

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616.13.002.2-004.6

Богданов Л.А., Великанова Е.А., Шишкова Д.К., Шабаетв А.Р., Кутихин А.Г.

Ремоделирование неоинтимы при каротидном атеросклерозе: влияние матриксных металлопротеиназ-2 и -9 и сосудистых гладкомышечных клеток различного фенотипа

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», 650002, Кемерово, Россия, Сосновый бульвар, д. 6

Цель исследования – изучение распространенности и локализации сосудистых гладкомышечных клеток (СГМК) различного фенотипа в составе атеросклеротических бляшек сонной артерии, а также взаимосвязи различных клеточных популяций неоинтимы с экспрессией матриксных металлопротеиназ (ММП)-2 и ММП-9 в зависимости от степени стабильности бляшки.

Методы. Проведено иммуногистохимическое исследование 16 атеросклеротических бляшек (8 клинически нестабильных и 8 стабильных), полученных при каротидной эндартерэктомии в связи с гемодинамически значимым стенозом. Оценка сократительной способности СГМК проводилась при использовании метода иммуногистохимического типирования альфа-актина гладких мышц (α -SMA), синтетического, макрофагального и остеогенного фенотипов СГМК посредством типирования виментина, CB68 и RUNX2 соответственно. Активность ремоделирования определялась посредством выявления ММП-2 и ММП-9.

Результаты. Показано, что около трети каротидных бляшек характеризовались высокой экспрессией ММП-9 CD68-положительными клетками, что не коррелировало с их нестабильностью. Локализация, содержание и соотношение СГМК различного фенотипа и макрофагов значительно варьировали в зависимости от бляшки. Общей закономерностью было преимущественное послойное типирование на α -SMA в зоне интактных эластических волокон меди и, реже, в фиброзной крышке или прилегающих участках. CD68-положительные клетки визуализировались в толще неоинтимы; некоторая их доля была колокализована с α -SMA, отражая СГМК макрофагального фенотипа. Положительное отношение к виментину наблюдалось на границе с эластическими волокнами меди, либо с основной клеточной массой неоинтимы и характеризовалась прилегающим бесклеточным экстрацеллюлярным матриксом, что свидетельствовало об активном синтезе его соответствующими клетками. Также в неоинтиме обнаруживались клетки положительные как на RUNX2 и α -SMA, так и исключительно RUNX2-положительные клетки.

Заключение. Каротидные атеросклеротические бляшки характеризуются различной локализацией, содержанием и соотношением СГМК сократительного, синтетического, макрофагального и остеогенного фенотипов, при этом экспрессия ММП-2 и ММП-9 была ограничена CD68-положительными макрофагами и СГМК макрофагального фенотипа.

Ключевые слова: каротидный атеросклероз; сосудистое ремоделирование; гладкомышечные клетки; матриксные металлопротеиназы; ММП-2; ММП-9; CD68; RUNX2

Для цитирования: Богданов Л.А., Великанова Е.А., Шишкова Д.К., Шабаетв А.Р., Кутихин А.Г. Ремоделирование неоинтимы при каротидном атеросклерозе: влияние матриксных металлопротеиназ-2 и -9 и сосудистых гладкомышечных клеток различного фенотипа. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 20-30.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.20-30

Для корреспонденции: Богданов Лев Александрович, e-mail: bogdanovleone@gmail.com

Участие авторов: Кутихин А.Г. – концепция и дизайн исследования; статистическая обработка материала, написание текста; Богданов Л.А. – сбор и обработка материала, статистическая обработка материала; подготовка иллюстративного материала; Шабаетв А.Р. – сбор и обработка материала; Великанова Е.А. – подготовка иллюстративного материала; Шишкова Д.К. – редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.02.2020

Принята к печати 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Bogdanov L.A., Velikanova E.A., Shishkova D.K., Shabaev A.R., Kutikhin A.G.

Neointimal remodeling in carotid atherosclerosis: roles of matrix metalloproteinases-2 and -9 and different phenotypes of vascular smooth muscle cells

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,
Sosnovy Blvd. 6, Kemerovo 650002

Aim. To study prevalence and localization of different phenotypes of vascular smooth muscle cells (VSMCs) in carotid atherosclerotic plaques and to examine expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in relation to different cell populations within the neointima.

Methods. The immunohistochemical examination was performed on 16 atherosclerotic plaques (8 unstable and 8 stable) excised during carotid endarterectomy for critical stenosis. VSMCs of contractile, synthetic, macrophagic, and osteogenic phenotypes were identified by staining for α -smooth muscle actin (α -SMA), vimentin, CD68, and RUNX2, respectively. Activity of neointimal remodeling was assessed by staining for MMP-2 and MMP-9.

Results. Approximately one-third of atherosclerotic plaques was positively stained for MMP-9 exclusively expressed in CD68-positive cells, which however, did not correlate with plaque ruptures. Localization, content, and ratio of different VSMC phenotypes significantly varied in different plaques. Positive α -SMA staining was found mainly in the intact media and fibrous cap. In contrast, both CD68-positive and CD68/ α -SMA double-positive cells were detected within the neointima but not in the media. Vimentin was expressed in the neointima between the medial layers and fibrous cap near the acellular extracellular matrix suggesting its active production by mesenchymal cells. Both RUNX2- and RUNX2 α -SMA double-positive cells indicative of VSMC osteogenic differentiation were also observed in the neointima. **Conclusion.** Carotid atherosclerotic plaques contained VSMCs of all phenotypes, which were differentially localized within the neointima; however, the MMP-2 and MMP-9 expression was restricted to CD68-positive macrophages and CD68/ α -SMA-positive VSMCs of the macrophagal phenotype.

Keywords: carotid atherosclerosis; vascular remodeling; smooth muscle cells; matrix metalloproteinases; MMP-2; MMP-9; CD68; RUNX2

For citation: Bogdanov L.A., Velikanova E.A., Shishkova D.K., Shabaev A.R., Kutikhin A.G. Neointimal remodeling in carotid atherosclerosis: roles of matrix metalloproteinases-2 and -9 and different phenotypes of vascular smooth muscle cells. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'nyaya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 20-30. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.20-30

For corresponding: Leo A. Bogdanov, Junior Researcher, Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental and Clinical Cardiology, e-mail: bogdanovleo@gmail.com

Contribution: research concept and design, statistical processing of the material, writing text – Kutikhin A.G.; material collecting and processing, statistical processing of the material; preparation of illustrative material – Bogdanov L.A.; material collecting and processing – Shabaev A.R.; preparation of illustrative material – Velikanova E.A.; text editin – Shishkova D.K.

Acknowledgment. The study was supported by a complex basic research program of the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, as a part of a basic research project of the Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases #0546-2019-0002 "Pathogenetic Justification of the Development of Implants for Cardiovascular Surgery Based on Biocompatible Materials Using a Patient-Oriented Approach with Mathematical Modeling, Tissue Engineering and Genomic Predictors."

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Information about the authors:

Bogdanov L.A., <https://orcid.org/0000-0003-4124-2316>

Shishkova D.K., <http://orcid.org/0000-0002-1518-3888>

Kutikhin A.G., <http://orcid.org/0000-0001-8679-4857>

Received 02.02.2020

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

Введение

Ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) представляет собой универсальный физиологический процесс, в норме поддерживающий гомеостаз в различных органах и тканях посредством адаптации внеклеточного микроокружения к механическим и биологическим воздействиям [1]. Динамически

изменяющийся ЭЦМ, в свою очередь, аналогичным образом воздействует на клетки, регулируя как механически опосредованную передачу сигнала (механотрансдукцию), так и запуская или ингибируя различные внутриклеточные сигнальные пути при помощи специфических лигандов [2, 3].

Динамика и структура ремоделирования ЭЦМ определяются соотношением активности и вариантами течения двух противоположных процессов – депонирования и деградации ЭЦМ [4]. Депонирование ЭЦМ происходит в результате синтеза его компонентов (коллагенов, гликопротеинов, протеогликанов, регуляторов, секретируемых факторов и непосредственно связанных с ЭЦМ молекул) синтетически активными клетками, в то время как деградация ЭЦМ осуществляется в основном за счет протеолиза вследствие действия матриксных металлопротеиназ (ММП), дезинтегринов-металлопротеаз (ADAMs и ADAMTS), катепсинов, гепараназы и других [4]. Из представленных типов регуляторов ЭЦМ наиболее обильно и универсально секретируемыми различными типами клеток являются матриксные металлопротеиназы (ММП) [5-9]. В норме регулируя физиологические изменения ЭЦМ, ММП в незначительном количестве присутствуют и в здоровых тканях [7, 9], однако при развитии ряда связанных с воспалением патологических процессов секреция ММП клетками мезенхимального ряда и иммунокомпетентными клетками значительно повышается, что вызывает соответствующее ремоделирование ЭЦМ [4, 5-8].

Из всех ММП в изучении атеросклероза наибольший интерес представляют ММП-2 и ММП-9 (желатиназы А и В), поскольку они секретируются гладкими миоцитами меди сосудов или сосудистыми гладкомышечными клетками (СГМК) и макрофагами, а их специфичными субстратами являются компоненты базальной мембраны сосудов (коллаген IV типа и ламинин) и основной белок эластических волокон средней оболочки сосудов (меди) эластин [5, 9].

Принято считать, что ММП-2 и ММП-9 секретируется в большом количестве как макрофагами, так и сосудистые гладкомышечные клетки (СГМК) [6, 10-12], однако распространенная в атеросклеротических бляшках трансдифференцировка СГМК с приобретением ими синтетического, макрофагального и остеогенного фенотипа [10–12] существенно затрудняет точную идентификацию ответственных за синтез ММП-2 и ММП-9 клеточных популяций. В то же время можно предположить, что локализация и роль различных популяций неоинтимальных СГМК в ремоделировании ЭЦМ будет значительно различаться.

Целью данной работы является исследование распространенности и локализации различных фенотипов СГМК в составе атеросклеротических бляшек из сонной артерии, а также связь различных клеточных популяций неоинтимы с секрецией ММП-2 и ММП-9 в клинически нестабильных вызвавших

острое нарушение мозгового кровообращения и стабильных бляшках.

Методика

В качестве объектов исследования были выбраны 16 атеросклеротических бляшек, удаленных во время каротидной эндартерэктомии по причине гемодинамически значимого стеноза сонной артерии, который в половине случаев (8 бляшек) приводил к острому нарушению мозгового кровообращения (ОНМК). Таким образом, атеросклеротические бляшки были клинически разделены на нестабильные (вызвавшие ОНМК вследствие своего разрыва) и стабильные (обуславливающие хроническую ишемию головного мозга, но не ставшие причиной ОНМК). Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ. До включения в исследование от всех пациентов было получено письменное информированное согласие.

После выполнения оперативного вмешательства бляшки, помещенные в пластмассовый контейнер с 0,9% раствором хлорида натрия, на льду доставляли в лабораторию и моментально замораживали в металлической цилиндрической форме в криосреде Tissue-Tek (каталожный номер 4583, Sakura) при помощи погружения металлической формы в сосуд Дьюара с жидким азотом. Такая методика позволяла обеспечить лучшую сохранность ткани, препятствуя кристаллизации при ее заморозке. Замороженные атеросклеротические бляшки хранили в морозильной камере при температуре -140 °С. Производили серийную резку образцов на криотоме (Microm HM 525, Thermo Scientific), помещая на стекло 8 срезов толщиной 5 мкм, толщина отсекаемого материала между серийными срезами составляла 400 мкм.

На первом этапе для оценки общей микроструктуры атеросклеротической бляшки производили окрашивание гематоксилин-эозином, для этого использовали гематоксилин Джилла (БиоВитрум, Россия) и водно-спиртовой концентрированный эозин, разбавленный в 25% этиловом спирте (БиоВитрум, Россия).

Фиксацию криозамороженных образцов после их резки для иммунотипирования проводили в течение 10 мин 4% параформальдегидом при использовании внутриклеточных маркеров, и ацетоном для поверхностных маркеров, с последующей трехкратной отмывкой (5 мин) в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) на шейкере (Polymax 1040, Heidolph, 25 об/мин) при комнатной температуре.

Иммуногистохимическую реакцию выполняли с использованием набора Novolink Polymer Detection

Systems Novocastra (RE7150-CE, Leica Biosystems) согласно модифицированному протоколу производителя. После блокировки эндогенной пероксидазы 4% раствором пероксида водорода (Peroxidase Block) срезы дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере, производили блокировку неспецифического связывания антител 0,4% соевым раствором казеина со вспомогательными реагентами (Protein Block) в течение 1 ч. Отмывки после этой стадии перед обработкой срезов первичными антителами не выполняли. В качестве первичных антител использовали антитела Abcam к маркерам: эндопептидаз ЭЦМ ММП-2 (ab92536, 1:1000) и ММП-9 (ab38898, 1:1000); фенотипа остеогенной дифференцировки – RUNX2 (ab76956, 1:500); клеток мезенхимального ряда и синтетического фенотипа СГМК – виментин (ab16700, 1:1000); макрофагов CD68 (ab955 мышшиное и ab125212 кроличье). Антитела разводили согласно протоколу производителя в 1% соевом растворе бычьего сывороточного альбумина. Инкубация с первичными антителами производилась в течение ночи в накрытом влажном коробе при температуре +4 °С. На следующий день срезы трижды отмывали в фосфатно-солевом буфере и инкубировали с вторичными антителами против кролика (Novolink Polymer) в течение 30 мин. В случае с первичным антителом мыши (ab955) перед добавлением антител против кролика добавляли вторичное антитело кролика против мыши (Post Primary) и также инкубировали в течение 30 мин с последующей трехкратной отмывкой в фосфатно-солевом буфере. На каждом стекле выделяли по одному срезу с отрицательным контролем первичного и вторичного антител.

После трехкратной отмывки фосфатно-солевым буфером 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 Джилла (БиоВитрум) на 10 мин. После подсинения срезов в проточной воде их обезвоживали в трех сменах 95% этанола (5 мин каждая), просветляли в 3 сменах ксилола (5 мин каждая), и заключали под покровное стекло (Витрогель, БиоВитрум). 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 x200.

Для иммунофлуоресцентной реакции вышеуказанных 5 бляшек применяли следующие первичные кроличьи и мышшиные антитела компании Abcam, разведенные в 1% соевом растворе бычьего сывороточного альбумина: α -SMA (ab5694, 1:100) в сочетании с CD68

(ab955, 1:100), RUNX2 (ab76956, 1:100) или липофильным красителем Нильским красным (Nile Red, 1 мкг/мл), α -SMA (ab7817, 1:200) в сочетании с виментином (ab16700, 1:1000), а также CD68 (ab955, 1:100) в сочетании с липофильным красителем Нильским красным (Nile Red, 1 мкг/мл). Типирование первичными антителами проводилось после фиксации тканей в ацетоне (10 мин), трехкратной отмывки в фосфатно-солевом буфере и блокирования неспецифического связывания 1% соевым раствором бычьего сывороточного альбумина (1 ч), продолжительность инкубации составляла 16 ч. Все указанные клеточные антигены после трехкратной отмывки в фосфатно-солевом буфере визуализировались при помощи меченных флюорофорами Alexa Fluor (488 и 555) вторичных антител козла против кролика (ab150077 или ab150078) и мыши (ab150113 или ab150114), разведенных в 1% соевом растворе бычьего сывороточного альбумина в соотношении 1:500 (инкубация в течение 1 ч при комнатной температуре). Для заключения использовалась среда ProLong Gold Antifade (Invitrogen). Готовые микропрепараты анализировали при помощи конфокального микроскопа (LSM 700, Carl Zeiss), ув. 200.

Подсчет доли положительных клеток на снимках проводился в программе ImageJ (National Institutes of Health) по следующему алгоритму: 1) разбиение изображения по каналам (Image -> Color -> Split Channels); 2) бинаризация изображения по каналу интереса (Image – Adjust – Threshold); 3) подсчет общего количества клеток по числу ядер на синем канале (Analyze -> Analyze Particles (size from 50 to infinity)); 4) подсчет соотношения положительно окрашенных клеток (по ко-локализации ядер клеток на синем канале с окрашиванием на красном или зеленом канале в зависимости от антитела) к общему количеству клеток (ядра, синий канал).

Результаты и обсуждение

Иммуногистохимическое типирование показало наличие различных клеточных популяций, гетерогенно локализованных в составе атеросклеротической бляшки (рис. 1, а). В бляшках присутствовали как богатые клетками участки, так и обширные зоны, заполненные лишенным клеток массивом ЭЦМ (рис. 1, б). Наибольшую концентрацию клеток наблюдали в зоне, прилегающей к фиброзной покрывке (рис. 1, б). В некоторых бляшках визуализировались пустоты неправильной формы, образовавшиеся в результате выпадения кальция при ИГХ реакции (рис. 1, в). Вокруг этих полостей располагался как бесклеточный ЭЦМ, так и скопления клеток (рис. 1, б).

На первоначальном этапе развития атеросклероза после его запуска при нарушении целостности эндотелия и/или воспаления в адвентиции основной клеточной популяцией, вносящей вклад в формирование неointимы, являются α -SMA-положительные СГМК [10–12]. Положительно окрашенные на α -SMA клетки были визуализированы во всех атеросклеро-

тических бляшках, они располагались послойно между эластическими волокнами интактной, эксплантированной при эндартерэктомии вместе с неointимой меди (рис. 2, а), либо обнаруживались в виде скоплений в фиброзной покрывке или вблизи нее (рис. 2, б). Визуализация α -SMA было ассоциировано с клетками и располагалось вокруг ядер либо диф-

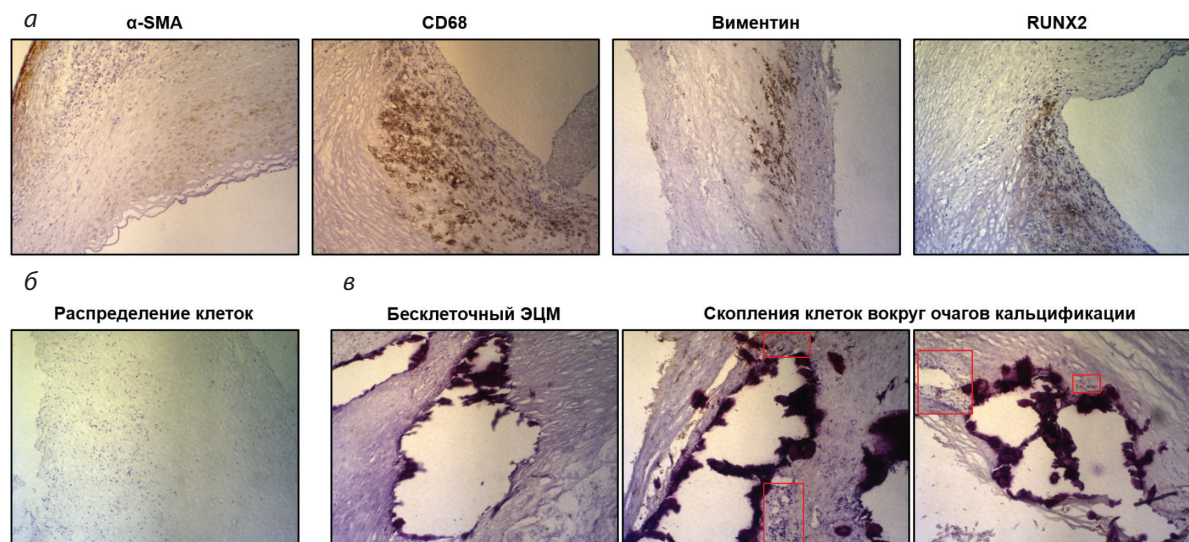


Рис. 1. Атеросклеротическая бляшка из сонной артерии. Иммуногистохимическое типирование клеточных популяций с окрашиванием ядер гематоксилином Джилла. Ув. 200.

а – различные клеточные популяции (α -SMA-положительные клетки с сократительным фенотипом, CD68-положительные клетки с макрофагальным фенотипом, виментин-положительные клетки с синтетическим фенотипом, RUNX2-положительные клетки с остеогенным фенотипом) в составе атеросклеротической бляшки; б – участки богатые клеточными популяциями и полностью лишенные их; в – пустоты, образовавшиеся вследствие выпадения кальция при резке тканей и типировании.

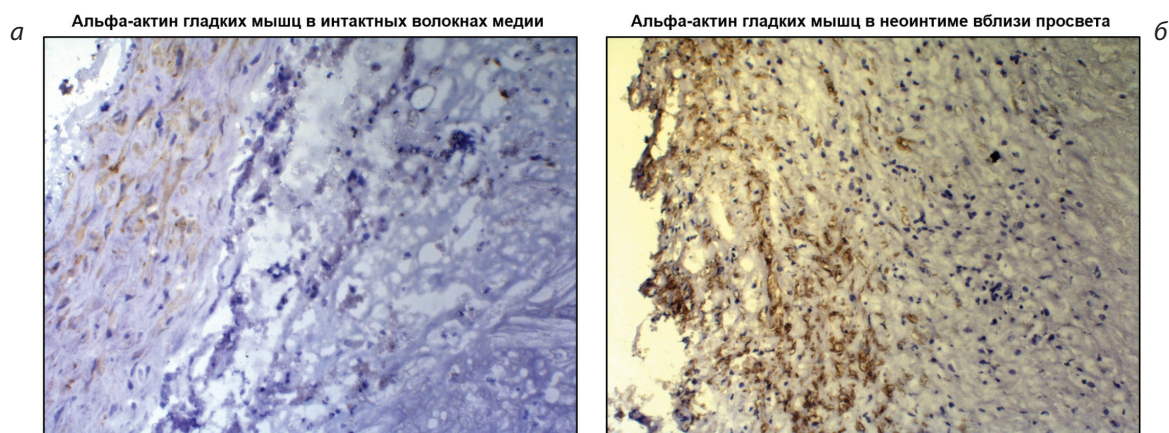


Рис. 2. Атеросклеротическая бляшка из сонной артерии. Иммуногистохимическое типирование антителами к маркеру сократительного фенотипа α -SMA, с контрастированием ядер гематоксилином Джилла. Ув. 200.

а – α -SMA-положительные клетки в составе интактных эластических волокон меди; б – α -SMA-положительные клетки в составе фиброзной покрывки.

фузно по всей клетке, что отражало его специфичность (рис. 2, а, б).

В составе атеросклеротической бляшки СГМК постепенно меняют свой фенотип с сократительного на синтетический, что способствует синтезу ими образующих неоинтиму компонентов ЭЦМ и сопровождается постепенной утратой секреции α -SMA [10–12]. Кроме того, этот же процесс способствует и формированию фиброзной покрышки, которая сдерживает ядро из содержащих липиды пенистых клеток, внеклеточных липидов и образовавшегося вследствие массивной гибели клеток детрита [10–12]. Классическими маркерами синтетического фенотипа *in vitro* являются коллаген I типа, ММП-2 и ММП-9 [10–12], однако эти белки входят в состав ЭЦМ и при иммуногистохимическом типировании не ассоциированы с клетками напрямую; кроме того, ММП также секретируются и другими клеточными популяциями, в особенности макрофагами [6]. Поэтому в качестве маркера синтетического фенотипа СГМК был выбран виментин, секреция которого в целом характерна для всех клеток мезенхимального ряда, но усиливается в СГМК при смене их фенотипа на синтетический [13, 14]. Секреция виментина наблюдалась в клетках, локализованных на границе с эластическими волокнами меди (рис. 3, а), либо, напротив, ближе к основной клеточной массе в неоинтиме (рис. 3, б), что сочеталось с располагавшейся вблизи бесклеточной массой ЭЦМ и может отражать активный синтез ЭЦМ на различных стадиях развития атеросклероза мигрировавшими из меди СГМК.

Работы последних лет показывают, что в зависимости от преобладания того или иного стимула дифференцировки СГМК способны приобретать не только синтетический, но также и макрофагальный, остеохондрогенный и адипоцитарный фенотипы [10–12, 15]. С целью оценки данного феномена было выполнено иммуногистохимическое типирование маркера макрофагов сквенджер-рецептор CD68 и транскрипционный фактор остеогенной дифференцировки RUNX2.

На начальной стадии развития атеросклероза вследствие развития дисфункции и повреждения эндотелия моноциты мигрируют в неоинтиму, дифференцируются в макрофаги и поглощают задерживаемые вследствие связи с отрицательно заряженными протеогликанами ЭЦМ положительно заряженные апоВ-содержащие липопротеины [16, 17]. Мигрирующие в неоинтиму СГМК меди также контактируют с данными липопротеинами, поглощают их и оказываются вовлеченными в развитие провоспалительного микроокружения [18–20]. В то же время, в отличие от клеток миелоидного ряда, СГМК с прогрессированием атеросклеротического процесса теряют изначально более низкую способность к выбросу холестерина за счет снижения экспрессии мембранного транспортера ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1), гипосекретируют маркер сократительного фенотипа α -SMA и начинают секретировать маркер макрофагов CD68 [18–20]. Считается, что около 20–40% СГМК в составе неоинтимы характеризуются детектируемой экспрессией CD68 [18–20].

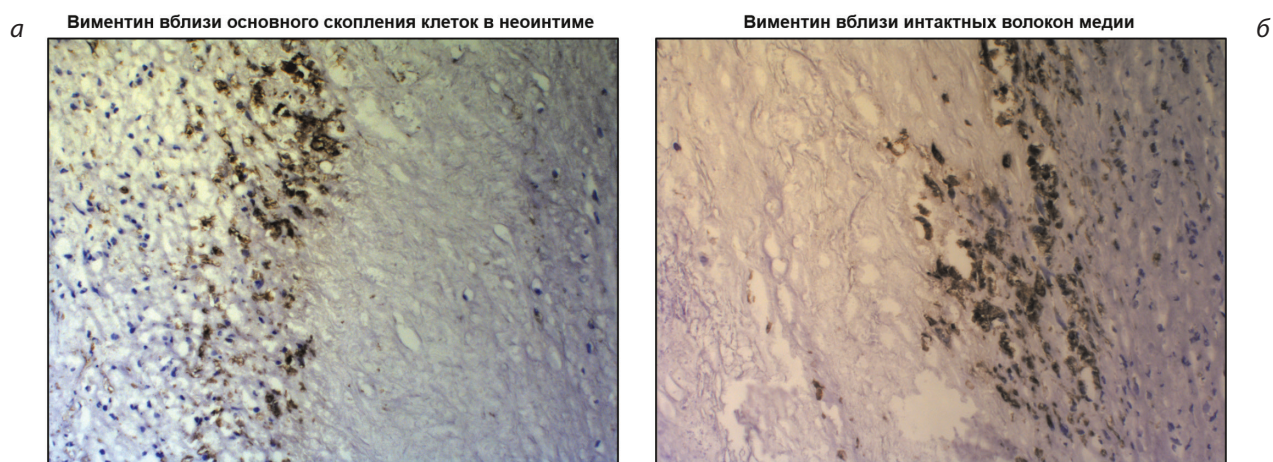


Рис. 3. Иммуногистохимическое типирование антителами к маркеру синтетического фенотипа виментину, с контрастированием ядер гематоксилином Джилла. Ув. 200.

а – секреция виментина в клетках, локализованных на границе с эластическими волокнами меди; б – секреция виментина в неоинтиме вблизи массивов бесклеточного экстрацеллюлярного матрикса.

CD68-положительные клетки наблюдали в толще атеросклеротической бляшки, в том числе вблизи фиброзной покрышки, но не между эластическими волокнами меди (рис. 4, а). Степень инфильтрации CD68-положительными клетками существенно варьировала между различными бляшками и относительно незначительно варьировала между различными срезами одной и той же бляшки по толщине (рис. 4, б). Как и в случае с α -SMA, положительное типирование на CD68 наблюдалось исключительно возле ядер клеток и, как правило, отмечалось вокруг ядра либо было распределено по всей клетке, но не было локализовано изолированно внутри ядра, что подтверждает его специфичность (рис. 4, а, б). Однако, поскольку разные маркеры макрофагального фенотипа обладают различной чувствительностью и специфичностью, в особенности на различных стадиях макрофагальной дифференцировки СГМК, более правильным представляется использование липофильного красителя Нильского

красного (Nile Red), при помощи которого непосредственно визуализируется поглощение липидов СГМК, что является основой, а не отражением их макрофагального фенотипа. При сочетанном типировании бляшек антителами к α -SMA либо CD68 и Нильским красным последний, как правило, локализуется в цитоплазме поглотивших липиды СГМК (рис. 4, в, г). При этом доля неинтимальных клеток, секретирующих α -SMA или CD68 и содержащих в цитоплазме Нильский красный, составила 22% для α -SMA и 17% для CD68, что согласуется с данными литературы и свидетельствует о том, что существенная часть пенстых клеток представляет собой не детерминированные макрофаги, а дифференцировавшиеся в макрофагальном направлении СГМК [18-20].

Сравнивая паттерны типирования бляшек антителами к α -SMA, CD68 и виментину, можно отметить их дифференциальное расположение в различных слоях патологически измененной ткани сосудов. Так,

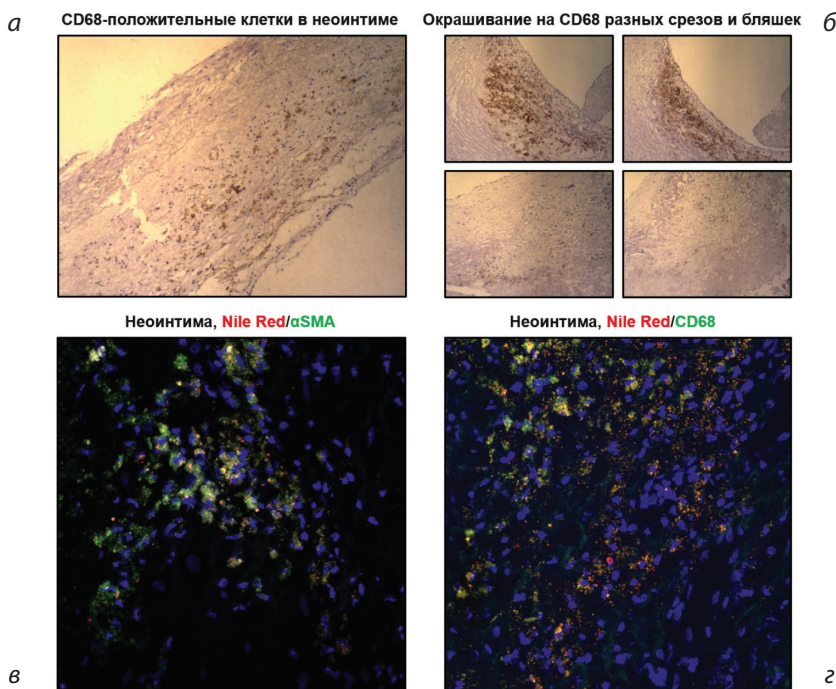


Рис. 4. Атеросклеротическая бляшка из сонной артерии. Иммунотипирование антителами к маркеру макрофагального фенотипа CD68 и маркеру сократительного фенотипа α -SMA. Ув. 200.

а – CD68-положительные клетки вблизи фиброзной покрышки, ядра контрастированы гематоксилином Джилла; б – разная степень инфильтрации CD68-положительными клетками в разных атеросклеротических бляшках, ядра контрастированы гематоксилином Джилла; в – сочетанное иммунофлуоресцентное типирование антителами к α -SMA (зеленый цвет) и липофильным красителем Нильским красным (Nile Red, красный цвет). Ядра контрастированы 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (синий цвет); г – сочетанное иммунофлуоресцентное типирование антителами к CD68 (зеленый цвет) и липофильным красителем Нильским красным (Nile Red, красный цвет). Ядра контрастированы 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (синий цвет).

α -SMA в большинстве своем была локализована в зоне фиброзной покрышки (рис. 5, а) и послойно в области меди (рис. 5, б). Визуализация CD68, напротив, была характерна для неоинтимы и практически полностью отсутствовала в меди (рис. 5, в). Положительная реакция на виментин в наибольшем количестве отмечалась в прилегающей к меди либо к фиброзной покрышке неоинтиме (рис. 5, г). Следует подчеркнуть, что в составе неоинтимы присутствовало около 5% клеток, положительных на α -SMA и CD68 (рис. 5, д), и около 9% клеток, положительных на α -SMA и виментин (рис. 5, е), что свидетельствует о наличии переходного фенотипа у ряда клеток неоинтимы.

Остеогенная дифференцировка СГМК, сопровождающаяся развитием очагов кальцификации, также характерна для некоторых атеросклеротических бляшек. В экспериментах на апоЕ- и LDLR-нокаутных мышах было показано, что 30-55% от всех клеток неоинтимы положительны на транскрипционный фактор остеогенной дифференцировки RUNX2, при этом 75-90% из этих клеток происходят из сосудистого глад-

комышечного дифферона [21, 22]. В данном исследовании количество RUNX2 позитивно окрашенных клеток, также существенно варьировала в зависимости от степени кальцификации бляшки, локализуясь в толще неоинтимы ближе к просвету, но не в фиброзной покрышке или интактной меди (рис. 6, а). В составе бляшек наблюдались как клеточные популяции, положительные на RUNX2 и на α -SMA (рис. 6, б), так и RUNX2-положительные клетки без признаков сократительного фенотипа (рис. 6, в).

ММП-9 наблюдалась в 5 бляшках из 16 проанализированных (31%), прямой связи секреции ММП-9 с нестабильностью бляшки, отражаемой вызываемой ОНМК, не наблюдалось (3/8 нестабильных бляшек и 2/8 стабильных). Следует отметить, что по данным литературы секреция как ММП-9, так и ММП-2 отмечается приблизительно в половине атеросклеротических бляшек сонных артерий, также без существенных различий в распространенности у пациентов с ОНМК и хронической ишемией головного мозга, не ставшей причиной ОНМК до каротидной эндартерэктомии [23].

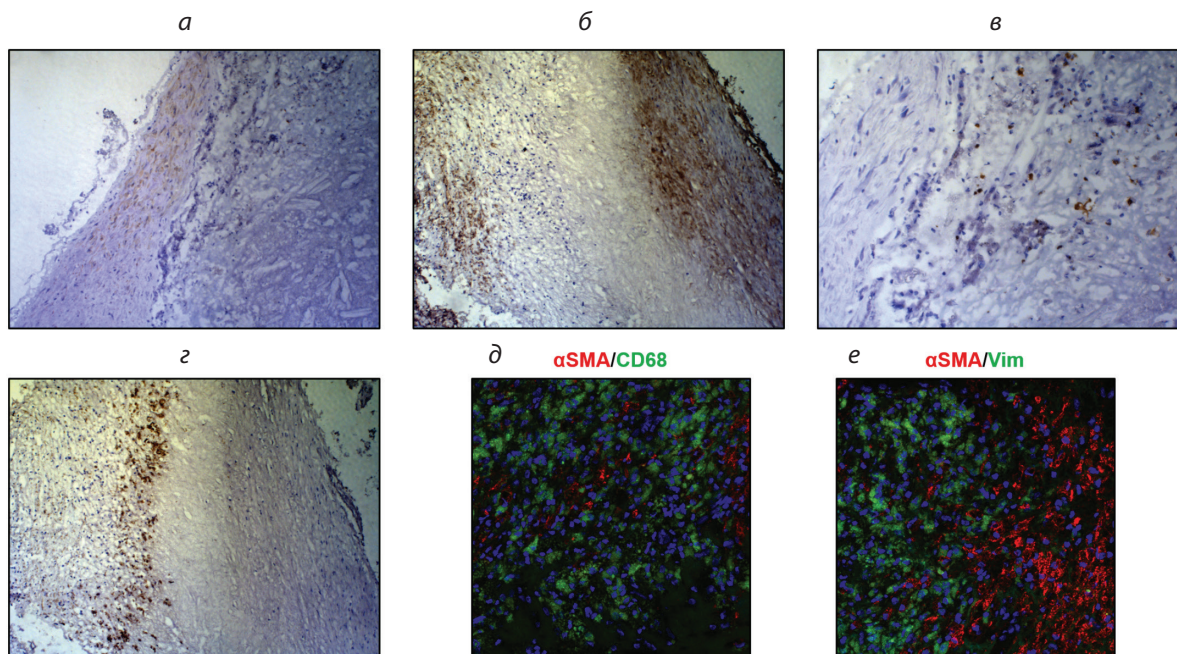


Рис. 5. Атеросклеротическая бляшка из сонной артерии. Сравнение паттернов типирования бляшек антителами к α -SMA, CD68 и VIM, с контрастированием ядер гематоксилином Джилла или DAPI. Ув. 200.

а – α -SMA-положительные клетки в зоне фиброзной покрышки; б – α -SMA-положительные клетки в области интактной меди; в – CD68 – положительные клетки в неоинтиме; г – виментин-положительные клетки в неоинтиме, прилегающей к фиброзной покрышке, и меди; д – клетки с переходным α -SMA⁺CD68⁺-фенотипом в составе неоинтимы (макрофагальная дифференцировка сосудистых гладкомышечных клеток); е – клетки с переходным α -SMA⁺виментин⁺-фенотипом в составе неоинтимы (синтетическая дифференцировка сосудистых гладкомышечных клеток).

Микроскопически, однако, визуализация ММП-2 и ММП-9 в таких бляшках колокализована с CD68-положительными клетками и ассоциирована с разрывом фиброзной покрышки [23]. В проведенном исследовании в ряде случаев наличие ММП-2 и ММП-9 было колокализовано с CD68-положительными клетками (рис. 7, а), однако это отмечалось далеко не всегда — приблизительно в половине полей зрения с большим количеством CD68-положительных клеток секреции указанных ММП не отмечалось (рис. 7, б). Колокализации ММП-2 и ММП-9 с α -SMA- или виментин-положительными клетками выявлено не было (рис. 7, в).

Результаты изучавших роль ММП-2 и ММП-9 в развитии атеросклероза работ оказались противоречивыми: с одной стороны, апоЕ- и ММП-2-нокаутные мыши характеризовались более медленным развитием атеросклероза [24], с другой стороны, богатые гладкомышечными клетками сегменты атеросклеротических

бляшек содержали большее количество ММП-2, что может свидетельствовать о стабилизирующей роли данной металлопротеиназы [25]. Аналогичное несоответствие результатов исследований было выявлено в отношении ММП-9: с одной стороны, апоЕ- и ММП-9-нокаутные мыши имели меньшее количество и объем атеросклеротических очагов с менее выраженными процессами инфильтрации макрофагами, депонирования коллагена и деградации эластических волокон [26], а высокая концентрация ММП-9 в атеросклеротических бляшках сонных артерий была ассоциирована с их нестабильностью, при этом ММП-9 в основном была локализована в области фиброзной покрышки и «плеч» бляшки [27]. В то же время в другой работе апоЕ- и ММП-9-нокаутные мыши, напротив, характеризовались большим объемом атеросклеротических бляшек и более высокой их нестабильностью, отражаемой количеством богатых гладкомышечными клетками глубоких фиброзных слоев [28].

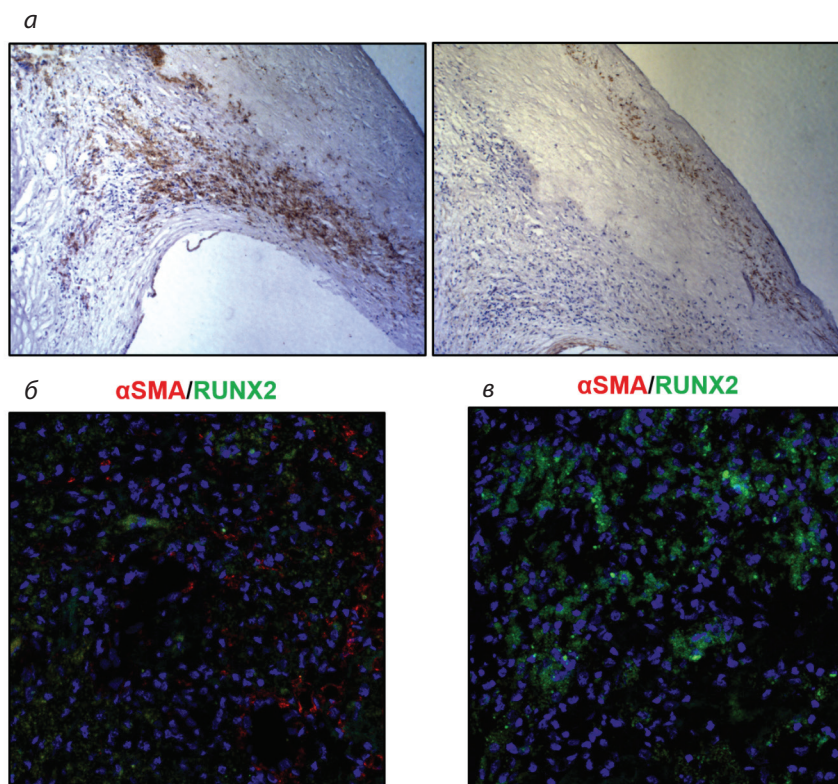


Рис. 6. Атеросклеротическая бляшка из сонной артерии. Иммунотипирование антителами к транскрипционному фактору остеогенной дифференцировки RUNX2. Ув. 200.

а – RUNX2 положительные клетки в толще неоинтимы; б – клетки с переходным α -SMA⁺RUNX2⁺-фенотипом в составе неоинтимы (остеогенная дифференцировка сосудистых гладкомышечных клеток); в – RUNX2-положительные клетки без признаков сократительного фенотипа.

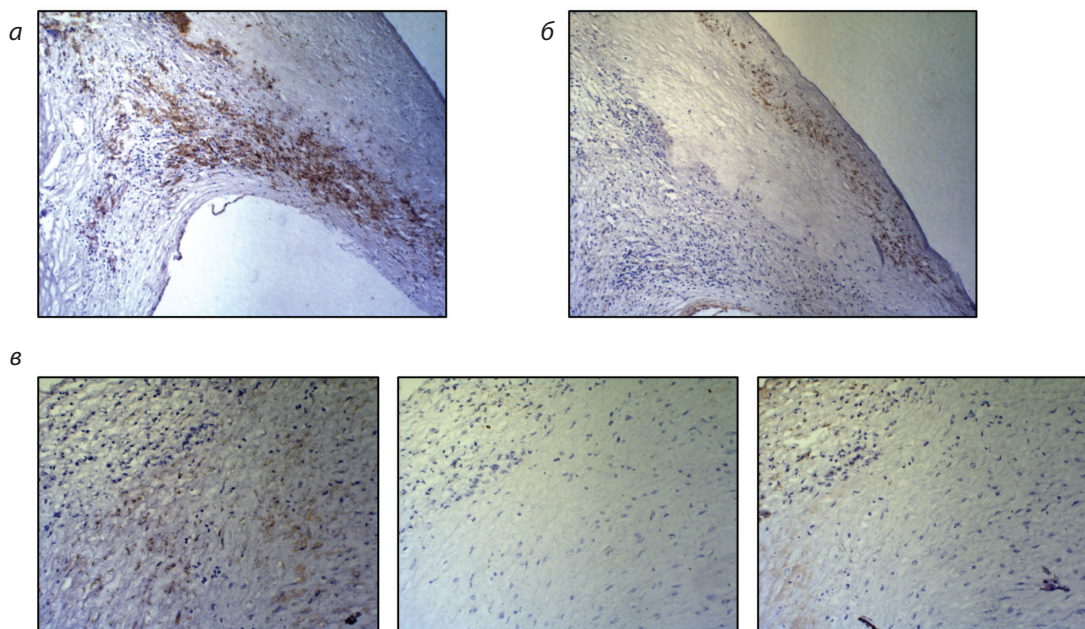


Рис. 7. Атеросклеротическая бляшка из сонной артерии. Иммуногистохимическая реакция на ММП-2 и ММП-9, с окрашиванием ядер гематоксилином Джилла. Ув. 200.

а – пример колокализации ММП-2 и ММП-9 с CD68- положительными клетками; *б* – ММП-2 и ММП-9, не колокализованные с CD68-положительными клетками; *в* – отсутствие колокализации ММП-2 и ММП-9 с α -SMA- или виментин-положительными клетками.

Заключение

Около трети каротидных атеросклеротических бляшек характеризуются повышенной секрецией эндопептидазами исключительно макрофагами, что отражает активно идущее ремоделирование неоинтимы. Несмотря на преимущественную локализацию СГМК сократительного фенотипа в интактной меди, а макрофагов – в зоне фиброзной покрышки, в неоинтиме детектируется определенное количество клеток, с двойным фенотипом сократительным и макрофагальным. Кроме того, существенная доля клеток в толще неоинтимы также имела двойной фенотип: сократительный и синтетический либо сократительный и остеогенный.

Литература/References

- Hoffmann G.A., Wong J.Y., Smith M.L. On Force and Form: Mechano-Biochemical Regulation of Extracellular Matrix. *Biochemistry*. 2019; 58(47): 4710-20. doi: 10.1021/acs.biochem.9b00219
- van Helvert S., Storm C., Friedl P. Mechanoreciprocity in cell migration. *Nat. Cell Biol.* 2018; 20(1): 8-20. doi: 10.1038/s41556-017-0012-0
- Kechagia J.Z., Ivaska J., Roca-Cusachs P. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019; 20(8): 457-73. doi: 10.1038/s41580-019-0134-2
- Yuzhalin A.E., Lim S.Y., Kutikhin A.G., Gordon-Weeks A.N. Dynamic matrixome: ECM remodeling factors licensing cancer progression and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*. 2018; 1870(2): 207-28. doi: 10.1016/j.bbcan.2018.09.002
- Ruddy J.M., Ikonomidis J.S., Jones J.A. Multidimensional Contribution of Matrix Metalloproteinases to Atherosclerotic Plaque Vulnerability: Multiple Mechanisms of Inhibition to Promote Stability. *J. Vasc. Res.* 2016; 53(1-2): 1-16. doi: 10.1159/000446703
- Johnson J.L. Metalloproteinases in atherosclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2017; 816: 93-106. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.09.007
- Loffek S., Schilling O., Franzke C.W. Series “matrix metalloproteinases in lung health and disease”: Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur. Respir. J.* 2011; 38(1): 191-208. doi: 10.1183/09031936.00146510.
- Page-McCaw A., Ewald A.J., Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8(3): 221-33. doi: 10.1038/nrm2125
- Nagase H., Visse R., Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 2006; 69(3): 562-73. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002
- Durham A.L., Speer M.Y., Scatena M., Giachelli C.M., Shanahan C.M. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc. Res.* 2018; 114(4): 590-600. doi: 10.1093/cvr/cvy010
- Allahverdian S., Chaabane C., Boukais K., Francis G.A., Bochaton-Piallat M.L. Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 2018; 114(4): 540-50. doi: 10.1093/cvr/cvy022
- Chistiakov D.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y.V. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol. (Oxf)*. 2015; 214(1): 33-50. doi: 10.1111/apha.12466

13. Beamish J.A., He P., Kottke-Marchant K., Marchant R.E. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2010; 16(5): 467-91. doi: 10.1089/ten.TEB.2009.0630
14. Salabei J.K., Hill B.G. Autophagic regulation of smooth muscle cell biology. *Redox Biol.* 2015; 4: 97-103. doi: 10.1016/j.redox.2014.12.007
15. Chaabane C., Coen M., Bochaton-Piallat M.L. Smooth muscle cell phenotypic switch: implications for foam cell formation. *Curr. Opin. Lipidol.* 2014; 25(5): 374-9. doi: 10.1097/MOL.0000000000000113
16. Skalen K., Gustafsson M., Rydberg E.K., Hulten L.M., Wiklund O., Innerarity T.L. et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature.* 2002; 417(6890): 750-4. doi: 10.1038/nature00804
17. Öörni K., Rajamäki K., Nguyen S.D., Lähdesmäki K., Plihtari R., Lee-Rueckert M. et al. Acidification of the intimal fluid: the perfect storm for atherogenesis. *J. Lipid Res.* 2015; 56(2): 203-14. doi: 10.1194/jlr.R050252
18. Allahverdian S., Chehroudi A.C., McManus B.M., Abraham T., Francis G.A. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation.* 2014; 129(15): 1551-9. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005015
19. Shankman L.S., Gomez D., Cherepanova O.A., Salmon M., Alencar G.F., Haskins R.M. et al. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat. Med.* 2015; 21(6): 628-37. doi: 10.1038/nm.3866
20. Pryma C.S., Ortega C., Dubland J.A., Francis G.A. Pathways of smooth muscle foam cell formation in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 2019; 30(2): 117-124. doi: 10.1097/MOL.0000000000000574
21. Naik V., Leaf E.M., Hu J.H., Yang H.Y., Nguyen N.B., Giachelli C.M. et al. Sources of cells that contribute to atherosclerotic intimal calcification: an in vivo genetic fate mapping study. *Cardiovasc. Res.* 2012; 94(3): 545-54. doi: 10.1093/cvr/cvs126
22. Nguyen N., Naik V., Speer M.Y. Diabetes mellitus accelerates cartilaginous metaplasia and calcification in atherosclerotic vessels of LDLr mutant mice. *Cardiovasc. Pathol.* 2013; 22(2): 167-75. doi: 10.1016/j.carpath.2012.06.007
23. Heo S.H., Cho C.H., Kim H.O., Jo Y.H., Yoon K.S., Lee J.H. et al. Plaque rupture is a determinant of vascular events in carotid artery atherosclerotic disease: involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9. *J. Clin. Neurol.* 2011; 7(2): 69-76. doi: 10.3988/jcn.2011.7.2.69
24. Kuzuya M., Nakamura K., Sasaki T., Cheng X.W., Itohara S., Iguuchi A. Effect of MMP-2 deficiency on atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26(5): 1120-5. doi: 10.1161/01.ATV.0000218496.60097.e0
25. Sluijter J.P., Pulskens W.P., Schoneveld A.H., Velema E., Strijder C.F., Moll F. et al. Matrix metalloproteinase 2 is associated with stable and matrix metalloproteinases 8 and 9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions: a study in human endarterectomy specimen pointing to a role for different extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation forms. *Stroke.* 2006; 37(1): 235-9. doi: 10.1161/01.STR.0000196986.50059.e0
26. Luttun A., Lutgens E., Manderveld A., Maris K., Collen D., Carmeliet P. et al. Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. *Circulation.* 2004; 109(11): 1408-14. doi: 10.1161/01.CIR.0000121728.14930.DE
27. Loftus I.M., Naylor A.R., Goodall S., Crowther M., Jones L., Bell P.R. et al. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke.* 2000; 31(1): 40-7. doi: 10.1161/01.STR.31.1.40
28. Johnson J.L., George S.J., Newby A.C., Jackson C.L. Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2005; 102(43): 15575-80. doi: 10.1073/pnas.0506201102

Сведения об авторах:

Богданов Лев Александрович, мл. науч. сотр. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза, отдел экспериментальной медицины НИИ КПССЗ, e-mail: bogdanovleone@gmail.com;

Великанова Елена Анатольевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины НИИ КПССЗ, e-mail: veliea@kemcardio.ru;

Шшикова Дарья Кирилловна, мл. науч. сотр. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза, отдел экспериментальной медицины НИИ КПССЗ, e-mail: shishkovadk@gmail.com;

Шабарев Амин Рашитович, мл. науч. сотр. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза, отдел экспериментальной медицины НИИ КПССЗ, e-mail: shabar@kemcardio.ru;

Кутихин Антон Геннадьевич, канд. мед. наук, зав. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза, отдел экспериментальной медицины НИИ КПССЗ, e-mail: antonkutikhin@gmail.com