

Уральский Медицинский Журнал

Специализированный научно-практический журнал

Неврология

ISSN 2071-5943

Гигиена и эпидемиология

Психиатрия

Интенсивная терапия

Гастроэнтерология

Педиатрия

Кардиология

Хирургия

Стоматология

Перинатология

Пульмонология

Урология. Нефрология

Акушерство. Гинекология

ПАТОМОРФОЛОГИЯ

- Правила клинико-патологоанатомического анализа летальных исходов при проведении патологоанатомических вскрытий
- Иммуноморфологическая характеристика маркеров системы апоптоза в ткани аденокарциномы легкого у работников плутониевого производства
- Характеристика маркеров клеточного обновления при AMACR-позитивном фенотипе атипической мелкоацинарной пролиферации и аденокарциномах предстательной железы
- Оценка диагностического потенциала экспрессии TTF-1, EGF, Mesotelial cell и онкомаркера P504S в папиллярном раке щитовидной железы у детей
- Внутрилегочные лимфатические узлы: патология и проблемы диагностики

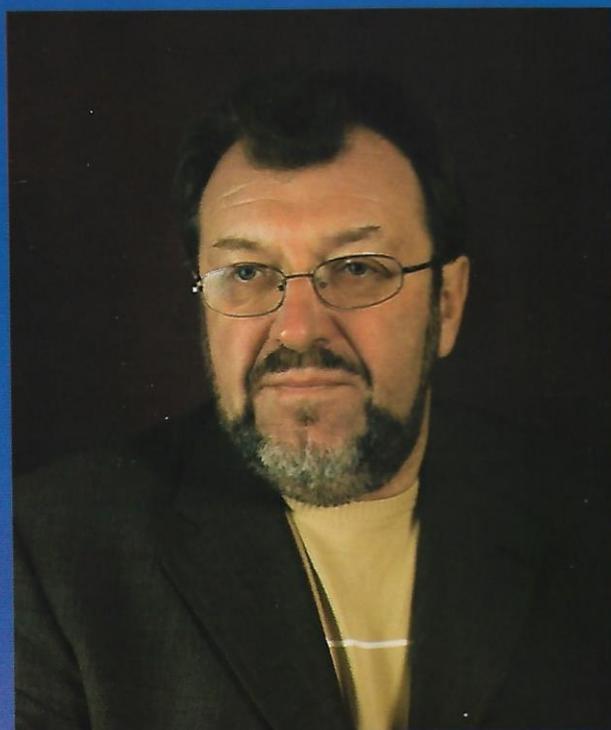
№02 (157)'18

www.urmj.ru





*Зав. кафедрой патологической анатомии
ФГБОУ ВО УГМУ, доктор мед. наук, профессор
Л.М. Гринберг*



*Зав. кафедрой патологической анатомии и судебной ме-
дицины ФГБОУ ВО ЮУГМУ доктор мед. наук, профессор
Е.Л. Казачков*

Уважаемые читатели, коллеги, друзья!

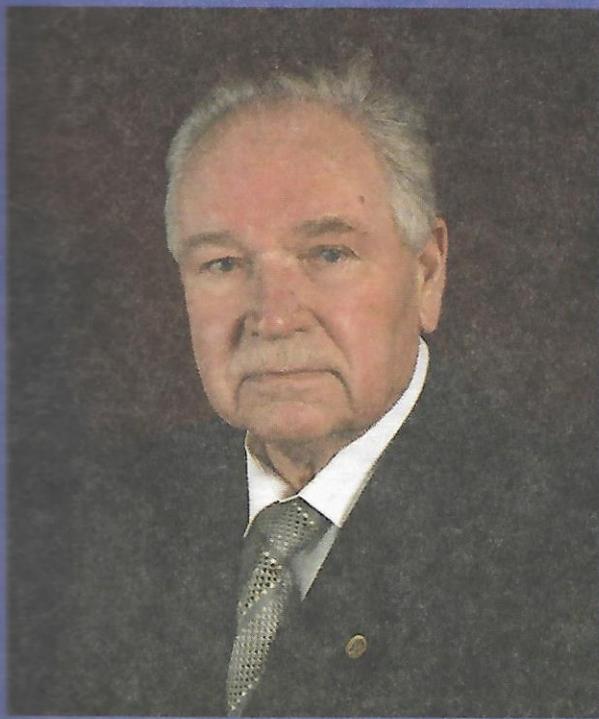
Основная тема очередного номера «Уральского медицинского журнала» - онкоморфология. Этот выпуск приурочен к проведению ставшей уже традиционной и ежегодной III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием: «Современные подходы к морфологической диагностике новообразований человека». Конференция состоится 23-24 марта 2018 года под эгидой Российского общества патологоанатомов, Министерства здравоохранения Челябинской области, ГБУЗ «Челябинский областной клинический центр онкологии и ядерной медицины», ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» МЗ РФ, ГБУЗ «Челябинское областное патологоанатомическое бюро».

Морфологические методы диагностики в онкологии имеют определяющее значение. При этом методы морфологического исследования постоянно усложняются и требуют высокого профессионализма и специализации врача-патолога. Сегодня без ИГХ-исследования уже невозможно представить современную онкоморфологию. Широкое внедрение приобретают молекулярно-

генетические методы, которые занимают ведущее место в персонализированном подходе в лечении опухолей. Сложность решаемых задач определяет основной принцип современной онкологии – мультидисциплинарный (командный) подход к проблеме диагностики и лечения опухолей. И в этой команде специалистов патоморфолог играет далеко не последнюю роль!

В этом журнале вы найдете публикации ведущих патологов Челябинска, Москвы, Екатеринбурга, Казани, Омска и других городов нашей страны. Представлены разделы: организация патологоанатомической службы, обзоры литературы, онкоморфология, оригинальные и экспериментальные исследования, наблюдения из практики.

Редакция «Уральского медицинского журнала» приветствует участников Конференции и поздравляет основателя Южно-Уральской школы патологоанатомов члена-корреспондента РАН, д.м.н., профессора Владимира Леонтьевича Коваленко с юбилеем! Доброго Вам здоровья, творческого активного долголетия и новых публикаций в нашем журнале дорогой Владимир Леонтьевич! ■



Владимир Леонтьевич Коваленко. К 80-летию со дня рождения.

4 февраля 2008 г. исполнилось 80 лет со дня рождения и 56 лет врачебной, научно-исследовательской и общественной деятельности доктора медицинских наук (1976 г.), профессора (1978 г.), заслуженного деятеля науки РФ (1998 г.), члена-корреспондента РАН Владимира Леонтьевича Коваленко.

В. Л. Коваленко родился в Запорожье в семье рабочего. В 1961 г. он с отличием окончил Омский государственный медицинский институт. Вся врачебная деятельность Владимира Леонтьевича связана с патологической анатомией. На его становление как практического патолога, научного работника и педагога оказала влияние работа в ведущих патоморфологических коллективах. Обучаясь в очной аспирантуре на кафедре патологической анатомии, В. Л. Коваленко выполнял кандидатскую диссертацию под руководством основателя омской школы патологов профессора И. С. Новицкого. Диссертация защищена в 1966 г. За 15 лет работы в Омском медицинском институте В. Л. Коваленко прошел все этапы становления научного работника – от аспиранта до защиты докторской диссертации, последовательно занимая должности ассистента, доцента кафедры патологической анатомии, а по совместительству – патологоанатома областной клинической больницы, онкологического диспансера, заведующего патологоанатомическим отделением областной клинической психоневрологической больницы, научного сотрудника патоморфологического отдела (зав. – проф.

Н. А. Краевский) Института клинической и экспериментальной онкологии АМН СССР, где под руководством профессоров Н. Т. Райхлина и А. С. Зиновьева выполнял докторскую диссертацию и в 1974 г. успешно ее защитил.

С сентября 1976 г. по июль 2006 г. В. Л. Коваленко заведовал кафедрой патологической анатомии Челябинской государственной медицинской академии, а с сентября 2006 г. работает профессором этой кафедры. По его инициативе в 1990 г. в Челябинске создано одно из первых в России областное патологоанатомическое учебно-научно-производственное объединение, которое он возглавил, параллельно выполняя обязанности начальника областного патологоанатомического бюро и главного внештатного патологоанатома области. Его активная творческая деятельность способствовала повышению уровня научно-исследовательской работы по актуальным проблемам патогенеза и патологической анатомии заболеваний населения Южного Урала, повышению качества прижизненной и посмертной патологоанатомической диагностики, клинико-патологоанатомического анализа, обеспечила подготовку на высоком уровне студентов, на-

учных работников, педагогов, практических патологоанатомов.

Основные работы В. Л. Коваленко и его учеников посвящены изучению патогенеза и патологической анатомии воспалительных и опухолевых заболеваний легких. Им установлена природа периферических гамартом легких взрослых, показана роль грибковой флоры в развитии легочной патологии у населения Южного Урала, проживающего в сложной экологической ситуации, описан ряд мало известных в России пневмомикозов. Получили признание работы В. Л. Коваленко и его учеников по патогенезу и патологической анатомии пневмонии и хронического бронхита, патоморфозу туберкулеза, его отдаленных последствий, по так называемому стероидному туберкулезу. Школа челябинских патологоанатомов, возглавляемая В. Л. Коваленко, известна также своими исследованиями язвенных заболеваний, разработкой основ эффективного клиничко-патологоанатомического анализа летальных исходов, а также научных принципов организации патологоанатомической службы. Результаты комплексных экспериментально-морфологических исследований, проведенных на кафедре патологической анатомии и в областном патологоанатомическом бюро позволили внедрить в практику работы челябинских медицинских организаций новые эффективные методы лечения ожоговой болезни, ишемической болезни сердца, остеохондроза, невралгии тройничного нерва.

В. Л. Коваленко опубликовано более 500 научных работ, в том числе 22 монографии, руководства, учебно-методические пособия, методические рекомендации для врачей по вопросам патологоанатомической диагностики, изданных под грифом Минздрава СССР, Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Минздрава РФ. Он является редактором 8 монографических сборников научных трудов. Под его руководством выполнены 13 докторских и более 50 кандидатских диссертаций.

В. Л. Коваленко проведена большая работа по аттестации научных кадров на посту председателя докторского диссертационного совета при Южно-Уральском государственном медицинском университете, а в насто-

ящее время – заместителя председателя диссертационного совета Д 999.063.03 при ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России (специальности: травматология и ортопедия, патологическая анатомия). О высоком авторитете Владимира Леонтьевича среди клинических патологов свидетельствует избрание в состав президиума, а позднее – в состав Совета старейшин Российского общества патологоанатомов.

Владимир Леонтьевич до 2007 г. являлся бессменным главным внештатным патологоанатомом Челябинской области, а до 2016 г. – главным патологоанатомом Уральского федерального округа, оказывая большую методическую помощь и до сих пор передающий свой богатый опыт в организации патологоанатомической службы субъектов Уральского федерального округа.

С 1993 г. В. Л. Коваленко – член Международной академии патологии, с 1995 г. – член-корреспондент Российской академии естественных наук, с 2016 г. – член-корреспондент медицинского отделения РАМН (в настоящее время РАН). Европейская академия естественных наук (Германия) и Европейская академическая комиссия по наградам наградили В. Л. Коваленко Почетной медалью Рудольфа Вирхова за заслуги в фундаментальной медицине и патологической анатомии.

Владимира Леонтьевича отличают чрезвычайно широкие научные интересы, колоссальная эрудиция в различных областях патологии человека, научно-исследовательские и педагогические способности и одновременно с этим доброта, порядочность, личная скромность и искренняя преданность профессии. В его незаурядной личности сочетаются качества серьезного ученого, педагога, практического патолога, талантливого организатора, искреннего, доброго и отзывчивого человека.

Редакция журнала «Уральский медицинский журнал», коллективы кафедры патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинского областного патологоанатомического бюро сердечно поздравляют юбиляра, желают ему доброго здоровья, счастья и творческого долголетия. ■

Специализация:

Медицина, медицинская информация для специалистов

Свидетельство о регистрации

ПИ №77-16740 от 10 ноября 2003 г. Выдано Министерством РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовой информации

Решением Президиума ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации от 16 октября 2015 года «Уральский Медицинский журнал» включен в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

Письмо ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации Перечень рецензируемых научных изданий от 01.12.2015 г. № 13-6518

Издатель

ООО «Уральский Центр Медицинской и Фармацевтической Информации»

ФГБОУ ВО УГМУ
Минздрава России

Редакция

Главный редактор: Лещенко И.В.

Редакторы номера:

Гринберг Л.М., Казачков Е.Л.

Технический директор: Возжаев А.В.
Моб.: 8 (343) 242 25 30

E-mail: umj@newhospital.ru

Адрес редакции:

620109, Екатеринбург, ул. Заводская, 29

www.umj.ru Воспроизведение любой части настоящего издания в любой форме без разрешения издательства запрещено. Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов. Ответственность за содержание рекламы несут рекламодатели.

Чтобы связаться с авторами материалов, опубликованных в журнале, напишите по адресу: autor-umj@newhospital.ru

Подписано в печать 05.03.2018 года

Тираж 2000 экз. Заказ №90648

Типография

Филиал «Березовская типография» ГУП СО «МЦЗ», г. Березовский, ул. Красных Героев, 10.
Тел.: (34369) 4-89-11

Подписку на «Уральский медицинский журнал» можно оформить почтовым отделением по каталогу «Газеты и журналы» агентства «Роспечать»
Подписной индекс: 18014

Цена свободная

Уважаемые коллеги, заметили в журнале типографский брак? обязательно сообщите нам: umj@newhospital.ru

ОРГАНИЗАЦИЯ ПАТОЛОГОАТОМИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ

Франк Г.А., Коваленко В.Л., Подобед О.В., Тимофеев И.В., Зайратьянц О.В., Мальков П.Г., Москвичева М.Г.

Правила клинико-патологоанатомического анализа летальных исходов при проведении патологоанатомических вскрытий5

Подобед О.В., Коваленко В.Л., Казачков Е.Л., Дуб А.А., Маслов Р.С.
Правила составления клинико-патологоанатомического эпикриза при патологоанатомическом вскрытии на современном этапе9

НОВЫЕ КЛАССИФИКАЦИИ

Воропаева Е.Е., Казачков Е.Л., Рогозина А.А., Казачкова Э.А., Гошгарлы А.В., Рогозин Д.С.
Соотношение гистологических вариантов полипов эндометрия на биопсийном и операционном материале в возрастном аспекте с учетом новой международной классификации12

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Арефьев Н.О., Гарбузенко Д.В., Казачков Е.Л., Бордуновский В.Н.
Экспериментальные методы изучения ангиогенеза, ассоциированного с портальной гипертензией (Обзор литературы)16

ОНКОМОРФОЛОГИЯ

Петров С.В., Медведева Ю.А., Казачков Е.Л.
Редкий случай ранней доклинической морфологической диагностики анапластического рака щитовидной железы: наблюдение из практики24

Сычугов Г.В., Казачков Е.Л., Азизова Т.В.
Иммунморфологическая характеристика маркеров системы апоптоза в ткани аденокарциномы легкого у работников плутониевого производства27

Фрейд Г.Г., Живаева Е.В.
Морфологическая характеристика гепатобилиарных гамартом Кафедра патологической анатомии с секционным курсом31

Дуб А.А., Четер И.Р.
Характеристика маркеров клеточного обновления при AMACR-позитивном фенотипе атипической мелкоацинарной пролиферации и аденокарциномах предстательной железы различной степени градации36

Иванцов А.О., Клещев М.А., Городнова Т.В., Котив Х.Б., Имянитов Е.Н., Соколенко А.П.
Прогностическое значение оценки морфологического регресса метастазов наследственных опухолей яичника в большой сальник после неоадьювантной химиотерапии.....39

Селякова М.С., Агеева Т.А., Савченко С.В., Якимова А.В.
Особенности иммуногистохимических характеристик диспластичного многослойного плоского эпителия шейки матки у женщин разных возрастных групп43

Казачков Е.Л., Пастернак И.А., Пастернак А.Е.
Оценка диагностического потенциала экспрессии TTF-1, EGF, Mesotelial cell и онкомаркера P504S в папиллярном раке щитовидной железы у детей48

Дуб А.А., Четер И.Р., Воропаев Д.Д.
Муцины и уровень экспрессии цитокератинов AE1/AE3 и D2-40 при AMACR-позитивном фенотипе атипической мелкоацинарной пролиферации и аденокарциноме предстательной железы52

Павлова Т.В., Чаплыгина М.А., Павлов И.А., Нестеров А.В.
Инновационные аспекты в изучении рака почки57

Харлова О.А., Олейникова Н.А., Мальков П.Г., Данилова Н.В.
Иммуногистохимическая характеристика экспрессии Ki67 в предопухолевых образованиях толстой кишки62

Арефьев Н.О.¹, Гарбузенко Д.В.², Казачков Е.Л.¹, Бордуновский В.Н.²

Экспериментальные методы изучения ангиогенеза, ассоциированного с портальной гипертензией (Обзор литературы)

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский Государственный Медицинский Университет», 1 - кафедра патологической анатомии и судебной медицины, 2 - кафедра факультетской хирургии, г. Челябинск

Arefyev N.O., Garbuzenko D.V., Kazachkov E.L., Bordunovskii V.N.

Portal hypertension associated angiogenesis assay in experimental studies (literature review)

Резюме

В обзоре представлены литературные данные о современных методах изучения ангиогенеза, ассоциированного с портальной гипертензией, в эксперименте. Для поиска научных статей применялись база данных PubMed, поисковая система Google Scholar, а также пристатейные списки литературы. Соответствующие цели обзора публикации отбирались за период с 1981 по 2017 год по терминам: «портальная гипертензия», «микроКТ», «ангиогенез», «иммуногистохимия», «интравитальная микроскопия», «микросферы». Анализ литературы показал, что современные методы изучения внутри- и внепечёночного ангиогенеза, такие как микрокомпьютерная томография *in vivo* и *ex vivo*, интравитальная микроскопия, а также эффективные средства компьютерной обработки изображений, позволяют установить его важную роль в патогенезе портальной гипертензии. Разработка способов антиангиогенной терапии, избирательно направленной на новообразованные сосуды, может быть перспективным направлением в лечении портальной гипертензии и связанных с ней осложнений.

Ключевые слова: портальная гипертензия, ангиогенез, иммуногистохимические методы, микроКТ, интравитальная микроскопия, микросферы

Summary

The review presents literature data on portal hypertension associated angiogenesis assay in experimental studies. The information was collected from the PubMed database, the Google Scholar retrieval system, and the reference lists from relevant publications for 1981 – 2017 using the keywords: "portal hypertension," "microCT," "angiogenesis," "immunohistochemistry," "intravital microscopy," "microspheres." Analysis of the literature showed that intra- and extrahepatic angiogenesis assays, such as micro-computed tomography *in vivo* and *ex vivo*, intravital microscopy, and computer image processing allow us to establish its important role in portal hypertension pathogenesis. The development of anti-angiogenic therapy, which would be focused on newly formed vessels, may be a perspective direction in the treatment of portal hypertension and its complications.

Key words: portal hypertension, angiogenesis, immunohistochemistry, microCT, intravital microscopy, microspheres

Введение

Большинство тяжёлых осложнений цирроза печени (ЦП) связаны с портальной гипертензией (ПГ), в основе патогенеза которой лежит увеличение печёночного сосудистого сопротивления портальному кровотоку. Причиной этого, помимо грубой структурной перестройки печени вследствие диффузного фиброза и формирования узлов регенерации, ремоделирования и капилляризации синусоидов, является дисфункция эндотелия и расстройство паракринного взаимодействия повреждённых гепатоцитов, синусоидальных эндотелиальных клеток, клеток Купфера и активированных звёздчатых клеток печени

(ЗКП). Развитие внутрипечёночного ангиогенеза в данной ситуации можно рассматривать как компенсаторный механизм, направленный на декомпрессию портальной системы. Вместе с тем новообразованные сосуды, несущие кровь в обход синусоидов, не способны обеспечить кислородом и питательными веществами ткани печени, что приводит к прогрессированию заболевания [1]. Дальнейшее развитие спланхического полнокровия, формирование естественных портосистемных шунтов и установившийся гипердинамический циркуляторный статус как следствие сложных процессов ангиогенеза, сосудистого ремоделирования и эндотелиальной дисфункции приво-

дят к прогрессированию ПП и возникновению свойственных для неё осложнений, в частности кровотечений из варикозно расширенных вен пищевода [2]. Учитывая существенную роль ангиогенеза в развитии ПП при ЦП, его изучение является важным для разработки способов антиангиогенной терапии, направленных на коррекцию связанных с ней гемодинамических нарушений [3]. С этой целью используются различные экспериментальные модели, при которых применяются разнообразные методы (*in vitro* и *in vivo*) качественной и количественной его оценки [4].

Методы исследования внутрипечёночного ангиогенеза

Развиваясь параллельно с фиброзом, внутрипечёночный ангиогенез является важнейшим компонентом в прогрессировании ЦП. Часть новообразованных сосудов располагается вокруг и внутри фиброзных септ и, вероятно, необходима для компенсации недостаточного кровотока. Другие, формирующие внутрипечёночные портокавальные шунты, несут кровь в обход синусоидов. Несмотря на свою декомпрессивную роль, они приводят к дисфункции печени из-за снижения доставки кислорода и питательных веществ к её тканям и ограничения свободного обмена между гепатоцитами [5].

Сканирующая электронная микроскопия

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) является традиционным методом изучения трёхмерной структуры микроциркуляторного русла. Оно визуализируется с помощью пучка электронов после внутрисосудистого введения цветного желатина, латекса или пластмассы с последующим растворением избыточной ткани. Такой подход позволяет не только количественно определить размеры сосудов, расстояния между ними, число ветвлений и особенности их внутренней поверхности, но и математически рассчитать пристеночное напряжение сдвига [6].

Используя СЭМ у животных с моделью ЦП, вызванного подкожным введением СС14, определялось уменьшение количества фенестр, и истончение синусоидов между узлами регенерации, сопровождаемыми фиброзными септами [7]. У мышей с моделью билиарного ЦП она позволяла выявить многочисленные слепо заканчивающиеся и хаотично расположенные синусоиды, а также крупные портоцентральные коллатерали, шунтирующие кровь в обход них по направлению к печёночным венам. Недостатком этой методики было образование биллом с формированием неправильного мешотчатого трёхмерного строения синусоидов вследствие внутрисосудистого введения вещества для заливки, что не позволяло провести более тщательный морфометрический анализ печёночного сосудистого русла [8].

Методика интравитальной флюоресцентной микроскопии

Интравитальная флюоресцентная микроскопия (ИФМ) необходима для прижизненного изучения струк-

турных изменений микроциркуляторного уровня при экспериментальном ЦП в динамике. С этой целью используются модели билиарного ЦП, вызванного лигированием желчного протока, и ЦП, индуцированного путём подкожного и внутрибрюшинного введения четырёххлористого углерода (CCl₄) [9].

После выполнения срединного и подреберного разреза печёночные связки пересекаются, и левая доля печени размещается на зафиксированной площадке для минимизации дыхательных движений. В яремную или хвостовую вену вводят флюоресцентный краситель, и с помощью флюоресцентного микроскопа анализируют структуру микроциркуляторного русла печени на фоне усиления контрастности тканей.

Методика позволяет визуализировать ЗКП за счёт автофлюоресценции витамина А, оценить количество прокатывающихся и пристеночно стоящих лейкоцитов, относительную сосудистую плотность, диаметр синусоидов и их перфузию, а также скорость и объёмную скорость кровотока [10; 11].

Максимальное количество и наибольший диаметр портосистемных шунтов наблюдаются на 3 неделе от начала создания модели билиарного ЦП, и на 12 неделе при СС14-индуцированном ЦП. Фиброз, активированные ЗКП и структурные изменения микроциркуляторного русла, заключающиеся в уменьшении диаметра синусоидов и увеличении расстояния между ними, располагаются в перипортальной области при билиарном ЦП и в периферической при модели СС14.

Подкожное введение СС14, несмотря на длительность формирования ЦП (16 недель), является более предпочтительным для проведения ИФМ. В отличие от интраперитонеальной инъекции или лигирования, эта модель сопровождается меньшей летальностью и не приводит к образованию спаек между печенью и соседними органами, которые могут впоследствии ограничить возможность проведения *in vivo* исследований в брюшной полости.

Ограничением методики является возможность изучения только поверхностно лежащих структур, поэтому она не даёт возможность оценить диаметр портальных венул, что может быть связано со смещением портальных трактов на более глубокий уровень в результате периферического фиброза.

Трёхмерная микрокомпьютерная томография

Микрокомпьютерная томография (микроКТ) – позволяет получить 3D-изображения высокого разрешения, которые составлены из двухмерных трансосевых проекций, или «срезов» целевого объекта, полученных при вращении излучателя и датчика рентгеновского излучения. При этом, для оценки микроциркуляторного русла *in vivo* применяются рентгеноконтрастные вещества, а для его исследования *ex vivo* – сосудистая заливка [12].

Интравитальная микроКТ проводится с помощью двухэнергетического плоского микрокомпьютерного томографического сканера до и сразу после внутривенного

введения 100 мкл специально оптимизированного рентгеноконтрастного вещества eXIA™160XL. Для реконструкции изображения применяют алгоритм Фелдкамп (Feldkamp) с размером дискретного элемента 35x35x35 мкм³. Относительный объём крови определяют, основываясь на средней яркости ткани печени после инъекции контрастного вещества. Значение показателя коррелирует с выраженностью ангиогенеза. Так, было продемонстрировано статистически значимое увеличение относительного объёма крови в цирротически изменённой печени мышей через 6 недель после первого внутрибрюшинного введения СС14 и через 2 недели после лигирования желчного протока. Достоинством метода является возможность его многократного проведения и наблюдения за процессом в динамике.

Преимуществом микроКТ *ex vivo* является её более высокая разрешающая способность [13; 14]. Она применялась на разных моделях ЦП у мышей и крыс. В её классическом варианте, нижняя полая вена пересекается выше диафрагмы, и рентгеноконтрастный оксид свинца, разведённый в жидком силиконовом полимере (Microfil), вводится в портальную вену со скоростью 8-10 мл/мин и давлением 10-12 мм рт. ст. или внутрисердечно под давлением не выше артериального с использованием автоматической помпы. После забоя животное сохраняют при температуре 4°C в течение 12 часов. В дальнейшем печень забирают, рассекают на доли и фиксируют в формалине, а затем дегидратируют в водном растворе глицерина в возрастающих концентрациях с 24-часовыми интервалами. С помощью микроКТ сканера и специального алгоритма компьютерной обработки получают 3D изображения внутрипечёночного сосудистого русла, которые могут быть проанализированы с использованием специального программного обеспечения [15].

МикроКТ *ex vivo* позволяет оценить отношение объёма, занимаемого сосудами, к объёму ткани печени, и подсчитать число ветвей, отходящих от крупных портальных сосудов. Они обнаруживаются через 6 недель после начала создания модели СС14-индуцированного ЦП и 21 день после лигирования желчного протока, в частности, на периферии. К четвёртой неделе развития билиарного ЦП объём, занимаемый сосудами, возрастает в полтора раза, а количество ветвлений - двухкратно [16], что отражает выраженность ангиогенеза [17].

Ограничением метода является сложность перфузии контрастного вещества, особенно через сосуды микроциркуляторного русла, а также возможность взаимодействия с другими химическими соединениями и тканью. Кроме того, он не позволяет провести окрашивание двумя цветами, что необходимо для дифференцировки венозной и артериальной систем. Это может быть связано с наличием шунтов между печёночными артериолами и портальными венулами, которые функционируют как односторонний клапан, пропускающий кровоток только из артериальной системы в венозную [18].

Для устранения этого недостатка G. Peeters и соавт. [19] через катетеры, установленные в абдоминальную аорту и воротную вену, последовательно вводили кон-

трастное вещество PU4ii жёлтого или синего цвета соответственно после пережатия грудной аорты и почечных артерий. С целью предотвращения повреждения микрососудов нагнетаемым веществом, в нижнюю полую вену через правое предсердие устанавливалась полиэтиленовая дренажная трубка, а для устранения утечки вещества во время процесса полимеризации, пережимались грудной отдел нижней полой вены, абдоминальная часть аорты и воротная вена. Спустя 72 часа, препарат печени замачивали в 25%-м растворе гидроксида калия в течение 5 дней. Полученный сосудистый слепок промывали дистиллированной водой и высушивали в течение 5 дней. Его микроКТ с последующей 3D реконструкцией сосудистой сети проводили, применяя разрешение 1,89 мкм для микроциркуляторного русла и 40 мкм для более крупных сосудов. Для морфологического анализа использовали участок между триадами размерами 350x350x200 мкм³. С помощью специализированной программы DeLiver оценивали средний радиус синусоидов, длину ветвей, извитость и пористость (отношение объёма синусоидов к единице объёма) сосудистой сети. Посредством данной методики у животных с моделью макронодулярного ЦП, индуцированного тиацетамидом (ТАА), эти авторы выявили компрессию печёночных венул и увеличение диаметра печёночной артерии [20].

Иммуногистохимические методы исследования

Внутрисосудистое введение контрастных веществ позволяет изучить структуру только функционирующих сосудов. Для более точной оценки ангиогенеза с учётом зарождающихся и пока не имеющих просвета капилляров применяют иммуногистохимические методы окрашивания гистологических срезов тканей с помощью специфических маркёров, наиболее распространёнными из которых являются фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и мембранные белки CD31 и CD34 для обнаружения эндотелиальных клеток.

В частности, определение экспрессии VEGF и ангиопозитина-1 показало увеличение внутрипечёночной сосудистой плотности у крыс с билиарным ЦП [17].

Разновидностью иммуногистохимического окрашивания является иммунофлюоресценция. В качестве вторичных антител служит стрептавидин, конъюгированный с карбоцианином CY2 [21].

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия после иммуногистохимического окрашивания позволяет изучить трёхмерные структуры с разрешением до 0,2 мкм. Она основывается на улучшенных протоколах химической очистки образцов тканей для более глубокого проникновения красителя и фотонов до и после проведения иммуногистохимии [22; 23]. Последующее конфокальное лазерное сканирование предоставляет детальные объёмные данные о микроциркуляции при размере дискретного элемента 0,63x0,63x1,4 мкм³, которые обрабатываются специально разработанной программой. В исследовании на крысах с моделью ЦП, индуцированного ТАА, эта методика делает возможным определить умень-

шение среднего радиуса, пористости, а также увеличение извитости и длины синусоидов [20].

Методы исследования внепечёночного ангиогенеза

Нарушения органной и системной гемодинамики, а также развитие портосистемного коллатерального кровообращения при ПГ начинаются со спланхической вазодилатации и неоваскуляризации вследствие гипоксии слизистой оболочки тонкой кишки при участии провоспалительных цитокинов, хемокинов и ангиогенных факторов, таких как VEGF, PDGF, PIGF и др. Наибольшую клиническую значимость естественные портосистемные шунты приобретают, прежде всего, при наличии пищеводно-желудочных варикозов, разрыв которых приводит к опасным для жизни кровотечениям. Традиционно считалось, что они образуются путем открытия и расширения предрасположенных сосудов на участках эмбриональной связи между портальным и системным циркуляторным руслом на фоне повышенного портального давления. Эта догма была оспорена M. Fernandez и соавт., впервые сообщившими о формировании портосистемных коллатералей при ПГ вследствие активного ангиогенеза [24].

Интравитальная микроскопия брыжейки тонкой кишки

Интравитальная микроскопия позволяет оценить структурные изменения микроциркуляторного русла, проницаемость сосудистой стенки, а также плотность брыжеечной сосудистой сети, которая характеризует спланхический ангиогенез.

После проведения срединной лапаротомии петля тонкого кишечника извлекается из брюшной полости животного на плексигласовую термостатируемую пластинку. В дальнейшем её постоянно смачивают подогретым до 37 °C сбалансированным солевым раствором Эрла для предотвращения дегидратации. Наблюдения производят с помощью микроскопа AxioTech Vario 100HD, оснащённого водно-иммерсионными объективами с 10- и 40-кратным увеличением, и регистрируют на видео для последующей программной обработки. Это позволяет изучить все звенья микроциркуляторного русла брыжейки тонкой кишки и рассчитать их плотность, которая определяется как отношение длины сосудов к занимаемой ими площади [25].

Для измерения сосудистой проницаемости используется методика эпифлуоресцентной микроскопии. Выбирают неветвящийся участок вены диаметром 20–40 мкм и длиной 150 мкм. Флуоресцентный бычий сывороточный альбумин (БСА) вводят внутривенно. При его просачивании через стенку сосуда просвет вены приобретает более тёмный цвет, а периваскулярное интерстициальное пространство становится светлее, что количественно оценивают на чёрно-белом изображении, принимая чёрный за 0, а белый – за 255.

С помощью интравитальной микроскопии было продемонстрировано увеличение сосудистой плотности и грубое нарушение структуры брыжеечного микроцир-

куляторного русла у крыс с ПГ, вызванной частичным лигированием воротной вены (ЧЛВВ), и билиарным ЦП. Причём, изменения у последних оказались существеннее, что может быть связано с длительностью создания модели. Кроме того, сосудистая проницаемость у этих животных значительно возрастала, в отличие от таковой при внепечёночной ПГ, что объясняется более высокими уровнями eNOS и VEGF [26].

Кроме вышеперечисленного, интравитальная микроскопия используется для количественного определения параметров адгезии и прокатывания лейкоцитов, которые являются маркерами воспаления, в свою очередь приводящего к ангиогенезу. В частности, у крыс с ЦП, индуцированным CCl₄, было отмечено увеличение индекса лейкоцитарно-эндотелиального взаимодействия в микроциркуляторном русле печени и брыжейки тонкой кишки [27]. Недостатком метода является необходимость хирургического вмешательства и извлечения брыжейки из брюшной полости, что через несколько минут вызывает быстрое и выраженное увеличение количества прокатывающихся лейкоцитов в ответ на частичную дегрануляцию периваскулярных тучных клеток и экспрессию эндотелием Р-селектина [28].

Метод оценки ангиогенеза в брыжейке тонкой кишки *in vivo* с помощью имплантации тефлоновых колец

Для интравитальной оценки ангиогенеза в брыжейке тонкой кишки при ПГ могут быть использованы тефлоновые кольца диаметром 7 мм, высотой 3 мм и внутренним диаметром 5 мм, которые располагают внутри сетчатых полиэстеровых мешочков и заполняются смесью бычьего коллагена I типа и бычьего сывороточного альбумина. После срединной лапаротомии и ЧЛВВ кольцо имплантируют между двумя брыжеечными мембранами и фиксируют единичными швами. Через 16 суток, после забоя животного, имплант извлекают и фиксируют в 4%-м растворе формальдегида, парафинизируют и готовят срезы толщиной 3 мкм. Ткань окрашивают для дальнейшей видеоморфометрии и подсчёта сосудистой плотности. Данный метод позволяет определить как количество сосудов, так и механизмы их новообразования [29].

Подсчёт сосудистой плотности с помощью иммунофлуоресценции

Визуализация сосудистой сети может осуществляться посредством иммунологической реакции флуоресцирующих антител с мембранными протеинами эндотелиальных клеток. Для этих целей чаще всего используют антитела против CD-31 и VEGF [30; 31]. Стенку тонкой кишки или её брыжейку промывают в натрий-фосфатном буфере, высушивают на обработанных желатином предметных стеклах и фиксируют в 100%-м метаноле при температуре -20 °C в течение 30 минут. Затем их инкубируют в течение 12 часов с соответствующими первичными мышиными анти-крысиными антителами при 4 °C. В качестве вторичных антител применяется стрептавидин,

конъюгированный с карбоцианином CY2, который наносят при комнатной температуре и выдерживают 1 час. Изображение, полученное при флюоресцентной микроскопии, обрабатывают в программе ImageJ [32].

Другая методика заключается в фиксации замороженных срезов в охлаждённом до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ацетоне на протяжении 10 минут, после чего ткань блокируют 5%-м раствором БСА в течение 45 минут [33]. Помимо CD31, идентификация эндотелиальных клеток возможна при помощи BSI-лектина. Маркёрами периваскулярных клеток являются NG2, десмин, α -гладкомышечный актин, PDFGR β и β -тубулин класса III [34].

Иммуногистохимическое окрашивание

Иммуногистохимическое окрашивание проводится не только для изучения внутрипечёночного, но и внепечёночного ангиогенеза, в том числе в брыжейке тонкой кишки и стенке желудка. Наличие ангиогенеза в брыжейке тонкой кишки было подтверждено многочисленными экспериментальными исследованиями у лабораторных животных с различными моделями ПГ [35].

Тканевой оксидативный стресс, возникающий при ПГ, усугубляет патофизиологические изменения, происходящие в стенке желудка. Он обнаруживается путём реакции антител с возникающими при свободно-радикальном окислении метаболитами, такими как нитротирозин. В частности, у крыс с моделью внепечёночной ПГ, созданной путём ЧЛБВ, продемонстрирована повышенная экспрессия eNOS, VEGF и нитротирозина в стенке желудка, свидетельствующая о наличии здесь стимулов для дальнейшего развития коллатеральной циркуляции [36].

Требования к анализу изображений микроциркуляторного русла, полученных при интравитальной микроскопии

Для анализа микроциркуляторного русла при интравитальной микроскопии используются микроскопы с возможностью видеозахвата изображения. При этом рекомендуется соблюдать следующие требования [37]:

- в анализ необходимо включать не менее трёх, а желательнее – пять произвольных участков микроциркуляторного русла;
- оптическое увеличение для визуализации микроциркуляции мелких лабораторных животных должно быть 10-кратным;
- следует избегать артефактов давления, возникающих при приложении объектива к анализируемому участку и характеризующихся изменением или прекращением кровотока по венам;
- видеозаписи целесообразно сохранять в полном размере без сжатия в виде DV-AVI файлов, чтобы обеспечить возможность компьютерного покадрового анализа, при этом оптимальное время видеозаписи составляет 20 секунд.

В идеальный отчёт об анализе изображений, полученных с помощью интравитальной микроскопии, нужно включать следующие параметры, рассчитываемые как для всех сосудов, так и для капилляров в отдельности:

- общую сосудистую плотность и плотность со-

судов с сохранённым кровотоком, которые рассчитываются как отношение их суммарной длины к площади изображения;

- количество сосудов с сохранённым кровотоком, выраженное в процентах;
- скорость кровотока, или индекс кровотока;
- индекс гетерогенности, который рассчитывается как отношение разницы максимальной и минимальной скорости кровотока к его средней скорости в пяти выбранных участках изображения.

Вычисления могут производиться непосредственно исследователем с помощью полуколичественных шкал для визуальной оценки [38; 39]. Для более точного анализа искомым параметрам применяется программа CapImage, разработанная для интравитальной микроскопии [40].

Для подсчёта количества сосудов на изображениях иммуногистохимически окрашенных препаратов можно использовать приложение Aperio [41] или алгоритм CAIMAN [42]. Программа AngioPath позволяет узнать не только количество, но также размер и форму как всех микрососудов, так и каждого в отдельности, что является важным для характеристики ангиогенеза [43].

Сканирующая электронная микроскопия

Метод СЭМ сосудистых наливков может служить для визуализации трёхмерной структуры спланхического сосудистого русла с последующим количественным анализом. Его применение у животных с моделями ЧЛБВ и билиарного ЦП позволило выявить сеть хаотично расположенных, извитых новообразованных сосудов, выполняющих роль шунтов между ветвями воротной и нижней полой вен. Кроме того, в стенках некоторых капилляров обнаруживались отверстия, свидетельствующие об интуссусцептивном ангиогенезе, представляющем один из принципов роста микрососудов, помимо простого ветвления [8].

Оценка портосистемного шунтирования

Метод микросфер для оценки степени портосистемного шунтирования

В 1981 году M. Chojkier и R.J. Groszmann для оценки степени портосистемного шунтирования предложили использовать ^{51}Cr -меченые микросферы [44]. Модификация этой методики с их заменой на цветные полистироловые получила широкое распространение в настоящее время, поскольку это исключает работу с опасным радиоактивным материалом при сохранении точности исследования [45].

В селезёнку медленно вводят 30000 жёлтых микросфер размером 15 мкм. После забоя животных, печень и лёгкие извлекают и помещают в центрифужные пробирки. В качестве внутреннего контроля добавляют 3000 голубых микросфер. Ткань расщепляют в течение 12 часов в одномолярном КОН при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ и затем обрабатывают ультразвуком. После центрифугирования, надосадочную жидкость удаляют и гранулы промывают один раз в 10%-м растворе Triton X-100 и дважды в подкисленном

этанол. Осадок, содержащий микросферы, высушивают в течение 12 часов, разбавляют в подкисленном ацетате Cellosolve, и подсчитывают количество микросфер с помощью спектрофотометра. Для этого так же можно использовать гемоцитометр и эпифлюоресцентный микроскоп [46]. Степень портосистемного шунтирования рассчитывается как отношение числа лёгочных микросфер к их сумме в лёгких и печени [47].

Так, методом микросфер было выявлено, что у крыс с моделью ПГ, вызванной ЧЛВВ, порто-системные коллатерали образуются уже на вторые сутки после её создания и достигают максимума к 7 суткам [48]. В то же время, у крыс с моделью билиарного ЦП они развиваются позже, в связи с чем их целесообразно оценивать через 1 месяц после лигирования желчного протока [49].

3D микро-однотонная эмиссионная компьютерная томография (3D микро-ОФЭКТ)

Поскольку существенным недостатком метода микросфер является необходимость забоя лабораторного животного, в качестве альтернативы была разработана 3D микро-ОФЭКТ с ^{99m}Tc технеций-микроагрегированным альбумином (^{99m}Tc -ММА). Она позволяет проводить серийное измерение порто-системного шунтирования на разные сроки от создания модели. Частицы ^{99m}Tc -ММА вводят в пульпу селезёнки, после чего их накопление в печени и лёгких определяют по цветовым шкалам с помощью специальной компьютерной обработки.

3D микро-ОФЭКТ применялась у мышей с моделью ЧЛВВ и билиарного ЦП. Её результаты коррелирова-

ли с таковыми при использовании ^{51}Cr -меченых микросфер, при этом не было отмечено изменений поведения или смерти лабораторных животных после повторного использования на 8, 12 и 15 день от создания модели [50].

Заключение

Применение современных методов изучения ангиогенеза в эксперименте позволило установить его важную роль в патогенезе ПГ. Несмотря на изначально компенсаторную функцию, он приводит к прогрессированию свойственных ей гемодинамических нарушений. Разработка способов антиангиогенной терапии, избирательно направленной на необычно растущие вновь образованные сосуды, может быть перспективным направлением в лечении ПГ и связанных с ней осложнений. ■

Арефьев Н.О., аспирант кафедры патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава РФ, г. Челябинск; Гарбузенко Д.В., д.м.н., профессор, профессор кафедры факультетской хирургии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава РФ, г. Челябинск; Казачков Е.Л., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава РФ, г. Челябинск; Бордуновский В.Н., д.м.н., профессор, зав. кафедрой факультетской хирургии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава РФ, г. Челябинск; Автор, ответственный за переписку - Арефьев Н.О., 454108, г. Челябинск, ул. Тухачевского, д. 12, кв. 229, +7 (922) 232-79-42, nikolai.arefyev@gmail.com

Литература:

1. Гарбузенко Д.В. Морфофункциональная перестройка печёночного сосудистого русла в патогенезе портальной гипертензии при циррозе печени. *Тер арх* 2014; 86 (2): 90-5.
2. Гарбузенко Д.В. Механизмы адаптации сосудистого русла к гемодинамическим нарушениям при портальной гипертензии. *Вестн РАМН* 2013; (1): 52-7.
3. Rosmorduc O. Antiangiogenic therapies in portal hypertension: a breakthrough in hepatology. *Gastroenterol Clin Biol* 2010; 34 (8-9): 446-9.
4. Гарбузенко Д.В. Экспериментальные методы изучения портальной гипертензии. *Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол* 2010; 20 (2): 4-12.
5. Fernández M., Semela D., Bruix J., Colle I., Pinzani M., Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009; 50 (3): 604-20.
6. McDonald D.M., Choyke P.L. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med* 2003; 9 (6): 713-25.
7. Takashimizu S., Kojima S., Nishizaki Y. et al. Effect of endothelin A receptor antagonist on hepatic hemodynamics in cirrhotic rats. Implications for endothelin-1 in portal hypertension. *Tokai J Exp Clin Med* 2011; 36 (2): 37-43.
8. Van Steenkiste C., Trachet B., Casteleyn C. et al. Vascular corrosion casting: analyzing wall shear stress in the portal vein and vascular abnormalities in portal hypertensive and cirrhotic rodents. *Lab Invest* 2010; 90 (11): 1558-72.
9. Niggemann P., Murata S., Naito Z., Kumazaki T. A comparative study of the microcirculatory changes in the developing liver cirrhosis between the central and peripheral parts of the main lobe in mice. *Hepatol Res* 2004; 28 (1): 41-48.
10. Vanheule E., Geerts A.M., Van Huysse J. et al. An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in cirrhotic mice models: relationship between fibrosis and angiogenesis. *Int J Exp Pathol* 2008; 89 (6): 419-32.
11. Yang Y.Y., Huang Y.T., Lin H.C. Thalidomide decreases intrahepatic resistance in cirrhotic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380 (3): 666-72.
12. Boerckel J.D., Mason D.E., McDermott A.M., Alsberg E. Microcomputed tomography: approaches and applications in bioengineering. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5 (6): 144.
13. Ehling J., Bartneck M., Wei X. et al. CCL2-dependent infiltrating macrophages promote angiogenesis in progressive liver fibrosis. *Gut* 2014; 63 (12): 1960-71.

14. Bartneck M., Fech V., Ehling J. et al. Histidine-rich glycoprotein promotes macrophage activation and inflammation in chronic liver disease. *Hepatology* 2016; 63 (4): 1310-24.
15. Jorgensen S.M., Demirkaya O., Ritman E.L. Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT. *Am J Physiol* 1998; 275 (3 Pt 2): H1103-14.
16. Thabut D., Routray C., Lomberk G. et al. Complementary vascular and matrix regulatory pathways underlie the beneficial mechanism of action of sorafenib in liver fibrosis. *Hepatology* 2011; 54 (2): 573-85.
17. Lin H.C., Huang Y.T., Yang Y.Y. et al. Beneficial effects of dual vascular endothelial growth factor receptor/fibroblast growth factor receptor inhibitor brivanib alaninate in cirrhotic portal hypertensive rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 29 (5): 1073-82.
18. Kline T.L., Knudsen B.E., Anderson J.L., Vercnocke A.J., Jorgensen S.M., Ritman E.L. Anatomy of hepatic arteriolo-portal venular shunts evaluated by 3D micro-CT imaging. *J Anat* 2014; 224 (6): 724-31.
19. Peeters G., Debbaut C., Laleman W. et al. A multilevel framework to reconstruct anatomical 3D models of the hepatic vasculature in rat livers. *J Anat* 2017; 230 (3): 471-83.
20. Peeters G., Debbaut C., Friebe A. et al. Quantitative analysis of hepatic macro- and microvascular alterations during cirrhogenesis in the rat. *J Anat* 2017 Dec 4 [Epub ahead of print].
21. Hsu S.J., Lee J.Y., Lin T.Y. et al. The beneficial effects of curcumin in cirrhotic rats with portal hypertension. *Biosci Rep* 2017; 37 (6).
22. Renier N., Wu Z., Simon D.J. et al. iDISCO: simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* 2014; 159: 896-910.
23. Susaki E.A., Tainaka K., Perrin D. et al. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 2014; 157: 726-39.
24. Bosch J., Groszmann R.J., Shah V.H. Evolution in the understanding of the pathophysiological basis of portal hypertension: How changes in paradigm are leading to successful new treatments. *J Hepatol* 2015; 62 (1 Suppl): S121-30.
25. Арефьев Н.О., Гарбузенко Д.В., Емельянов И.В., Хасанов Л.Р. Оценка неоангиогенеза в брыжейке тонкой кишки у крыс с моделью предпечёночной портальной гипертензии. *Рос журн гастроэнтерол, гепатол, колопроктол* 2017; 27 (приложение 50): 83.
26. Geerts A.M., De Vriese A.S., Vanheule E. et al. Increased angiogenesis and permeability in the mesenteric microvasculature of rats with cirrhosis and portal hypertension: an in vivo study. *Liver Int* 2006; 26: 889-98.
27. Maksan S.M., Ryschich E., Ulger Z., Gebhard M.M., Schmidt J. Disturbance of hepatic and intestinal microcirculation in experimental liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11 (6): 846-9.
28. Yamaki K., Lindbom L., Thorlacius H., Hedqvist P., Raud J. An approach for studies of mediator-induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. *Br J Pharmacol* 1998; 123 (3): 381-9.
29. Sumanovski L.T., Battegay E., Stumm M., van der Kooij M., Sieber C.C. Increased angiogenesis in portal hypertensive rats: role of nitric oxide. *Hepatology* 1999; 29 (4): 1044-9.
30. Anderson C.R., Ponce A.M., Price R.J. Immunohistochemical identification of an extracellular matrix scaffold that microguides capillary sprouting in vivo. *J Histochem Cytochem* 2004; 52 (8): 1063-72.
31. Abraldes J.G., Iwakiri Y., Loureiro-Silva M., Haq O., Sessa W.C., Groszmann R.J. Mild increases in portal pressure upregulate vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in the intestinal microcirculatory bed, leading to a hyperdynamic state. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290 (5): G980-7.
32. Huang H.C., Wang S.S., Hsin I.F. Cannabinoid receptor 2 agonist ameliorates mesenteric angiogenesis and portosystemic collaterals in cirrhotic rats. *Hepatology* 2012; 56 (1): 248-58.
33. Patsenker E., Popov Y., Stickel F. Pharmacological inhibition of integrin alphavbeta3 aggravates experimental liver fibrosis and suppresses hepatic angiogenesis. *Hepatology* 2009; 50 (5): 1501-11.
34. Yang M., Stapor P.C., Peirce S.M., Betancourt A.M., Murfee W.L. Rat Mesentery Exteriorization: A Model for Investigating the Cellular Dynamics Involved in Angiogenesis. *J Vis Exp* 2012; 63: e3954.
35. McConnell M., Iwakiri Y. Biology of portal hypertension. *Hepatol Int* 2017 [Epub ahead of print].
36. Licks F., Hartmann R. M., Marques C., Schemitt E., Colares J. R., Soares M. do C. et al. N-acetylcysteine modulates angiogenesis and vasodilation in stomach such as DNA damage in blood of portal hypertensive rats. *World J Gastroenterol* 2015; 21 (43): 12351-60.
37. De Backer D., Hollenberg S., Boerma C. et al. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit Care* 2007; 11 (5): R101.
38. De Backer D., Creteur J., Preiser J.C., Dubois M.J., Vincent J.L. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166 (1): 98-104.
39. Spronk P.E., Ince C., Gardien M.J., Mathura K.R., Oudemans-van Straaten H.M., Zandstra D.F. Nitroglycerin in septic shock after intravascular volume resuscitation. *Lancet* 2002; 360 (9343): 1395-6.
40. Klyszcz T., Jünger M., Jung F., Zeintl H. Cap image—a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl)* 1997; 42 (6): 168-75.
41. Aperio Technologies I. *Microvessel Analysis Algorithm, User'S Guide @ONLINE*. 2008.
42. Reyes-Aldasoro C.C., Williams L.J., Akerman S., Kanthou C., Tozer G.M. An automatic algorithm

- for the segmentation and morphological analysis of microvessels in immunostained histological tumour sections. *J Microsc* 2011; 242 (3): 262–278.
43. Fernández-Carrobles M.M., Tadeo I., Bueno G. et al. TMA Vessel Segmentation Based on Color and Morphological Features: Application to Angiogenesis Research. *The Scientific World Journal* 2013; 2013: 263190.
44. Chojkier M., Groszmann R.J. Measurement of portal-systemic shunting in the rat by using γ -labeled microspheres. *Am J Physiol* 1981; 240: G371–G375.
45. Hodeige D., de Pauw M., Eechaute W., Weyne J., Heyndrickx, G. R. On the validity of blood flow measurement using colored microspheres. *Am J Physiol* 1999; 276: H1150–H1158.
46. Theodorakis N., Maluccio M., Skill N. Murine study of portal hypertension associated endothelin-1 hyporesponse. *World J Gastroenterol* 2015; 21 (16): 4817–28.
47. Hsu S.J., Wang S.S., Hsin I.F. et al. Green tea polyphenol decreases the severity of portosystemic collaterals and mesenteric angiogenesis in rats with liver cirrhosis. *Clin Sci (Lond)* 2014; 126 (9): 633–44.
48. Fernandez M., Vizzutti F., Garcia-Pagan J.C., Rodes J., Bosh J. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology* 2004; 126: 886–94.
49. Lee P.C., Yang Y.Y., Huang C.S. et al. Concomitant inhibition of oxidative stress and angiogenesis by chronic hydrogen-rich saline and N-acetylcysteine treatments improves systemic, splanchnic and hepatic hemodynamics of cirrhotic rats. *Hepatol Res* 2015; 45 (5): 578–88.
50. Van Steenkiste C., Staelens S., Deleue S. et al. Measurement of porto-systemic shunting in mice by novel three-dimensional micro-single photon emission computed tomography imaging enabling longitudinal follow-up. *Liver Int* 2010; 30 (8): 1211–20.