

Луста К. А.

УЧАСТИЕ МЕДИАТОРОВ ВОСПАЛЕНИЯ В РАЗВИТИИ АТЕРОСКЛЕРОЗА В СТЕНКАХ АОРТЫ ЧЕЛОВЕКА

Научно-исследовательский институт морфологии человека, г. Москва, Россия

В последнее десятилетие достигнуты большие успехи в понимании биологии атеросклероза. Фундаментальную роль на всех стадиях атерогенеза играет воспаление в стенках сосудов. Детальное изучение воспалительных реакций поможет установить важную связь между факторами риска и механизмами атерогенеза [1, 2].

Макрофаги (МФ) являются одними из ключевых участников формирования атеросклеротических поражений (АСП) в стенках сосудов. В их популяции выявляется фенотипическая дифференциация. Согласно модели двух типов активации МФ: М1 экспрессируют провоспалительные медиаторы, такие как TNF- α (цитокин, влияющий на липидный метаболизм и функционирование эндотелия), CD16 (трансмембранный белок, участвующий в передаче сигналов и клеточной цитотоксичности), CD32 (рецептор иммуноглобулинов, участвующий в фагоци-

тозе и модуляции выработки антител), CD64 (связывает иммунные комплексы и участвует в клеточной цитотоксичности), MMP9 (матриксная металлопротеиназа, участвующая в перестройке внеклеточного матрикса и патогенезе инфекционных и воспалительных заболеваний). M2 экспрессируют противовоспалительные медиаторы, такие как CCL18 (хемокин, участвующий в привлечении T-лимфоцитов), CD163 (участвует в эндоцитозе и действует как противовоспалительный сигнал), CD206 (маннозный рецептор макрофагов, участвует в эндоцитозе патогенных вирусов и бактерий), LOX-1 (скэвенджер-рецептор, участвующий в эндоцитозе липопротеидов низкой плотности), Stabilin-1 (рецепторный белок, участвующий в адгезии клеток и связывании с бактериями) [3]. В последнее время повысился интерес к участию гладкомышечных клеток (ГМК) в атерогенезе. Проводятся исследования молекулярных механизмов, которые модулируют поведение этих клеток и формирование атеросклеротических бляшек. Внимание сосредоточено на изучении медиаторов атерогенеза, таких как воспалительные молекулы и липопротеины, аутокринные и паракринные регуляторы, механизмов изменения фенотипа и функции ГМК при атеросклерозе [4].

Задачей исследования было проследить локализацию и распределение медиаторов воспаления, являющихся маркерами макрофагов и ГМК, изучить функциональную активность и реактивные свойства этих клеток при развитии атеросклероза в аорте человека методом иммуногистохимии, а также изучить влияние баланса между этими факторами на процесс атерогенеза.

Материал и методы. Исследование проводили в соответствии с принципами Хельсинкской Декларации от 1983 г. Аутопсийный материал аорты брали от мужчин в возрасте от 49 до 65 лет, умерших от острой сердечно-сосудистой недостаточности. АСП оценивали макроскопически по классификации Американской ассоциации заболеваний сердца и обозначали как: нормальное состояние (0), начальное поражение (I), жировая полоса (II), липофиброзная бляшка, ЛФБ (Va) и фиброзная бляшка, ФБ (Vc). Образцы тканей фиксировали в фиксаторе Мирского и заливали в парафиновые блоки. 5-мкм срезы монтировали на предметные стекла с адгезивным покрытием, высушивали при 37 °С, депарафинировывали, инкубировали в цитратном буфере (pH 6,0) при 98 °С и затем охлаждали при $t_{\text{комн}}^{\circ}$ с целью раскрытия антигена. Иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание одного антигена проводили с использованием системы Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen (LabVision Corporation, UK) согласно рекомендуемому производителем протоколу. Докрашивали с помощью гематоксилина по Майеру. Для отрицательного контроля заменяли первичные антитела неиммунной фракцией иммуноглобулина.

Для двойного ИГХ окрашивания использовали систему MultiVision Polymer Detection System: (Thermo Scientific™), включающую противомышинные антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой и противокроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена для одновременного выявления на парафиновых срезах двух антигенов дифференцированно окрашенных в красный и черный цвета. В качестве АТ использовали противочеловеческие анти-TNF- α (мышинные моноклональные АТ, BioScience, 1:50) и противочеловеческие анти-CCL18 (кроличьи поликлональные АТ, LifeSpan BioSciences, 1:100) [5].

Результаты и обсуждение. Исследования показали, что распределение как провоспалительных, так и противовоспалительных факторов (цитокинов, хемокинов и рецепторов), являющихся маркерами M1 и M2 популяций макрофагов и ГМК, в стенках сосудов происходит неравномерно по всем зонам интимального слоя, как в субэндотелии, так и в мышечно-эластическом слое на всех этапах атерогенеза. Провоспалительные медиаторы: TNF- α , CD16, CD32 и CD64 в зонах АСП на стадиях I и II отсутствовали в эндотелии и субэндотелии, а выявлялись в локальных участках, связанных со скоплениями клеток в более глубоких областях протеогликанового и мышечно-эластического слоев (рис. 1).

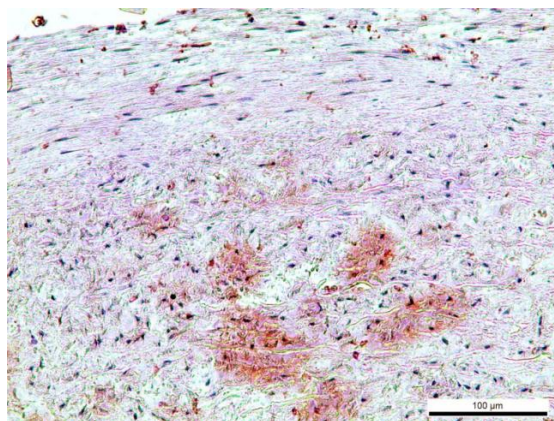


Рис. 1. Иммуногистохимическое выявление CD16 на ранней стадии АСП

Присутствие этих маркеров в МЭС с очевидностью указывает на изменения фенотипа и функции ГМК и на их участие в воспалительном процессе. В то же время, наиболее заметную экспрессию противовоспалительных маркеров: CCL18, CD163, CD206, LOX-1 и Stabilin-1 обнаруживали в эндотелии и субэндотелиальном пространстве (рис. 2).

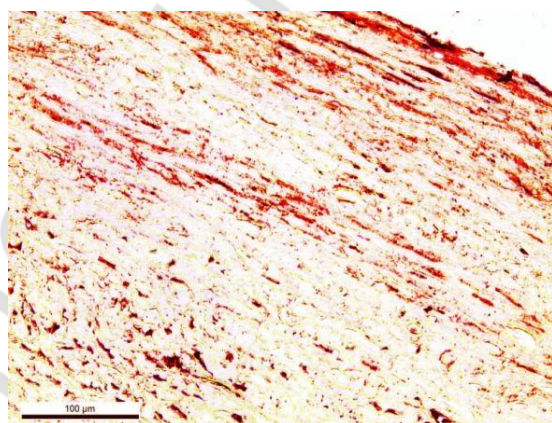


Рис. 2. Двойное иммуногистохимическое окрашивание провоспалительного TNF- α (черный) и противовоспалительного CCL18 (красный) в области жировой полосы

Соотношение и распределение M1 и M2 маркеров претерпевают существенные изменения в ходе атерогенеза. Иммуногистохимический анализ показал, что количественное содержание всех маркеров, использованных в данной работе, повышалось в областях АСП (Va и Vc), по сравнению с участками сте-

нок аорты с нормальным состоянием и на начальных этапах поражения I и II. В районе ФБ все исследованные нами ИГХ-маркеры были сосредоточены в глубоких слоях МЭС и меди и в виде интенсивно окрашенных зон (рис. 3).

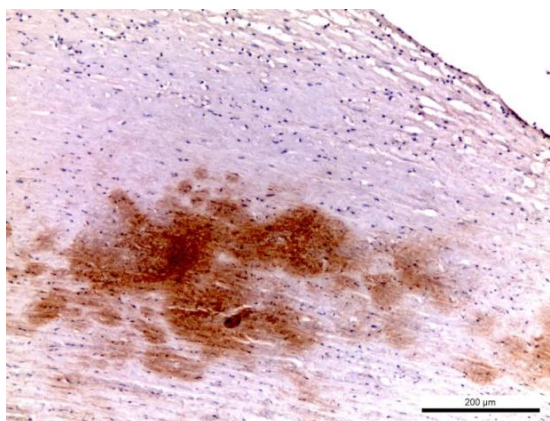


Рис. 3. Иммуногистохимическое выявление CD206 в области липофиброзной бляшки

Выводы. Механизмы развития воспалительного процесса в стенке артерий регулируются сложной сетью провоспалительных и противовоспалительных медиаторов. Углубленное изучение роли различных типов клеток и медиаторов воспаления в патогенезе атеросклероза позволит выявить новые закономерности взаимосвязи между ключевыми элементами и сформировать новые подходы к терапии данной патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Нагорнев, В. А.* Атерогенез как отражение развития иммунного воспаления в сосудистой стенке / В. А. Нагорнев, О. А. Яковлева, С. В. Мальцева // Вестник РАМН. 2000. № 10. С. 364–371.
2. *Libby, P.* Inflammation and atherosclerosis / P. Libby, P.M. Ridker, A. Maseri // *Circulation*. 2002. Vol. 105. P. 1135–1143.
3. *Луста, К. А.* Роль провоспалительных и противовоспалительных медиаторов в атерогенезе / К. А. Луста, А. Н. Орехов // Клиническая и экспериментальная морфология. 2014. № 3. С. 60–72.
4. *Луста, К. А.* Роль гладкомышечных клеток сосудистой стенки в атерогенезе / К. А. Луста, А. Н. Орехов // Клиническая и экспериментальная морфология. 2015. № 2. С. 50–61.
5. *Луста, К. А.* Применение метода двойного иммуногистохимического маркирования для исследования механизмов атерогенеза аорты человека / К. А. Луста, А. Н. Орехов // Клиническая и экспериментальная морфология. 2014. № 4. С. 23–29.

Lusta K. A.

Participation of inflammatory mediators in development of atherosclerosis in the human aorta

Research Institute of Human Morphology, RAMS, Moscow, Russia

The localization and distribution of the markers of differentiated M1 and M2 macrophage populations and smooth muscle cells in the human aortic wall was inves-

tigated by immunohistochemical analysis. The important role of inflammatory mediators in the development of atherosclerosis was shown. Differences in the distribution of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, chemokines, adhesion molecules and intercellular communication molecules at different stages of atherogenesis were established.

Key words: atherosclerosis, aorta, atherogenesis, inflammatory mediators, immunohistochemistry.