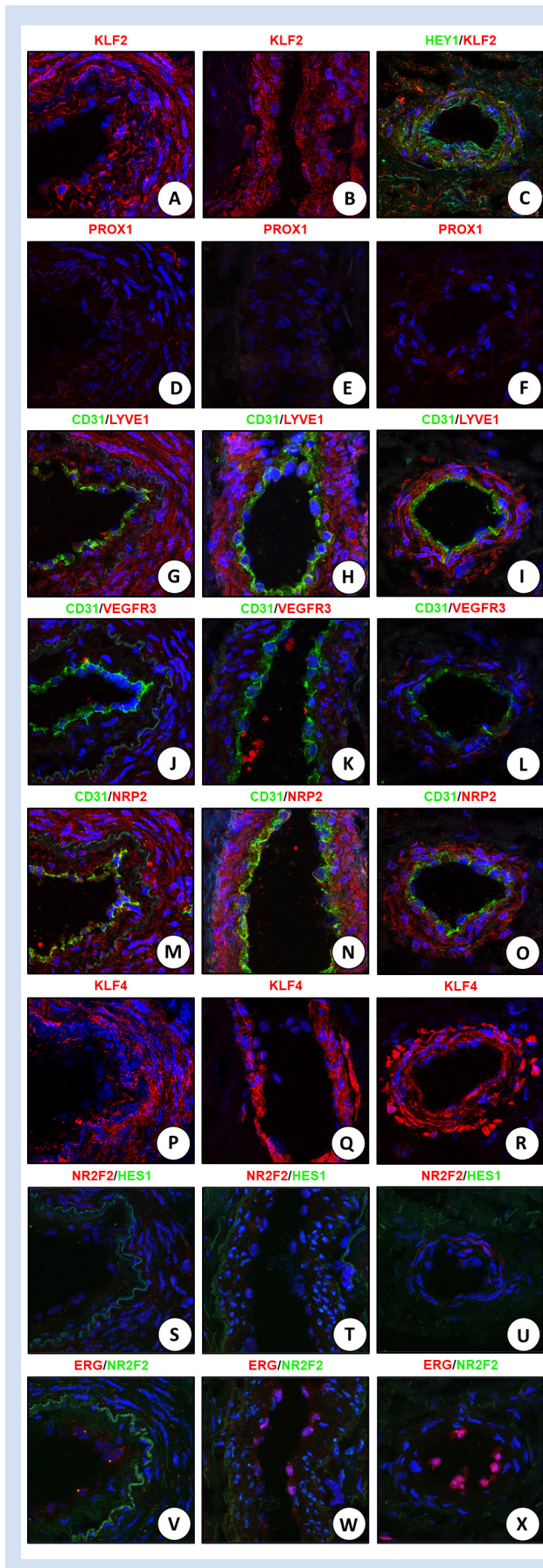


Рисунок 5. Большая подкожная вена человека, сосуды микроциркуляторного русла: *A* – артериола, окрашивание антителами к KLF2; *B* – венула, окрашивание антителами к KLF2; *C* – капилляр, окрашивание антителами к KLF2 и HEY1; *D* – артериола, окрашивание антителами к PROX1; *E* – венула, окрашивание антителами к PROX1; *F* – капилляр, окрашивание антителами к PROX1; *G* – артериола, окрашивание антителами к CD31 и LYVE1; *H* – венула, окрашивание антителами к CD31 и LYVE1; *I* – капилляр, окрашивание антителами к CD31 и LYVE1; *J* – артериола, окрашивание антителами к CD31 и VEGFR3; *K* – венула, окрашивание антителами к CD31 и VEGFR3; *L* – капилляр, окрашивание антителами к CD31 и VEGFR3; *M* – артериола, окрашивание антителами к CD31 и NRP2; *N* – венула, окрашивание антителами к CD31 и NRP2; *O* – капилляр, окрашивание антителами к CD31 и NRP2; *P* – артериола, окрашивание антителами к KLF4; *Q* – венула, окрашивание антителами к KLF4; *R* – капилляр, окрашивание антителами к KLF4; *S* – артериола, окрашивание антителами к NR2F2 и HES1; *T* – венула, окрашивание антителами к NR2F2 и HES1; *U* – капилляр, окрашивание антителами к NR2F2 и HES1; *V* – артериола, окрашивание антителами к NR2F2 и ERG; *W* – венула, окрашивание антителами к NR2F2 и ERG; *X* – капилляр, окрашивание антителами к NR2F2 и ERG. Иммунофлюоресцентное окрашивание, конфокальная микроскопия, ув. $\times 400$

Figure 5. Vasa vasorum within the human saphenous vein: *A* – arteriole, staining with antibodies to KLF2; *B* – venule, stained with antibodies to KLF2; *C* – capillary, stained with antibodies to KLF2 and HEY1; *D* – arteriole, staining with antibodies to PROX1; *E* – venule, stained with antibodies to PROX1; *F* – capillary, staining with antibodies to PROX1; *G* – arteriole, staining with antibodies to CD31 and LYVE1; *H* – venule, stained with antibodies to CD31 and LYVE1; *I* – capillary stained with antibodies to CD31 and LYVE1; *J* – arteriole, staining with antibodies to CD31 and VEGFR3; *K* – venule, staining with antibodies to CD31 and VEGFR3; *L* – capillary, staining with antibodies to CD31 and VEGFR3; *M* – arteriole, staining with antibodies to CD31 and NRP2; *N* – venule, staining with antibodies to CD31 and NRP2; *O* – capillary, staining with antibodies to CD31 and NRP2; *P* – arteriole, staining with antibodies to KLF4; *Q* – venule, stained with antibodies to KLF4; *R* – capillary, staining with antibodies to KLF4; *S* – arteriole, staining with antibodies to NR2F2 and HES1; *T* – venule, stained with antibodies to NR2F2 and HES1; *U* – capillary, stained with antibodies to NR2F2 and HES1; *V* – arteriole, staining with antibodies to NR2F2 and ERG; *W* – venule, stained with antibodies to NR2F2 and ERG; *X* – capillary, staining with antibodies to NR2F2 and ERG. Immunofluorescent staining, confocal microscopy, magnification $\times 400$

LYVE1 была значительно выше (рис. 5, *G–L*). Аналогичное утверждение было справедливо и для механочувствительного транскрипционного фактора KLF4 (рис. 5, *P–R*), в то время как транскрипционный фактор артериальной дифференцировки HES1 практически не экспрессировался в сосудистой стенке VV БПВ (рис. 5, *S–U*). Как и в аортах крыс, транскрипционный фактор артериальной дифференцировки ERG был специфичен для ЭК и выражено экспрессировался в них независимо от их дифферона (рис. 5, *W–X*), что позволяет рассматривать его как возможный панэндотелиальный маркер в дополнение к CD31 и VE-кадгерину. Единственным специфичным маркером, позволявшим при иммунофлюоресцентном окрашивании более или менее дифференцировать венулы от артериол и капилляров, был транскрипционный фактор венозной дифференцировки NR2F2, который детектирован внутри стенки некоторых венул (однако не экспрессируясь в венозных ЭК) и не был экспрессирован в какой-либо из клеточных популяций стенки артериол или капилляров, однако его экспрессия в венозной стенке также существенно различалась между венулами (рис. 5, *S–X*).

Иммуногистохимическое окрашивание стенки БПВ, однако, не выявило специфичности NR2F2 для венул, поскольку данный транскрипционный фактор также экспрессировался во всей венозной стенке при малом разведении соответствующего антитела (1:100, рис. 6, *A*), хотя при больших разведениях – 1:200 (рис. 6, *B*) и особенно 1:500 (рис. 6, *C*) – процент положительно окрашенных венозных клеток снижался. Тем не менее даже при окрашивании 1:500 наблюдалось положительное окрашивание на NR2F2 клеток всех сосудов микроциркуляторного русла (рис. 6, *D*).

Таким образом, справедливо говорить о неспецифичности описанных в литературе маркеров артериальной, венозной, капиллярной и лимфатической дифференцировки. Часть из них (KLF2, KLF4, LYVE1, VEGFR3, NRP2, NR2F2 и ERG) детектировалась во всех сосудах микроциркуляторного русла (VV) БПВ (KLF2 и NR2F2 – во всей сосудистой стенке, ERG – в ЭК, KLF4, LYVE1, VEGFR3 и NRP2 – в СГМК), еще часть (PROX1, HEY1, HES1) не детектировались вообще либо были экспрессированы чрезвычайно слабо (при этом антитела к данным транскрипционным факторам позволяли детектировать соответствующий и специфичный сигнал в тканях крыс, что свидетельствует о технической валидности эксперимента. Кроме того, транскрипционные факторы артериальной дифференцировки HES1 и ERG также не продемонстрировали приверженности какому-либо эндотелиальному дифферону даже в тканях аорт крыс: первый из них экспрессирован во всех сосудистых клеточных популяциях, второй – во всех видах ЭК.

Обсуждение

В научно-исследовательской практике детекция кровеносных сосудов, в том числе сосудов микроциркуляторного русла и конкретно VV, осуществляется при помощи иммуногистохимического или иммунофлюоресцентного окрашивания на ряд специфичных маркеров, к которым относят CD31, VE-кадгерин, VEGFR2, фактор фон Виллебранда (vWF), CD34 и ряд других. Дискуссии в отношении оптимального маркера ЭК не утихают и по сей день, однако, как правило, остаются на стадии неформальных обсуждений в рамках научных мероприятий или переписки с рецензентами в процессе подготовки к принятию статьи в печать. С теоретической стороны критике можно подвергнуть любой из этих маркеров. К примеру, CD34 является маркером эндотелиальных прогениторных клеток [10], причем данный рецептор также экспрессируется и на других клетках-предшественниках [11]. Фактор фон Виллебранда действительно обильно детектируется в цитозоле ЭК в виде телец Вайбеля – Паладе, однако также служит белком субэндотелиального внеклеточного матрикса, что особенно заметно при окрашивании тканеинженерных сосудистых протезов малого диаметра [10]; кроме того, вследствие его роли в обеспечении гемостаза он также

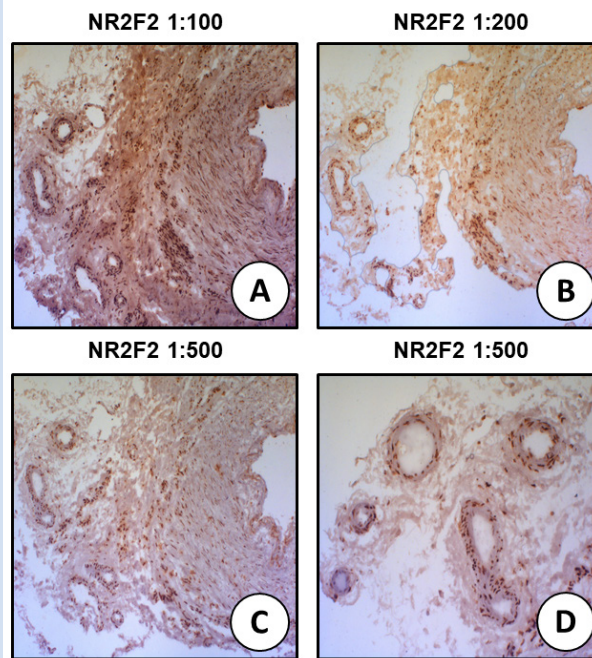


Рисунок 6. Иммуногистохимическое окрашивание большой подкожной вены человека на транскрипционный фактор NR2F2: *A* – стенка большой подкожной вены, разведение 1:100, ув. $\times 200$; *B* – стенка большой подкожной вены, разведение 1:200, ув. $\times 200$; *C* – стенка большой подкожной вены, разведение 1:500, ув. $\times 200$; *D* – vasa vasorum в адвентиции большой подкожной вены, разведение 1:500, ув. $\times 400$

Figure 6. Immunohistochemical staining of the human saphenous vein for the NR2F2 transcription factor. *A* – venous wall, dilution 1:100, magnification $\times 200$; *B* – venous wall, dilution 1:200; *C* – venous wall, dilution 1:500; *D* – vasa vasorum in the saphenous vein adventitia, dilution 1:500, magnification $\times 400$

может детектироваться в тромбах различной величины безотносительно ЭК [12]. VE-кадгерин по своей сути является маркером межклеточных контактов и, хотя специфичен для ЭК, может не окрашивать отдельные ЭК, потерявшие контакты с соседними ЭК в случае прерывистости эндотелиального монослоя; кроме того, данный маркер зачастую не окрашивает апикальную и базальные поверхности ЭК. CD31 (PECAM1) по своей природе экспрессируется не только в ЭК, но и в тромбоцитах (что ясно из названия данной молекулы – platelet endothelial cell adhesion molecule) и поэтому может также быть высокоэкспрессированным в тромбах. В этом отношении привлекательна высокая специфичность VEGFR2, однако степень экспрессии данного маркера на порядок ниже, чем CD31 или VE-кадгерина, что зачастую делает затруднительным высококачественное окрашивание ЭК с его помощью. Данная проблема особенно актуальна при окрашивании биоискусственных тканей (к примеру, вышеуказанных тканеинженерных сосудистых протезов) и ксеногенных (гетерологических) имплантатов (к примеру, биопротезов клапанов сердца или сосудистых заплат для каротидной эндалтерэктомии). На практике, с позиции авторов статьи, высокая специфичность VEGFR2 не перекрывает его относительно низкой чувствительности в сравнении с CD31 и VE-кадгерин, окрашивание на которые даже на больших разведениях гарантирует высококачественную иммунодетекцию, несмотря на их указанные в данном абзаце недостатки. По этой причине в данной работе в качестве маркеров ЭК использованы именно CD31 и VE-кадгерин, позволяющие получить наиболее представительную иммунофлюоресцентную картину в нативных тканях (к которым относятся и аорта крысы, и БПВ человека).

Проблемой применения антител к специфичным белкам ЭК (в том числе CD31 и VE-кадгерина) в качестве маркеров сосудов микроциркуляторного русла является то, что их относительно тонкая стенка часто не обеспечивает достаточного запаса упругости для сохранения сосудистой геометрии при подготовке гистологических срезов, что приводит к их спадаемости и даже закрытию просвета сосуда. В этой ситуации (как показано на одном из рисунков в данной работе) сосуд при окрашивании на маркеры ЭК детектируется как скопление клеток, которое не дает объективной информации об изначальной геометрии сосуда и, строго говоря, даже не может быть использовано как доказательство присутствия сосуда в ткани, что имеет особую значимость для безошибочного машинного обучения и последующей автоматизированной детекции.

В соответствии с этим одной из двух основных целей данной работы стала оценка антител к специфичным белкам СГМК как маркеров сосудистой

стенки. В сравнении с монослоем ЭК слои СГМК занимают кратно (в ряде случаев – на порядки) большую площадь сосуда, что позволяет обеспечить значительно более сильный иммуногистохимический или иммунофлюоресцентный сигнал. Кроме того, поскольку именно СГМК составляют $\geq 80\%$ площади сосудов микроциркуляторного русла [13], иммуноокрашивание на их специфичные белки позволяет осуществить достаточно адекватную оценку сосудистой геометрии даже при спадании просвета сосуда, а также обеспечить надежность машинного обучения и дальнейшей детекцией VV при помощи искусственного интеллекта. К маркерам СГМК относятся тяжелые цепи миозина гладких мышц (SM-МНС), альфа-актин гладких мышц (α -SMA), кальпонин, SM22 α и смузелин, из которых наиболее часто выделяют использованные в данном исследовании SM-МНС и α -SMA. По аналогии с маркерами ЭК дискуссии в отношении оптимального маркера СГМК ведутся в основном в кулуарах специализированных научных форумов и переписке с рецензентами, при этом наиболее горячей темой для обсуждения становится правомерность использования α -SMA, который также является белком внеклеточного матрикса.

Проведенное исследование показало, что оба выбранных маркера (SM-МНС и α -SMA) характеризуются близким паттерном окрашивания и являются высокоспецифичными для СГМК. Сравнительное иммуноокрашивание на маркеры ЭК и СГМК в контексте детекции сосудов микроциркуляторного русла в соответствии с выдвинутой гипотезой действительно продемонстрировало возможность объективной оценки сосудистой геометрии при окрашивании на SM-МНС или α -SMA вне зависимости от среза, выбранного антитела или типа сосуда (артериола, венола или капилляр), что в сочетании с высокой интенсивностью флюоресцентного сигнала позволяет обосновать использование маркеров СГМК для иммунодетекции VV. Стоит отметить, что перициты стенки капилляров также окрашивались на SM-МНС или α -SMA по аналогии с СГМК артериол и венул, что делает данные маркеры подходящими для всех видов сосудов микроциркуляторного русла. В этом отношении полученные нами данные соответствуют приводимым в литературе, поскольку ранее также показана экспрессия α -SMA перицитами капилляров сетчатки [14], головного мозга [15–17] и легких [18–20]. Таким образом, хотя репертуар молекулярной экспрессии перицитов может существенно отличаться между различными тканями и органами (в этом отношении капилляры в связи с различным функциональным значением имеют большую вариабельность структуры в сравнении с артериолами и венолами), экспрессия перицитами α -SMA указывает на правомерность использования

маркеров СГМК для оценки состояния микроциркуляторного русла и в других органах и тканях. Стоит, однако, отметить, что данные во всех приводимых статьях касаются исключительно перичитарной экспрессии α -SMA, а не SM-MHC или иных маркеров сосудистой гладкомышечной дифференцировки. Также следует подчеркнуть, что ни α -SMA, ни SM-MHC в ЭК на уровне детектируемого при иммунофлюоресцентном окрашивании белка не детектируются (что показано в данной работе) и практически не экспрессируются даже на уровне транскриптов (собственные данные, приводимые в оригинальной статье нашей группы из этого же номера журнала).

Второй целью данной работы стал анализ возможности дифференцировать артериолы, венулы и капилляры на основании иммуноокрашивания, что особенно важно в контексте машинного обучения и возможной дифференциальной роли различных типов сосудов микроциркуляторного русла в развитии патологий кровеносных сосудов (к примеру, рестеноза или атеросклероза), а также в ремоделировании кровеносного сосуда *de novo* на месте тканеинженерного сосудистого протеза. Согласно данным литературы, к маркерам артериальной дифференцировки относят в первую очередь транскрипционные факторы сигнального пути Notch – HES1, HEY1, HEY2 и ERG [21], к маркерам венозной дифференцировки – транскрипционный фактор NR2F2 (COUP-TFII) [22] и нейропилин-2 (NRP2), являющийся корецептором к изоформам фактора роста сосудистого эндотелия VEGF-A и VEGF-C [23], а к маркерам лимфатической дифференцировки – транскрипционный фактор PROX1 [24], мембранный гликопротеиновый рецептор к гиалуриновой кислоте LYVE1 [25, 26] и VEGFR3, мембранный рецептор к изоформам фактора роста сосудистого эндотелия VEGF-C и VEGF-D [27], а также мембранный гликопротеин подоплатин [28]. Сведения о маркерах капиллярной дифференцировки (в особенности в адвентиции кровеносных сосудов) неясны, поскольку строение и молекулярный профиль капилляров в значительной степени органоспецифичны. Как правило, в качестве маркеров предпочитают использовать транскрипционные факторы, поскольку они являются мастер-регуляторами дифференцировки, контролирующими экспрессию целого спектра других белков, включая мембранные рецепторы, каждый из которых по отдельности может быть маркером, но не фактором дифференцировки (что ограничивает его информативную ценность). Тем не менее в отдельных случаях для подтверждения того или иного направления дифференцировки (в особенности это касается венозного и лимфатического дифференцирования) возможно использование и мембранных рецепторов, как правило, гликопротеиновой природы.

Несмотря на использование широкой палитры молекулярных маркеров (механочувствительные транскрипционные факторы KLF2 и KLF4, транскрипционные факторы артериальной дифференцировки HES1, HEY1 и ERG, транскрипционный фактор венозно-лимфатической дифференцировки PROX1, маркеры венозно-лимфатической дифференцировки LYVE1, VEGFR3 и NRP2, транскрипционный фактор венозной дифференцировки NR2F2) и определенные успехи при анализе их специфичности в адвентиции и околососудистой жировой ткани аорт крыс (в частности, специфичность механочувствительного транскрипционного фактора KLF2 и транскрипционного фактора венозно-лимфатической дифференцировки PROX1 для венул, а также определенная специфичность транскрипционного фактора артериальной дифференцировки HEY1 для капилляров), анализ адвентиции БПВ человека не выявил специфичности какого-либо из вышеуказанных маркеров для артериол, венул или капилляров. При этом транскрипционные факторы PROX1, HEY1 и HES1 экспрессировались в ВВ БПВ чрезвычайно слабо или не экспрессировались вообще, а транскрипционные факторы KLF2, KLF4 и NR2F2 и белки LYVE1, VEGFR3 и NRP2 экспрессировались в сосудистой стенке вне зависимости от типа сосуда. Интересным и не сочетающимся с классическими представлениями является тот факт, что экспрессия KLF4, LYVE1, VEGFR3 и NRP2 была ограничена СГМК – как правило, LYVE1 и VEGFR3 рассматривают как маркеры лимфатического эндотелия [26–28], а NRP2 – как маркер венозного эндотелия [29]. Кроме того, стоит отметить высокую специфичность транскрипционного фактора артериальной дифференцировки ERG для ЭК и его экспрессию независимо от их дифференцировки (то есть в артериолах, венулах и капиллярах), при этом такой паттерн наблюдался в адвентиции как аорт крыс, так и БПВ человека. Это позволяет предложить транскрипционный фактор ERG в качестве дополнительного маркера эндотелиальной дифференцировки – в дополнение к CD31 и VE-кадгерину.

Таким образом, на текущем уровне научно-технического развития единственным надежным и ясно детектируемым маркером, позволяющим отличить артериолы от венул и капилляров в тканях взрослого человека (по крайней мере в его кровеносных сосудах и прилежащей к ним жировой ткани), являются эластические мембраны, которые в силу высокой плотности эластина обладают выраженной аутофлюоресценцией в зеленом или синем канале и могут быть специфично окрашены сочетанием хлорида железа и раствора Люголя в сочетании с гематоксилином при пентахромном окрашивании по Расселлу – Мовату (а также при желении – антителами к эластину). Различение венул

и капилляров, вероятно, возможно исключительно на уровне сосудистой геометрии (диаметр просвета сосуда, толщина и форма сосудистой стенки), а также с некоторой долей вероятности – на уровне ультраструктурных особенностей СГМК венул и капиллярных перицитов. Оба способа не лишены недостатков, поскольку дифференцирование венул и капилляров исключительно на основании геометрии может приводить к недостаточной специфичности для эффективного машинного обучения, а анализ ультраструктуры требует получения электронно-микроскопических изображений, что резко ограничивает широту применения данного метода. К сожалению, вопрос о специфичности отдельных белков-маркеров артериальной, венозной и капиллярной дифференцировки в тканях взрослого человека остается открытым.

Наибольшую актуальность проведенное исследование, вероятно, имеет с точки зрения анализа возможной эффективности обучения инструментов искусственного интеллекта (нейронных сетей) для определения и дифференцировки сосудов микроциркуляторного русла. С этой целью для автоматизированной детекции таких сосудов (к примеру, VV) рекомендуется применять пентахромное окрашивание по Расселлу – Мовату, поскольку оно позволяет дифференцировать артериолы от венул и капилляров, различение которых далее, видимо, придется проводить на основе характерных паттернов их геометрии. Поскольку данный вид окрашивания является достаточно редким и, как правило, применяется лишь в профильных лабораториях, дальнейшее обучение нейронных сетей для анализа состояния микроциркуляторного русла представляется целесообразным на основе окрашивания гематоксилином и эозином с обязательным сопоставлением паттерна полученного окрашивания с таковым при пентахромном окрашивании по Расселлу – Мовату. Идеальным вариантом такого анализа видится двойное виртуальное окрашивание криосрезов – гематоксилином и эозином и пентахромное по Расселлу – Мовату – при помощи нейронной сети, заранее обученной на определенной выборке.

Заключение

Маркеры СГМК (в частности SM-MHC и α -SMA) могут и должны применяться для иммунодетекции сосудов микроциркуляторного русла в норме и при патологии, поскольку обладают объективными преимуществами перед маркерами ЭК

(в частности CD31 и VE-кадгеринном), позволяя проводить анализ сосудистой геометрии вне зависимости от артефактов пробоподготовки срезов и обеспечивая значительно (кратно или на порядок) лучшее соотношение «сигнал – шум». Дифференциальное окрашивание различных типов сосудов микроциркуляторного русла (артериол, венул и капилляров) с помощью специфических антител в тканях взрослого человека (к примеру, клинически релевантной БПВ) едва ли представляется возможным, поскольку все исследованные классические литературные маркеры не являются специфичными на этом этапе индивидуального развития человека. По этой причине для машинного обучения при создании инструментов искусственного интеллекта для анализа сосудов микроциркуляторного русла рекомендуется применять пентахромное окрашивание по Расселлу – Мовату и на его основе рутинное окрашивание гематоксилином и эозином. Перспективным конечным решением представляется технология виртуального окрашивания криосрезов гематоксилином и эозином и по Расселлу – Мовату при помощи нейронной сети, предварительно обученной на массиве соответствующих изображений.

Конфликт интересов

Л.А. Богданов заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.А. Великанова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Ю. Канонькина заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Фролов заявляет об отсутствии конфликта интересов. Д.К. Шишкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.И. Лазебная заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Г. Кутихин заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2021-001 «Разработка новых фармакологических подходов к экспериментальной терапии атеросклероза и комплексных цифровых решений на основе искусственного интеллекта для автоматизированной диагностики патологий системы кровообращения и определения риска летального исхода» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках национального проекта «Наука и университеты».

Информация об авторах

Богданов Лев Александрович, младший 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 0000-0003-4124-2316

Author Information Form

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

Великанова Елена Анатольевна, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1079-1956

Канонькина Анастасия Юрьевна, младший 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** 0000-0003-2810-3100

Фролов Алексей Витальевич, кандидат медицинских наук старший научный сотрудник лаборатории рентгеноваскулярной и реконструктивной хирургии сердца и сосудов отдела хирургии сердца и сосудов федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1746-8895

Шишкова Дарья Кирилловна, кандидат биологических наук 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** 0000-0002-1518-3888

Лазебная Анастасия Ивановна, младший 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** 0000-0002-1867-6354

Кутихин Антон Геннадьевич, кандидат медицинских наук заведующий лабораторией молекулярной, трансляционной и цифровой медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Velikanova Elena A., PhD, Researcher at the Laboratory for Tissue Engineering, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1079-1956

Kanonykina Anastasia Yu., Junior Researcher at the Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-2810-3100

Frolov Alexey V., MD, PhD, Senior Researcher at the Laboratory of Reconstructive Surgery, Department of Cardiovascular Surgery, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1746-8895

Shishkova Daria K., PhD, Researcher at the Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1518-3888

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

Kutikhin Anton G., MD, PhD, Head of the Laboratory for Molecular, Translational, and Digital 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

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

ВЕА – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КАЮ – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ФАВ – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ШДК – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

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

Author Contribution Statement

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

VEA – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

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

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

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

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

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Boyle E.C., Sedding D.G., Haverich A. Targeting vasa vasorum dysfunction to prevent atherosclerosis. *Vascul Pharmacol.* 2017; 96–98: 5–10. doi: 10.1016/j.vph.2017.08.003.
- Mulligan-Kehoe M.J., Simons M. Vasa vasorum in normal and diseased arteries. *Circulation.* 2014; 129(24): 2557–2566. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007189.
- Herbst M., Holzenbein T.J., Minnich B. Characterization of the vasa vasorum in the human great saphenous vein: a scanning electron microscopy and 3D-morphometry study using vascular corrosion casts. *Microsc Microanal.* 2014; 20(4): 1120–1133. doi: 10.1017/S1431927614001287.
- Mollmark J.I., Park A.J., Kim J., Wang T.Z., Katzenell S., Shipman S.L., Zagorchev L.G., Simons M., Mulligan-Kehoe M.J. Fibroblast growth factor-2 is required for vasa vasorum plexus stability in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 2644–2651. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.252544.
- Kwon H.M., Sangiorgi G., Ritman E.L., McKenna C., Holmes D.R.Jr., Schwartz R.S., Lerman A. Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 1998; 101: 1551–1556. doi: 10.1172/JCI1568.
- Ramani P., Dungwa J.V., May M.T. LYVE1 upregulation and lymphatic invasion correlate with adverse prognostic factors and lymph node metastasis in neuroblastoma. *Virchows Arch.* 2012; 460(2): 183–191. doi: 10.1007/s00428-011-1190-y.
- Jackson D.G., Prevo R., Clasper S., Banerji S. LYVE1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis. *Trends Immunol.* 2001; 22(6): 317–321. doi: 10.1016/s1471-4906(01)01936-6.
- Hong Y.K., Harvey N., Noh Y.H., Schacht V., Hirakawa S., Detmar M., Oliver G. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn.* 2002; 225: 351–357. doi: 10.1002/dvdy.10163.
- Pusztaszeri M.P., Seelentag W., Bosman F.T. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Flt-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 2006; 54(4): 385–395. doi: 10.1369/jhc.4A6514.2005.
- Фролов А.В., Терехов А.А., Богданов Л.А., Мухамадияров Р.А., Кутихин А.Г. Сравнительное изучение vasa vasorum и неинтимы в кондуитах для коронарного шунтирования. *Ангиология и сосудистая хирургия.* 2021; 27(2):121–126. doi: 10.33529/ANGIO2021218
- Kutikhin A.G., Tupikin A.E., Matveeva V.G., Shishkova D.K., Antonova L.V., Kabilov M.R., Velikanova E.A. Human Peripheral Blood-Derived Endothelial Colony-Forming Cells Are Highly Similar to Mature Vascular Endothelial Cells yet Demonstrate a Transitional Transcriptomic Signature. *Cells.* 2020; 9(4): 876. doi: 10.3390/cells9040876.
- Sidney L.E., Branch M.J., Dunphy S.E., Dua H.S., Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells.* 2014; 32(6): 1380–9. doi: 10.1002/stem.1661.
- Thachil J. Dual origins and dual roles for von Willebrand factor. *J Thromb Haemost.* 2021; 19(1): 308–309. doi: 10.1111/jth.15152.
- Богданов Л.А., Осяев Н.Ю., Богданова Ю.Д., Мухамадияров Р.А., Шабаев А.Р., Евтушенко А.В., Кутихин А.Г. Анализ топографических сценариев формирования очагов кальцификации в дисфункциональных клапанах сердца и атеросклеротических бляшках. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2021;10(3):26–33. doi: 10.17802/2306-1278-2021-10-3-26-33.
- Alarcon-Martinez L., Yilmaz-Ozcan S., Yemisci M., Schallek J., Kılıç K., Can A., Di Polo A., Dalkara T. Capillary pericytes express α -smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. *Elife.* 2018; 7: e34861. doi: 10.7554/eLife.34861.
- Hutter-Schmid B., Humpel C. Alpha-Smooth Muscle Actin mRNA and Protein Are Increased in Isolated Brain Vessel Extracts of Alzheimer Mice. *Pharmacology.* 2016; 98(5-6): 251–260. doi: 10.1159/000448007.
- Zambach S.A., Cai C., Helms H.C.C., Hald B.O., Dong Y., Fordsmann J.C., Nielsen R.M., Hu J., Lønstrup M., Brodin B., Lauritzen M.J. Precapillary sphincters and pericytes at first-order capillaries as key regulators for brain capillary perfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021; 118(26): e2023749118. doi: 10.1073/pnas.2023749118.
- Zhou H.J., Qin L., Jiang Q., Murray K.N., Zhang H., Li B., Lin Q., Graham M., Liu X., Grutzendler J., Min W. Caveolae-mediated Tie2 signaling contributes to CCM pathogenesis in a brain endothelial cell-specific Pcdcd10-deficient mouse model. *Nat Commun.* 2021; 12(1): 504. doi: 10.1038/s41467-020-20774-0.
- Jerome J.A., Wenzel S.E., Trejo Bittar H.E. Digital Imaging Analysis Reveals Reduced Alveolar α -Smooth Muscle Actin Expression in Severe Asthma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2021; 29(7): 506–512. doi: 10.1097/PAI.0000000000000926.
- Yuan K., Agarwal S., Chakraborty A., Condon D.F., Patel H., Zhang S., Huang F., Mello S.A., Kirk O.I., Vasquez R., de Jesus Perez V.A. Lung Pericytes in Pulmonary Vascular Physiology and Pathophysiology. *Compr Physiol.* 2021; 11(3): 2227–2247. doi: 10.1002/cphy.c200027.
- Sava P., Ramanathan A., Dobronyi A., Peng X., Sun H., Ledesma-Mendoza A., Herzog E.L., Gonzalez A.L. Human pericytes adopt myofibroblast properties in the microenvironment of the IPF lung. *JCI Insight.* 2017;2(24):e96352. doi: 10.1172/jci.insight.96352.
- Swift M.R., Pham V.N., Castranova D., Bell K., Poole R.J., Weinstein B.M. SoxF factors and Notch regulate nr2f2 gene expression during venous differentiation in zebrafish. *Dev Biol.* 2014; 390(2): 116–125. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.03.018.
- Chen X., Qin J., Cheng C.M., Tsai M.J., Tsai S.Y. COUP-TFII is a major regulator of cell cycle and Notch signaling pathways. *Mol Endocrinol.* 2012; 26(8): 1268–1277. doi: 10.1210/me.2011-1305.
- Melincovici C.S., Boşca A.B., Şuşman S., Mărginean M., Mişu C., Istrate M., Moldovan I.M., Roman A.L., Mişu C.M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol.* 2018; 59(2): 455–467.
- Hong Y.K., Harvey N., Noh Y.H., Schacht V., Hirakawa S., Detmar M., Oliver G. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn.* 2002; 225: 351–357. doi: 10.1002/dvdy.10163.
- Ramani P., Dungwa J.V., May M.T. LYVE1 upregulation and lymphatic invasion correlate with adverse prognostic factors and lymph node metastasis in neuroblastoma. *Virchows Arch.* 2012; 460(2): 183–191. doi: 10.1007/s00428-011-1190-y.
- Jackson D.G. The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. *Trends Cardiovasc Med.* 2003; 13(1): 1–7. doi: 10.1016/s1050-1738(02)00189-5.
- Heinolainen K., Karaman S., D'Amico G., Tammela T., Sormunen R., Eklund L., Alitalo K., Zarkada G. VEGFR3 Modulates Vascular Permeability by Controlling VEGF/VEGFR2 Signaling. *Circ Res.* 2017; 120(9): 1414–1425. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310477.
- Alghamdi A.A.A., Benwell C.J., Atkinson S.J., Lambert J., Johnson R.T., Robinson S.D. NRP2 as an Emerging Angiogenic Player; Promoting Endothelial Cell Adhesion and Migration by Regulating Recycling of α 5 Integrin. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 395. doi: 10.3389/fcell.2020.00395.

REFERENCES

1. Boyle E.C., Sedding D.G., Haverich A. Targeting vasa vasorum dysfunction to prevent atherosclerosis. *Vascul Pharmacol.* 2017; 96–98: 5–10. doi: 10.1016/j.vph.2017.08.003.
2. Mulligan-Kehoe M.J., Simons M. Vasa vasorum in normal and diseased arteries. *Circulation.* 2014; 129(24): 2557–2566. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007189.
3. Herbst M., Holzenbein T.J., Minnich B. Characterization of the vasa vasorum in the human great saphenous vein: a scanning electron microscopy and 3D-morphometry study using vascular corrosion casts. *Microsc Microanal.* 2014; 20(4): 1120–1133. doi: 10.1017/S1431927614001287.
4. Mollmark J.I., Park A.J., Kim J., Wang T.Z., Katzenell S., Shipman S.L., Zagorchev L.G., Simons M., Mulligan-Kehoe M.J. Fibroblast growth factor-2 is required for vasa vasorum plexus stability in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 2644–2651. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.252544.
5. Kwon H.M., Sangiorgi G., Ritman E.L., McKenna C., Holmes D.R.Jr., Schwartz R.S., Lerman A. Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 1998; 101: 1551–1556. doi: 10.1172/JCI1568.
6. Ramani P., Dungwa J.V., May M.T. LYVE1 upregulation and lymphatic invasion correlate with adverse prognostic factors and lymph node metastasis in neuroblastoma. *Virchows Arch.* 2012; 460(2): 183–191. doi: 10.1007/s00428-011-1190-y.
7. Jackson D.G., Prevo R., Clasper S., Banerji S. LYVE1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis. *Trends Immunol.* 2001; 22(6): 317–321. doi: 10.1016/s1471-4906(01)01936-6.
8. Hong Y.K., Harvey N., Noh Y.H., Schacht V., Hirakawa S., Detmar M., Oliver G. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn.* 2002; 225: 351–357. doi: 10.1002/dvdy.10163.
9. Pusztaszeri M.P., Seelentag W., Bosman F.T. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Flt-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 2006; 54(4): 385–395. doi: 10.1369/jhc.4A6514.2005.
10. Frolov A.V., Terekhov A.A., Bogdanov L.A., Mukhamadiyarov R.A., Kutikhin A.G. Comparative study of vasa vasorum and neointima in conduits for coronary artery bypass grafting. *Angiology and Vascular Surgery.* 2021; 27(2):121–126. doi:10.33529/ANGIO2021218. (In Russian)
11. Kutikhin A.G., Tupikin A.E., Matveeva V.G., Shishkova D.K., Antonova L.V., Kabilov M.R., Velikanova E.A. Human Peripheral Blood-Derived Endothelial Colony-Forming Cells Are Highly Similar to Mature Vascular Endothelial Cells yet Demonstrate a Transitional Transcriptomic Signature. *Cells.* 2020; 9(4): 876. doi: 10.3390/cells9040876.
12. Sidney L.E., Branch M.J., Dunphy S.E., Dua H.S., Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells.* 2014; 32(6): 1380–9. doi: 10.1002/stem.1661.
13. Thachil J. Dual origins and dual roles for von Willebrand factor. *J Thromb Haemost.* 2021; 19(1): 308–309. doi: 10.1111/jth.15152.
14. Bogdanov L.A., Osyaev N.Yu., Bogdanova Yu.D., Mukhamadiyarov R.A., Shabaev A.R., Evtushenko A.V., Kutikhin A.G. Elemental analysis of valvular and atherosclerotic calcification. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2021;10(3): 26–33. doi: 10.17802/2306-1278-2021-10-3-26-33. (In Russian)
15. Alarcon-Martinez L., Yilmaz-Ozcan S., Yemisci M., Schallek J., Kılıç K., Can A., Di Polo A., Dalkara T. Capillary pericytes express α -smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. *Elife.* 2018; 7: e34861. doi: 10.7554/eLife.34861.
16. Hutter-Schmid B., Humpel C. Alpha-Smooth Muscle Actin mRNA and Protein Are Increased in Isolated Brain Vessel Extracts of Alzheimer Mice. *Pharmacology.* 2016; 98(5-6): 251-260. doi: 10.1159/000448007.
17. Zambach S.A., Cai C., Helms H.C.C., Hald B.O., Dong Y., Fordsmann J.C., Nielsen R.M., Hu J., Lønstrup M., Brodin B., Lauritzen M.J. Precapillary sphincters and pericytes at first-order capillaries as key regulators for brain capillary perfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021; 118(26): e2023749118. doi: 10.1073/pnas.2023749118.
18. Zhou H.J., Qin L., Jiang Q., Murray K.N., Zhang H., Li B., Lin Q., Graham M., Liu X., Grutzendler J., Min W. Caveolae-mediated Tie2 signaling contributes to CCM pathogenesis in a brain endothelial cell-specific Pcdcd10-deficient mouse model. *Nat Commun.* 2021; 12(1): 504. doi: 10.1038/s41467-020-20774-0.
19. Jerome J.A., Wenzel S.E., Trejo Bittar H.E. Digital Imaging Analysis Reveals Reduced Alveolar α -Smooth Muscle Actin Expression in Severe Asthma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2021; 29(7): 506–512. doi: 10.1097/PAI.0000000000000926.
20. Yuan K., Agarwal S., Chakraborty A., Condon D.F., Patel H., Zhang S., Huang F., Mello S.A., Kirk O.I., Vasquez R., de Jesus Perez V.A. Lung Pericytes in Pulmonary Vascular Physiology and Pathophysiology. *Compr Physiol.* 2021; 11(3): 2227–2247. doi: 10.1002/cphy.c200027.
21. Sava P., Ramanathan A., Dobronyi A., Peng X., Sun H., Ledesma-Mendoza A., Herzog E.L., Gonzalez A.L. Human pericytes adopt myofibroblast properties in the microenvironment of the IPF lung. *JCI Insight.* 2017;2(24):e96352. doi: 10.1172/jci.insight.96352.
22. Swift M.R., Pham V.N., Castranova D., Bell K., Poole R.J., Weinstein B.M. SoxF factors and Notch regulate nr2f2 gene expression during venous differentiation in zebrafish. *Dev Biol.* 2014; 390(2): 116–125. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.03.018.
23. Chen X., Qin J., Cheng C.M., Tsai M.J., Tsai S.Y. COUP-TFII is a major regulator of cell cycle and Notch signaling pathways. *Mol Endocrinol.* 2012; 26(8): 1268–1277. doi: 10.1210/me.2011-1305.
24. Melincovici C.S., Boşca A.B., Şuşman S., Mărginean M., Mihu C., Istrate M., Moldovan I.M., Roman A.L., Mihu C.M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) -key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol.* 2018; 59(2): 455–467.
25. Hong Y.K., Harvey N., Noh Y.H., Schacht V., Hirakawa S., Detmar M., Oliver G. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn.* 2002; 225: 351–357. doi: 10.1002/dvdy.10163.
26. Ramani P., Dungwa J.V., May M.T. LYVE1 upregulation and lymphatic invasion correlate with adverse prognostic factors and lymph node metastasis in neuroblastoma. *Virchows Arch.* 2012; 460(2): 183–191. doi: 10.1007/s00428-011-1190-y.
27. Jackson D.G. The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. *Trends Cardiovasc Med.* 2003; 13(1): 1–7. doi: 10.1016/s1050-1738(02)00189-5.
28. Heinolainen K., Karaman S., D'Amico G., Tammela T., Sormunen R., Eklund L., Alitalo K., Zarkada G. VEGFR3 Modulates Vascular Permeability by Controlling VEGF/VEGFR2 Signaling. *Circ Res.* 2017; 120(9): 1414–1425. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310477.
29. Alghamdi A.A.A., Benwell C.J., Atkinson S.J., Lambert J., Johnson R.T., Robinson S.D. NRP2 as an Emerging Angiogenic Player; Promoting Endothelial Cell Adhesion and Migration by Regulating Recycling of α 5 Integrin. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 395. doi: 10.3389/fcell.2020.00395.

Для цитирования: Богданов Л.А., Великанова Е.А., Канонькина А.Ю., Фролов А.В. Шишкова Д.К., Лазебная А.И., Кутихин А.Г. Сократительные белки сосудистых гладкомышечных клеток – универсальные маркеры сосудов микроциркуляторного русла. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2022;11(3): 162-176. DOI: 10.17802/2306-1278-2022-11-3-162-176

To cite: Bogdanov L.A., Velikanova E.A., Kanonykina A.Yu., Frolov A.V., Shishkova D.K., Lazebnaya A.I., Kutikhin A.G. Vascular smooth muscle cell contractile proteins as universal markers of vessels of microcirculatory bed. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2022;11(3): 162-176. DOI: 10.17802/2306-1278-2022-11-3-162-176