

DOI: 10.26693/jmbs03.06.062

УДК 616.13.002.2-004.6-092.9:616-097

Трясак Н. С.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТІНКИ ВІНЦЕВИХ АРТЕРІЙ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗІ

ДЗ «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України»,
Дніпро, Україна

nataliatryasak@gmail.com

Були досліджені морфологічні особливості різних типів дендритних клітин стінки вінцеви артерій в умовах експериментального атеросклерозу. Тваринам вводили нативні ліпопротеїни низької щільності людини. Дендритні клітини ідентифікували за допомогою поліклональних антитіл S-100 і моноклональних антитіл CD1a. Для визначення інтенсивності експресії імуногістохімічних маркерів використовували напівкількісну шкалу від 0 до 3 балів. Гістологічне забарвлення стінки вінцеви артерій проводили гематоксиліном та еозином. Стінки інтактних вінцеви артерій містили 1 та 2 тип дендритних клітин. В вінцеви артеріях уражених атеросклерозом спостерігали 3 та 4 тип дендритних клітин. Вперше появу 3 типу дендритних клітин відзначали на 12-му тижні експерименту, що відповідає стадії ліпоїдозу. Поява 4 типу дендритних клітин припадала на 18-й тиждень експерименту і співпадала зі стадією ліпосклерозу. По міру прогресування атеросклеротичного процесу дендритні клітини зазнавали змін в морфологічній структурі, топографії та рівнях експресії S-100 та CD1a. Кількісна динаміка дендритних клітин протягом експерименту мала лінійний характер, збільшуючись від $3,89 \pm 0,07$ клітин на 4-му тижні до $14,72 \pm 0,31$ клітин на 18-му тижні.

Ключові слова: атеросклероз, дендритні клітини, вінцеви артерії, S-100, CD1a.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота є фрагментом науково-дослідної роботи «Гістологічні аспекти взаємодії дендритних клітин із мікрооточенням у складі внутрішніх органів в умовах експериментального моделювання патологічних станів», № державної реєстрації 0113U006627.

Вступ. Атеросклероз представляє собою хронічне прогресуюче захворювання артерій еластичного та м'язово-еластичного типу, що поєднує в собі риси запального процесу та порушення обміну ліпідів [8]. В останнє десятиріччя науковці активно розвивають імунну теорію атерогенезу як логічне

продовження запальної концепції, в якій ключову роль відводять дендритним клітинам (ДК), в зв'язку з їх унікальними можливостями не тільки розпізнавати, захоплювати та презентувати антигени, а й контролювати активацію та проліферацію інших імунокомпетентних клітин, серед яких: Т- і В-лімфоцити, моноцити, макрофаги та піністі клітини [6, 8]. Передбачається, що в умовах, коли інтима судин позбавлена іннервації, ДК виступають координаторами між різними клітинами інтими та формують систему клітинної інтеграції [4].

ДК, в залежності від ступеня зрілості, поділяють на 3 субпопуляції: незрілі, дозріваючі та зрілі [10]. Основними функціями незрілих ДК є захоплення та процесинг антигенів у місцях своєї первинної локалізації в периферичних тканинах, зокрема і в стінці артерій, тоді як зрілі клітини потребують міграції у вторинні лімфоїдні органи для передачі інформації ефекторним Т-лімфоцитам [6]. Функціональна активність різних типів ДК залежить від сигналів їх мікрооточення, які безпосередньо впливають на дозрівання, диференціювання та міграційну активність клітин [1, 3].

Незважаючи на велику кількість досліджень, залишаються суперечливими і потребують уточнення дані щодо морфологічних особливостей різних субпопуляцій дендритних клітин та їх участь в розвитку атеросклеротичного процесу.

Мета дослідження. Встановити морфологічні особливості дендритних клітин на різних етапах розвитку атеросклеротичного пошкодження стінки вінцеви артерій в експерименті.

Матеріал і методи дослідження. Дослідження проведено на 120 білих безпородних щурах обох статей віком 8-10 тижнів та вагою 180–210 г. Тварини були розподілені таким чином: I група – група контролю (n = 40) – тварини, які отримували неповний ад'ювант Фрейнда у дозі 0,1 мл внутрішньошкірно, II група – експериментальна група (n = 80) – тварини, імунізовані нативними ліпопротеїнами низької щільності (ЛПНЩ) людини, розведеними неповним ад'ювантом Фрейнда з метою підсилення імунної відповіді.

Для відтворення атеросклеротичного пошкодження стінки вінцевої артерії щурів застосовували відпрацьовану модель [2], згідно якої нативні ЛПНЩ людини (ProSpec, USA) вводили щурам внутрішньошкірно одноразово в дозі 200 мкг з додаванням 0,1 мл неповного ад'юванта Фрейнда (Vecton Dickinson, USA) незалежно від ваги. Ампула з нЛПНЩ, отриманими зі свіжої плазми людини, розкривалася в день імунізації. Тварини знаходилися у звичайних умовах та раціоні віварію.

Термін експерименту складав 18 тижнів. Тварин виводили з експерименту щотижня, починаючи із 4-го тижня, шляхом передозування тіопентоловим наркозом. При утриманні тварин та проведенні досліджень додержувались Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 року № 3447-IV та положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 18.03.1986 р.).

Для подальшого гістологічного дослідження вінцева артерія з прилеглим міокардом фіксували в 10% розчині нейтрального забуференого формаліну, зневоднювали в етилових спиртах зростаючої концентрації із подальшим виготовленням парафінових блоків за допомогою ксилолу в якості проміжного середовища. Гістологічні зрізи виготовляли завтовшки 4 мкм за допомогою мікротому Microm HM 360 (Microm Laborgerate, Germany). Забарвлення депарафінованих, регідратованих зрізів проводили з використанням гематоксиліну та еозину.

Імуногістохімічне дослідження проводилось згідно протоколів компанії DAKO (USA) – виробника первинних антитіл, які використовувались у нашому дослідженні. У зрізах завтовшки 4 мкм використовували систему візуалізації LSAB Plus (USA). Для ідентифікації дендритних клітин застосовувались поліклональні антитіла S-100 та моноклональні CD1α (клон O10). Для оцінки інтенсивності імуногістохімічної мітки використовували напівкількісну шкалу від «–» до «+++». Враховувався ступінь експресії антигенних детермінант у полі зору: – (0 балів) – відсутність реакції, + (1 бал) – слабка реакція, ++ (2 бали) – помірна реакція, +++ (3 бали) – виражена реакція.

Оцінку гістологічних зрізів виконували під світловим мікроскопом Ulab ху-b2t (China), оснащеним цифровою фотокамерою TourCam UCMS0-3100KPA (China) з використанням програмного забезпечення TourView 3.2.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою ліцензійної програми STATISTICA 6.1. Результати наведено як ($M \pm m$), де M – середнє значення показника, m – стандартна похибка. Достовірними вважали результати при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

Імуногістохімічне дослідження стінки вінцевої артерії щурів дозволило виділити 4 типи дендритних клітин, які мали характерні відмінності в морфологічній будові, топографії та рівнях експресії антигенних детермінант.

Слід зазначити, що у всіх типах ДК реєструвалась помірна (++) або виражена (+++) інтенсивність накопичення протеїну S-100, тоді як рівень експресії маркеру CD1α був різним. 1 тип ДК характеризувався округлою формою, площею 8–10 μm^2 , ексцентрично розташованим ядром овальної форми, відсутністю відростків та експресії маркеру CD1α, що свідчило про їх функціональну незрілість [5]. Клітини 2 типу мали видовжену форму, площа клітинного тіла сягала 12–15 μm^2 , округле ядро займало центральну локалізацію та виявлявся низький (+) рівень експресії CD1α. Характерними особливостями 3 типу ДК була їх полігональна форма, поява 1–2 відростків та помірна (++) інтенсивність накопичення маркеру CD1α. До 4 типу відносились клітини неправильної форми, які мали площу тіла 18–20 μm^2 , більшу кількість відростків, порівняно з ДК 3 типу, а також виражений (+++) ступінь експресії CD1α, що вказувало на їх дозрівання [7].

На 4-му тижні експерименту в стінці вінцевої артерії як середнього, так і дрібного калібру виявлявся 1 та 2 тип ДК. Вони поодинокі локалізувались в підендотеліальному шарі інтими в хаотичному порядку. Ця закономірність розташування прослідковувалась у тварин обох груп спостереження та пов'язана із необхідністю постійного сканування стінки вінцевої артерії на присутність потенційно небезпечних антигенів з метою підтримання судинного гомеостазу [5]. Стінка вінцевої артерії середнього та дрібного калібру II групи тварин значно не відрізнялась за кількістю 1 типу ДК ($2,12 \pm 0,03$ та $2,20 \pm 0,04$ відповідно) від I групи ($2,08 \pm 0,07$). Вміст 2 типу ДК в стінці артерії середнього калібру достовірно відрізнявся від аналогічного показника стінки судин дрібного калібру ($1,77 \pm 0,04$ та $1,36 \pm 0,02$ відповідно) в обох групах спостереження.

Введення нативних ЛПНЩ людини щурам викликало на 6-му тижні експерименту зростання кількості 1 типу ДК в стінці вінцевої артерії дрібного калібру до $3,43 \pm 0,08$ клітин ($p < 0,05$) на відміну від артерії середнього калібру, де їх вміст залишався на попередньому рівні. Також вони змінювали своє розташування і виявлялись в безпосередній близькості з ендотеліоцитами, мали поздовжню орієнтацію та іноді утворювали ланцюжки із кількох поруч розташованих клітин. Водночас, вміст та взаєморозташування 2 типу ДК в стінці досліджуваних судин залишалися практично ідентичними з попереднім терміном спостереження. В I групі

тварин змін у кількості маркер-специфічних клітин в цей період не виявлено.

8-й тиждень експерименту в II групі тварин характеризувався збільшенням у 1,5 рази кількості 1 типу ДК ($3,18 \pm 0,11$) в артеріях середнього калібру, порівняно з попереднім етапом дослідження та групою I ($2,10 \pm 0,05$ та $2,14 \pm 0,04$ відповідно, $p < 0,05$), в той час, як їх вміст в артеріях дрібного калібру зберігався на попередньому високому рівні. На даному терміні спостереження встановили закономірність локалізації 1 типу ДК під ендотелієм в тих ділянках, де відбувалась посилена адгезія моноцитів до його люмінальної поверхні. Антигенне навантаження тварин II групи викликало зростання і кількості 2 типу ДК як в стінці вінцевої артерії середнього, так і дрібного калібру ($2,66 \pm 0,12$ та $2,04 \pm 0,07$ відповідно, $p < 0,05$). Їх топографія значно не відрізнялась від попереднього терміну дослідження. В I групі тварин кількість та розташування ДК на даному етапі не змінювались.

На 12-му тижні від початку експерименту в стінці артерій середнього калібру II групи тварин з'являвся 3 тип ДК. Їх кількість становила $3,26 \pm 0,05$ клітин та найбільша концентрація спостерігалась в ділянках ідентифікації макрофагів та пінистих клітин. Також статистично вагомо зростала кількість 1 типу ДК до $4,14 \pm 0,08$ клітин, тобто в 1,3 та 2,4 рази перевищувала аналогічний показник попереднього терміну дослідження та тварин I групи відповідно. Вони виявлялись у вигляді скупчень із 3-4 клітин поруч із ендотеліоцитами, які зазнавали пошкоджень, та контактували з ними за допомогою своїх відростків. Одночасно спостерігалась тенденція до зменшення на 8,7 % кількості 2 типу ДК, порівняно з попереднім етапом експерименту, що на нашу думку, пов'язано, з їх переходом на більш високий рівень диференціювання.

В стінці артерій дрібного калібру II групи тварин також реєструвався 3 тип ДК, але їх кількість була у 1,4 рази нижчою ($2,33 \pm 0,06$, $p < 0,05$), порівняно зі стінкою артерій середнього калібру. Вони дифузно розповсюджувались в підендотеліальному просторі інтими і не утворювали контактів з іншими клітинами. Спостерігалась зміна дендритними клітинами 2 типу своєї повздовжньої орієнтації на перпендикулярну по відношенню до вісі артерій. Розташовувались вони поруч із ендотеліоцитами, які за рахунок випинання своїх ядер в просвіт судини набували вигляду частоколу. Слід зазначити, що стінка артерій I групи тварин у цей період не мала ознак зростання кількості ДК.

На 16-му тижні експерименту в II групі тварин 3 тип ДК змінював свою типову локалізацію в підендотеліальному шарі інтими і виявлявся поруч із внутрішньою еластичною мембраною, яка мала переривчастий контур, та в медії вінцевої артерії середнього калібру. Ймовірно, такі зміни стають можливими за рахунок продукції клітинами, залуче-

ними в патологічний процес, матриксних металопротеїназ, які розщеплюючи компоненти екстрацелюлярного матриксу полегшують міграцію ДК [9]. Посилення міграційної активності відображалось в одночасному зростанні кількості 1 та 2 типу ДК ($5,26 \pm 0,14$ та $3,41 \pm 0,07$ відповідно, $p < 0,05$), в той час як вміст 3 типу ДК залишався на попередньому рівні. Водночас зміни кількісних показників ДК в стінці артерій дрібного калібру носили менш виражений характер: кількість 1 та 2 типу ДК сягала $4,65 \pm 0,08$ та $2,74 \pm 0,15$ клітин відповідно, $p < 0,05$. В I групі тварин на даному етапі дослідження не виявлено порушень клітинного складу стінки вінцевої артерії.

Характерною особливістю 18-го тижня експерименту була поява в стінці вінцевої артерії 4 типу ДК. Вони реєструвались як у внутрішній, так і середній оболонці досліджуваних судин, особливо поруч з лімфоцитами та макрофагами, контактуючи з ними та між собою за допомогою відростків. Їх кількість в артеріях середнього калібру становила $2,79 \pm 0,05$ клітин, в артеріях дрібного калібру – $1,92 \pm 0,03$ клітин ($p < 0,05$). Спираючись на дані літератури, цей тип клітин з відповідною морфологічною будовою та вираженою (+++) експресією маркерів S-100 та CD1a, що свідчить про значне накопичення антигенної інформації, відносився до більш зрілої популяції ДК, функція яких – здійснювати антигенпрезентацію [7]. Вміст інших типів ДК в стінці вінцевої артерії середнього та дрібного калібру у цей термін дослідження залишався на попередньому рівні. Стінка артерій I групи тварин на 18-му тижні спостереження не зазнавала змін кількості ДК.

Висновки

1. В стінці інтактних вінцевої артерії виявлявся 1 та 2 тип дендритних клітин, в той час, як в стінці уражених атеросклерозом артерій з'являвся 3 та 4 тип ДК.
2. Кількість дендритних клітин переважала в стінці вінцевої артерії середнього калібру, тоді як в артеріях дрібного калібру дендритних клітин достовірно менша кількість.
3. Вперше поява 3 типу ДК спостерігалась на 12-му тижні експерименту, що відповідає стадії ліпоїдозу. Поява 4 типу ДК припадала на 18-й тиждень експерименту і співпадала зі стадією ліпосклерозу.
4. По мірі прогресування атеросклеротичних ушкоджень дендритні клітини зазнавали змін в морфологічній будові, топографії та рівнях експресії S-100 та CD1a.
5. Кількісна динаміка ДК протягом експерименту мала лінійний характер, збільшуючись від $3,89 \pm 0,07$ клітин на 4-му тижні до $14,72 \pm 0,31$ клітин на 18-му тижні.

Перспективи подальших досліджень. Планується дослідити активність ММП-2 та ММП-9 в плазмі крові та гомогенаті міокарда щурів з метою уточнення їх впливу на міграційну активність дендритних клітин.

References

1. Markelova EV, Zdor VV, Romanchuk AL, Birko ON. Matriksnye metalloproteinazi i ih vzaimosvjaz' s sistemoy citokinov, diagnosticheskij i prognosticheskij potencial. *Immunopatologija, Allergologija, Infektologija*. 2016; 2: 11-22. [Russian]
2. Men'shykov YV, Fomyina KV, Beduleva LV. Eksperimental'naja model' ateroskleroza u krysa, vyzvannogo umnyzacej natyvnymy lypoproteynamy cheloveka. *Vestnyk Udmurtskogo unyversyteta*. 2012; 1: 80-6. [Russian]
3. Talaev VJu, Plehanova MV. Issledovanie migracii dendritnyh kletok i trafika antigenov v celjah sovershenstvovanija immunoprofilaktiki. *MediAl'*. 2014; 2(12): 154-71. [Russian]
4. Bobryshev YV, Nikiforov NG, Elizova NV, Orekhov AN. Macrophages and their contribution to the development of atherosclerosis. *Results Probl Cell Differ*. 2017; 62: 273-98. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54090-0_11
5. Cybulsky MI, Cheong C, Robbins CS. Macrophages and dendritic cells: partners in atherogenesis. *Circ Res*. 2016; 118(4): 637-52. PMID: 26892963. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306542
6. Gil-Pulido J, Zernecke A. Antigen-presenting dendritic cells in atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2017; 816: 25-31. PMID: 28822856. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.08.016
7. Nahrendorf M. Myeloid cell contributions to cardiovascular health and disease. *Nat Med*. 2018; 24(6): 711-20. PMID: 29867229. DOI: 10.1038/s41591-018-0064-0
8. Rahman MS, Woollard K. Atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 1003: 121-44. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8_7
9. Ruddy JM, Ikonomidis JS, Jones JA. Multidimensional contribution of matrix metalloproteinases to atherosclerotic plaque vulnerability: multiple mechanisms of inhibition to promote stability. *J Vasc Res*. 2016; 53: 1-16. <https://doi.org/10.1159/000446703>
10. Subramanian M, Tabas I. Dendritic cells in atherosclerosis. *Semin Immunopathol*. 2014; 36(1): 93-102. PMID: 24196454. PMCID: PMC3946524. DOI: 10.1007/s00281-013-0400-x

УДК 616.13.002.2-004.6-092.9:616-097

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТЕНКИ ВЕНЕЧНЫХ АРТЕРИЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Трясак Н. С.

Резюме. Были исследованы морфологические особенности различных типов дендритных клеток стенки венечных артерий в условиях экспериментального атеросклероза. Животным вводили нативные липопротеины низкой плотности человека. Дендритные клетки (ДК) идентифицировали с помощью поликлональных антител S-100 и моноклональных антител CD1α. Для определения интенсивности экспрессии иммуногистохимических маркеров использовали полуколичественную шкалу от 0 до 3 баллов. Гистологическую окраску стенки венечных артерий проводили гематоксилином и эозином. Стенки интактных венечных артерий содержали 1 и 2 тип ДК. В венечных артериях пораженных атеросклерозом наблюдали 3 и 4 тип ДК. Впервые появление 3 типа ДК отмечали на 12-й неделе эксперимента, что соответствовало стадии липоидоза. Появление 4 типа ДК отмечалось на 18-й неделе эксперимента и совпадало со стадией липосклероза. По мере прогрессирования атеросклеротического процесса дендритные клетки претерпевали изменений в морфологической структуре, топографии и уровнях экспрессии S-100 та CD1α. Количественная динамика дендритных клеток в течение эксперимента имела линейный характер, увеличиваясь от 3,89±0,07 клеток на 4-й неделе до 14,72±0,31 клеток на 18-й неделе.

Ключевые слова: атеросклероз, дендритные клетки, венечные артерии, S-100, CD1α.

UDC 616.13.002.2-004.6-092.9:616-097

Immunohistochemical Characteristics of the Wall of Coronary Arteries in Experimental Atherosclerosis

Trysak N. S.

Abstract. Atherosclerosis is a chronic progressive disease of the arteries of the elastic and muscular-elastic type, which includes the features of the inflammatory process and lipid metabolism disorders. One of the major cells taking part in the development of the atherosclerotic process are dendritic cells, the main function of which is the recognition and presentation of antigens to T-lymphocytes. There are several subpopulations of dendritic cells, depending on the degree of maturity.

The purpose of the study was to establish the morphological features of dendritic cells of the coronary arteries wall at different stages of the experimental atherosclerosis.

Material and methods. The research was conducted at 120 nonlinear rats of both sexes weighing 180–210 g on average. Animals were divided into 2 groups: I – control group (n = 40), who were administered by 0.1 ml of Freund's incomplete adjuvant intracutaneously, and II – the experimental group (n = 80), that were immunized

human native low density lipoproteins (ProSpec, USA) at a dose of 200 µg intracutaneously with addition of 0.1 ml of Freund's incomplete adjuvant (Becton Dickinson, USA). Dendritic cells were detected by using polyclonal antibodies S-100 and monoclonal antibodies CD1α. A semiquantitative scale from 0 to 3 points was used to determine the intensity of expression of immunohistochemical markers. Histological examination of coronary arteries wall was performed by hematoxylin and eosin.

Results and discussion. It was found out that the dendritic cells of types 1 and 2 were identified in the wall of intact coronary arteries, while dendritic cells of types 3 and 4 were detected in the wall of coronary arteries with atherosclerotic damages. The number of dendritic cells in the wall of the coronary arteries of the medium caliber was greater than in the coronary arteries of small caliber. For the first time, the appearance of dendritic cells of type 3 was observed on the 12th week of the experiment, which corresponded to the stage of lipoidosis. The appearance of dendritic cells of type 4 occurred on the 18th week of the experiment and associated with the stage of liposclerosis.

Conclusion. Dendritic cells changed their own morphological structure, topography and levels of expression of immunohistochemical markers S-100 and CD1α at different stages of the atherosclerotic process. The quantitative dynamics of the dendritic cells during the experiment was linear, increasing from 3.89 ± 0.07 cells in the 4th week to 14.72 ± 0.31 cells in the 18th week.

Keywords: atherosclerosis, dendritic cells, coronary arteries, S-100, CD1α.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 14.08.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування