

Т.Э. Владимирская, И.А. Швед, С.Г. Криворот

Белорусская медицинская академия последиипломного образования, Минск, Беларусь

Апоптоз клеток стенки коронарных артерий как фактор развития и прогрессирования коронаросклероза

Цель исследования: изучить апоптоз отдельных клеточных компонентов сосудистой стенки коронарных артерий на различных морфологических стадиях атеросклероза. **Материал и методы исследования.** Исследования проводили на коронарных артериях, взятых от 52 умерших больных с атеросклерозом и ишемической болезнью сердца на различных стадиях атерогенеза. Для морфологического исследования готовили парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван Гизону, Массону, на липиды суданом черным В, по Ван Коссу. Для определения апоптоза использовали метод TUNEL на парафиновых срезах. Апоптотический индекс (АИ) вычисляли по TUNEL-позитивным клеткам внутренней и средней оболочки коронарной артерии по всему периметру каждого микропрепарата при увеличении 1000. **Результаты.** Исследование апоптоза показало достоверное ($p < 0,05$) увеличение АИ гладких миоцитов, эндотелиоцитов, макрофагов в коронарных артериях, пораженных атеросклерозом, по сравнению с неповрежденными сегментами сосудов контрольной группы. Достоверное снижение АИ эндотелиоцитов, гладких миоцитов и макрофагов ($p < 0,05$) прослеживалось от ранних стадий атерогенных нарушений к атероматозу. **Выводы.** Установлено, что апоптоз гладкомышечных клеток, макрофагов и эндотелиоцитов наиболее интенсивно протекает на ранних стадиях атеросклеротического процесса. По мере прогрессирования атеросклероза выраженность и распространенность апоптоза клеток коронарных артерий снижается, и преобладают процессы некроза. Апоптоз клеток коронарных артерий способствует расширению зоны атероматоза, дестабилизации бляшки, увеличивает риск развития тромбозов и образования изъязвлений.

Ключевые слова: апоптоз, атеросклероз, эндотелиоциты, гладкомышечные клетки, макрофаги.

(Вестник РАМН. 2013; 9: 22–26)

22

Введение

Атеросклеротическое поражение артерий начинается с накопления частиц, богатых холестерином, в интиме артерий вследствие дисфункции эндотелия. Следующим этапом атерогенеза является инфильтрация интимы циркулирующими моноцитами, которые захватывают липопротеины низкой плотности (ЛПНП) и превращаются

в пенистые клетки. Пенистые клетки, т.е. макрофаги, перегруженные липидами, в большинстве своем остаются в интиме артерий и погибают, подвергаясь апоптозу. При этом происходит выделение накопленных в пенистых клетках эфиров холестерина, холестерина и кристаллов моногидрата холестерина. Эти процессы приводят к очаговому скоплениям холестерина в интиме артерий и создают предпосылки для образования липидных пя-

T.E. Vladimirskaia, I.A. Shved, S.G. Kryvorot

Belarussian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk, Belarus

Apoptosis cells of coronary artery wall as developing and progressing factor of coronary sclerosis

Objective: to study apoptosis of individual cellular components of the vascular wall of coronary arteries at different morphological stages of atherosclerosis. **Material and methods.** The study was performed on coronary arteries taken from 52 deceased patients with atherosclerosis and coronary heart disease at different stages of atherogenesis. For morphological study prepared paraffin sections, which were stained for morphological studies were prepared paraffin sections, which were stained with hematoxylin and eosin, by Van Gieson, Masson, on lipids with Sudan black B, according to Van Cossu. To determine apoptosis, TUNEL method used in paraffin sections. Apoptotic index (AI) was calculated by TUNEL-positive cells and the average inner shell coronary artery around the perimeter each with increasing microscopic 1000. **Results.** Investigation showed significant apoptosis ($p < 0,05$) increase in AI smooth muscle, endothelial cells, macrophages in the coronary arteries affected by atherosclerosis compared to intact control group vascular segments significant reduction AI endothelial, smooth muscle cells and macrophages ($p < 0,05$) traced from the early stages of atherogenic disorders to atheromatosis. **Conclusions.** It is established that apoptosis of smooth muscle cells, macrophages and endothelial cells is the most intensive on early stages of atherosclerotic process. In process of progressing of atherosclerosis intensity and prevalence of apoptosis of coronary artery wall cells decreases, and processes of necrosis becomes predominant. Apoptosis of coronary artery wall cells is valuable in increasing the zones of atheromatosis, plaque destabilizations, and also increases the risk of thrombosis and ulcerations.

Key words: apoptosis, atherosclerosis, endothelial cells, smooth muscle cells, macrophages.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk – Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2013; 9: 22–26)

тен, затем липидных полосок и в последующем — бляшек. Дальнейшее развитие атеросклеротического поражения характеризуется миграцией в интиму гладкомышечных клеток (ГМК) и их пролиферацией. Формирование атеросклеротических поражений представляет собой стадийный процесс. Прогрессирующее развитие атеросклеротической бляшки, особенно присоединение ее осложнений, приводит к развитию критического стеноза пораженной артерии и, соответственно, к ишемии соответствующего органа [1–6].

До недавних пор считали, что причиной гибели клеток внутри атеросклеротической бляшки является прямое токсическое воздействие на них, к примеру, свободных радикалов, образующихся при перекисном окислении липидов [7]. Однако в настоящее время показано, что основной вклад в суммарную клеточную гибель при атеросклерозе вносит апоптоз [5, 8–10]. В эксперименте в присутствии ионов меди в ЛПНП вызывали апоптоз человеческих моноцитов и макрофагов, гладкомышечных, эндотелиальных клеток (ЭК), а также нейронов дорсального ганглия крыс [11–14]. Индуцированный ЛПНП апоптоз ГМК усиливался цитокинами — фактором некроза опухоли α (TNF α) и интерфероном [12]. Апоптоз ГМК стимулируется провоспалительными факторами и протекает с участием цитотоксических Т лимфоцитов (Т киллеров) [5]. С помощью сочетания иммуногистохимического метода идентификации морфологической принадлежности клеток и специфических тестов на фрагментацию ДНК был обнаружен очень высокий процент апоптотических клеток в атеросклеротических бляшках человека *in situ* [5]. По краям атеросклеротической бляшки выявляются макрофаги и ГМК, погибающие по механизму апоптоза [15].

Таким образом, апоптоз участвует в патогенезе атеросклероза коронарных сосудов сердца, однако неясна роль апоптоза клеток сосудов на ранних (доклинических) стадиях и в прогрессировании атеросклеротического процесса.

Цель исследования: изучить апоптоз отдельных клеточных компонентов сосудистой стенки коронарных артерий на различных морфологических стадиях атеросклероза.

Материалы и методы

Материал для исследования

Исследования проводили на коронарных артериях (правая и левая коронарная артерия, их ветви), взятых от 52 умерших больных с атеросклерозом и ишемической болезнью сердца (число исследованных сегментов сосудов — 178). Коронарные артерии вскрывали продольно и пересекали поперечно, отбирали проксимальный, дистальный и центральный отдел сосуда области поражения. В качестве контроля брали коронарные артерии лиц ($n = 10$) без кардиоваскулярной патологии, погибших от несчастных случаев.

Методы исследования

Макроскопическое исследование коронарных артерий пациентов, умерших от ишемической болезни сердца и атеросклероза, включало оценку степени атеросклероза сосудов, их стеноза, наличие атероматоза, кальциноза, изъязвлений, тромбозов. Иссекали участки сосудов на различных стадиях атерогенеза: липидная полоска, фиброзная бляшка, осложнения бляшки.

Для морфологического исследования готовили парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксили-

ном и эозином, по Ван Гизону, Массону, на липиды суданом черным В, по Ван Коссу. Изучение проводили в проходящем свете на микропрепаратах, окрашенных вышеописанными методами.

Для определения апоптоза использовали метод TUNEL на парафиновых срезах. Верификацию стадий атеросклеротического процесса в микропрепаратах коронарных артерий, окрашенных гематоксилином и эозином и по Массону, осуществляли посредством световой микроскопии при увеличении 100 (объектив 10 × окуляр 10). Исследование клеточного состава коронарных сосудов проводили на увеличении 400 и 1000 на микропрепаратах, окрашенных гематоксилином и эозином и TUNEL-методом. Для иммуногистохимического типирования ЭК, макрофагов и ГМК использовали антитела к фактору Виллебранда (1:200), CD 68 (1:200) и гладкомышечному актину α (1:400). Визуализацию результата реакции осуществляли при помощи полимерной системы.

Апоптотический индекс (АИ) вычисляли по TUNEL-позитивным клеткам внутренней и средней оболочки коронарной артерии по всему периметру каждого микропрепарата при увеличении 1000 по следующей формуле:

$$\text{АИ} = \frac{\text{Число TUNEL-позитивных клеток}}{\text{Общее число клеток}} \times 100.$$

АИ определяли для ГМК, ЭК новообразованных сосудов бляшки и ЭК интимы коронарных артерий, макрофагов.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ результатов исследования выполняли с использованием пакета программ «STATISTICA 6,0» (Statsoft, Inc., США). Для проверки нормальности распределения данных пользовались критерием Колмогорова–Смирнова, а также показателями эксцесса и асимметрии. Для определения статистической значимости различий между группами использовали параметрический критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Морфологическое исследование микропрепаратов коронарных артерий, пораженных атеросклерозом, на различных стадиях атерогенеза

При микроскопическом исследовании коронарных артерий визуализировались все морфологические стадии атеросклероза: липоидоз, липосклероз, атероматоз, осложнения атероматоза.

На стадии липоидоза наблюдали гиперплазию внутренней оболочки артерии за счет разрастания коллагеновых и эластических волокон. Отмечались небольшие скопления пенистых клеток (в основном, субэндотелиально), миграция в интиму ГМК и фибробластов, формирование в гиперплазированной интиме капилляров щелевидного типа. В средней оболочке имели место деструкция и распад эластических волокон, очаговый лизис ГМК.

При изучении гистологических препаратов сегментов коронарных артерий на стадии липосклероза изменения стенки сосуда заключались в утолщении внутренней оболочки за счет разрастания новообразованной соединительной ткани. Гиперплазия интимы достигала $1/2$ от толщины сосудистой стенки. Присутствовала очаговая десквамация эндотелия, скопления в неоинтиму

пенистых и гладкомышечных клеток. В ряде наблюдений в ее толще выявлялись очаги пылевидной петрификации, в основном вокруг щелевидных сосудов. В адвентиции — отек и разволокнение соединительной ткани.

Большинство исследованных сегментов коронарных артерий характеризовалось наличием атероматоза, однако степень зрелости атероматозных бляшек варьировала от небольших по размеру очагов инкапсуляции липидов до старых объемных бляшек с развитой кальцинированной атеромой с изъязвлениями и выкрашиванием содержимого в просвет артерии. Менее зрелые атероматозные бляшки характеризовались наличием небольших участков атероматоза, содержащих кристаллы холестерина, пенистые клетки, клеточный и волокнистый детрит. Жир в липидном ядре располагался внутри (в скоплениях пенистых клеток) и внеклеточно. В отдельных бляшках капли внеклеточного жира сливались, образуя обширные поля коллагенизированной жировой ткани (рис. 1).

В некоторых случаях зоны атероматоза в центре бляшки, состоящие из клеточного и волокнистого детрита, внеклеточного жира и разрушенных макрофагов, чередовались с участками соединительной ткани с обилием кровеносных сосудов. Эндотелиальный слой покрышки бляшки в большинстве случаев поврежден, эндотелиальные клетки набухшие. В местах повреждения эндотелиального пласта наблюдалась адгезия клеток крови (эритро-, лейко-, тромбоцитов) к поверхности интимы. Отмечалось расслоение и разрывы покрышки бляшки, деструкция и распад соединительнотканых волокон покрышки, очаговые кровоизлияния в области повреждения покрышки бляшки. Большинство бляшек были петрифицированы. Известь в основном откладывалась вокруг сосудов бляшки, по периметру зоны атероматоза, иногда в покрышке бляшки в виде скоплений гранул либо пластинок (рис. 2).

В 4 наблюдениях отмечены осложнения атероматозной бляшки — изъязвления с формированием язвенного дефекта и тромбозы.

Зрелые атероматозные / фиброзные бляшки в коронарных артериях выступали в просвет сосуда, значительно сужая его. В областях атероматоза и на внутренней эластической мембране присутствовали отложения внеклеточного жира (рис. 3).

Зрелые фиброзные бляшки характеризовались утолщенной бесклеточной или малоклеточной покрышкой.

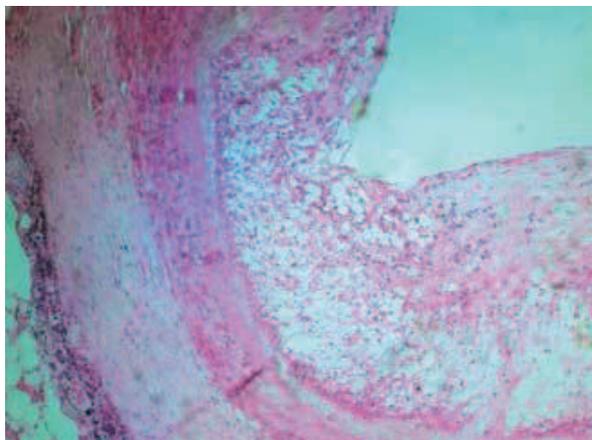


Рис. 1. Скопления вне- и внутриклеточного жира в склеротизированной коронарной артерии. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$.

В центральной области бляшки располагались кристаллы холестерина и разрушенные клетки. Во всех случаях наблюдалась адгезия эритро- и тромбоцитов к эндотелию сосуда. В покрышке бляшки, наряду с щелевидными, были распространены округлые сосуды, часто с пристеночной агрегацией клеток крови.

Апоптоз гладкомышечных, эндотелиальных клеток и макрофагов стенки коронарной артерии на различных стадиях атеросклероза

Детекция апоптоза показала наличие TUNEL-позитивных клеток в средней и внутренней оболочке коронарной артерии и в области атеросклеротической бляшки. При этом в зоне атеросклеротической бляшки коронарных артерий было зафиксировано TUNEL-позитивное окрашивание ядер ЭК в новообразованных сосудах (рис. 4).

В зоне атеромы наблюдали умеренное и выраженное TUNEL-позитивное окрашивание ядер пенистых макрофагов (рис. 5).

В коронарных сосудах со зрелыми атероматозными бляшками очень редко детектировался апоптоз ГМК (в основном в меди и на границе со средней оболочкой). В менее зрелых бляшках апоптоз ГМК и макрофагов был распространен как в меди, так и в наружной части покрышки бляшки (рис. 6).

Исследование апоптоза показало достоверное ($p < 0,05$) увеличение АИ ГМК, ЭК, макрофагов в коронарных артериях, пораженных атеросклерозом, по сравнению с неповрежденными сегментами сосудов контрольной группы (табл.).

По мере прогрессирования атеросклеротического процесса отмечено снижение АИ. Существенная разница ($p < 0,05$) установлена между АИ ГМК на стадиях липоидоза, липосклероза и атероматоза. Достоверное снижение АИ макрофагов ($p < 0,05$) прослеживалось от ранних стадий атерогенных нарушений к атероматозу. Аналогично снижалось число апоптотических ЭК, и значимые различия по ЭК наблюдали на стадиях липоидоза и липосклероза по сравнению со стадией атероматоза ($p < 0,05$).

На стадии липоидоза АИ ЭК несколько превышал АИ пенистых макрофагов и ГМК, однако по мере прогрессирования атеросклероза АИ ЭК интимы снижался, и на стадии липосклероза преобладал апоптоз пенистых клеток. На участках коронарных артерий с атероматозом

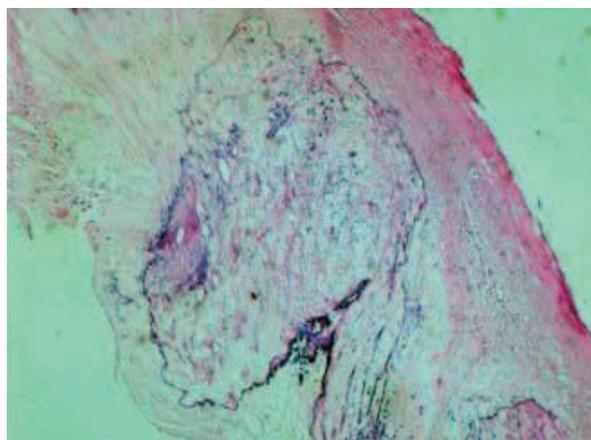


Рис. 2. Обызвествление атеросклеротической бляшки. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$.

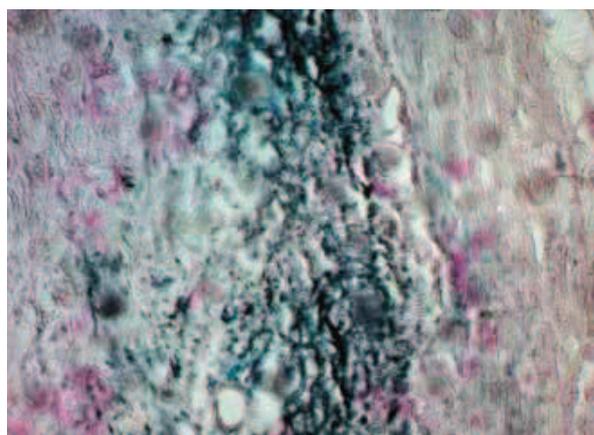


Рис. 3. Скопления липидов в атероме и на внутренней эластической мембране. Окраска суданом черным В, $\times 200$.

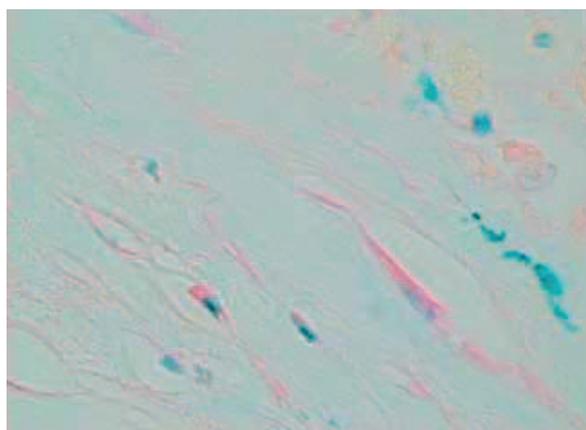


Рис. 4. Апоптоз эндотелиальных клеток в сосудах бляшки коронарной артерии — синяя метка. Метод TUNEL, $\times 1000$.

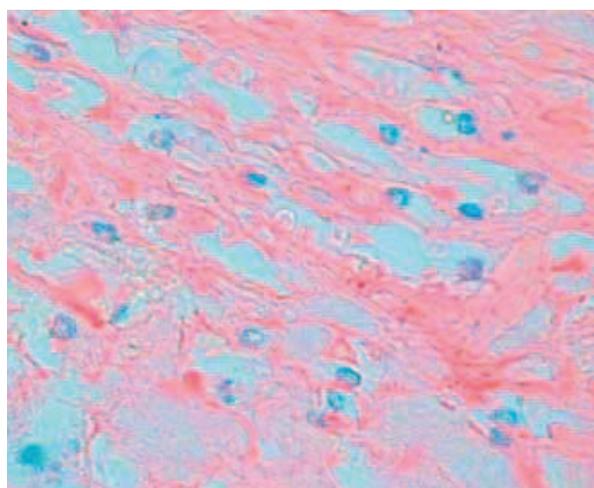


Рис. 5. Апоптоз пенистых клеток в атероматозной бляшке коронарной артерии — синяя метка. Метод TUNEL, $\times 1000$.

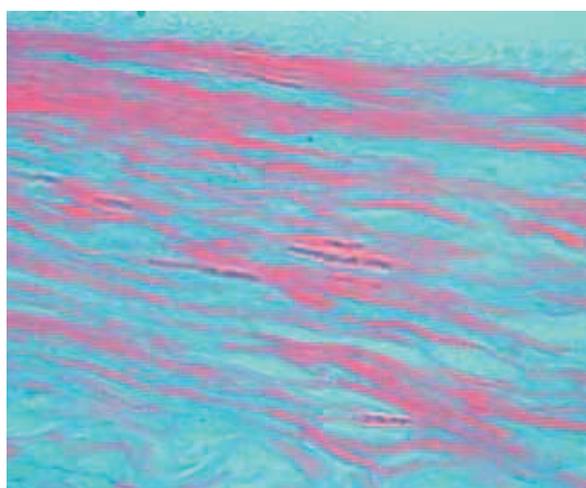


Рис. 6. Апоптоз гладкомышечных клеток в меди коронарной артерии — синяя метка. Метод TUNEL, $\times 1000$.

Таблица. Выраженность апоптоза гладкомышечных, эндотелиальных клеток и макрофагов стенки коронарной артерии

Стадия атеросклероза		Апоптотический индекс, %			
		Гладкомышечные клетки	Макрофаги	Эндотелиальные клетки	Эндотелиальные клетки сосудов бляшки
0	Контроль	1,1 \pm 0,04	1,0 \pm 0,09	0,02 \pm 0,002	—0
1	Липоидоз	30,1 \pm 10,2 ^{*2,3}	32,4 \pm 10,2 ^{*2,3}	36,5 \pm 8,8 ^{*3}	19,1 \pm 8,5 ³
2	Липосклероз	14,2 \pm 1,4 ^{*1}	18,1 \pm 0,9 ^{*1,3}	16,8 \pm 4,2 ^{*3}	7,8 \pm 3,1
3	Атероматоз	9,4 \pm 0,9 ^{*1}	6,2 \pm 0,9 ^{*1,2}	8,7 \pm 1,4 ^{*1,2}	5,6 \pm 1,5 ²

Примечание. * — различия достоверны по сравнению с контрольным значением ($p < 0,05$), ^{1,2,3} — цифра обозначает стадию атеросклероза, по сравнению с которой различия достоверны ($p < 0,05$).

апоптоз ГМК встречался чаще, чем апоптоз ЭК и макрофагов. По краям атеросклеротической бляшки (стадия атероматоза) имело место TUNEL-положительное окрашивание клеток белой крови, чаще лимфоцитов, иногда окрашивались сегментоядерные нейтрофилы. ГМК с TUNEL-положительными ядрами достаточно часто встречались в меди, тогда как апоптоз ГМК в коронарных артериях на стадии атероматоза обычно выявляли в фиброзной крышке бляшки.

Заключение

В результате исследования установлены закономерности апоптоза клеточных компонентов коронарных артерий при атероматозных повреждениях, выразившиеся в следующем.

- В процесс формирования атероматозных повреждений коронарных артерий включаются основные клеточные компоненты: ЭК, ГМК, макрофаги.

- Установлена прямая взаимосвязь зональной и клеточной приуроченности апоптоза и его интенсивности со стадиями атероматозных повреждений стенки коронарных артерий. В частности, на стадии липидной инфильтрации отмечается интенсификация апоптоза ГМК интимы и субинтимального слоя, что снижает общую продукцию коллагена и, тем самым, может привести к истончению фиброзной покрышки и переходу ее в нестабильную форму. Компенсаторно-дистрофические изменения и интенсивный апоптоз ЭК обуславливают усиление инфильтрации липидами (повреждения ЭК) интимы, снижение темпов и толщины формирования фиброзной покрышки и в итоге приводят к дестабилизации бляшки. Апоптоз ЭК в сосудах бляшки нарушает ее трофику, усиливает ин-

тенсивность дистрофических изменений, в результате чего повышается риск изъязвления бляшки и развития тромбозов. Снижение интенсивности фагоцитоза в результате апоптотической гибели макрофагов ведет к нарушению утилизации поврежденных клеток и расширению зоны атероматоза.

- По мере прогрессирования атеросклероза выраженность и распространенность апоптоза гладких миоцитов, макрофагов и эндотелиоцитов снижаются, и начинают преобладать процессы некроза клеток как исход апоптоза. Однако в перифокальных отделах отмечается интенсификация апоптоза ГМК меди, что ведет к увеличению объема атеромы и распространению бляшки как внутрь, так и наружу (вплоть до адвентиции).

REFERENCES

1. Hank A., Cormack D. *Gistologiya – Histology*. 1983; 4: 6–48.
2. Pal'tsev M.A., Anichkov N.M. *Patologicheskaya anatomiya – Pathological anatomy*. 1981; 2:16–30.
3. Serov V.V., Shekhter A.B. *Soyedinitelnaya tkan (Funksionalnaya morfologiya i obshchaya patologiya)*. [Connective Tissue (Functional Morphology and General Pathology)]. Moscow, Meditsina, 1981. 312 p.
4. Nikitin Yu.P. *Byulleten SO RAMN – Bulletin of SB RAMS*. 2006; 2(120): 6–14.
5. Storozhakov G.I., Uteshev D.B. *Serdechnaya nedostatochnost – Heart failure*. 2000; 1(4): 131–134.
6. Zhdanov V.S., Drobkova I.P., Chumachenko P.V. *Arkhiv patologii – Archives of Pathology*. 2006; 2: 19–24.
7. Breyune B., Sandai K., Kieten A. *Biokhimiya – Biochemistry*. 1998; 63(7): 966–975.
8. Araki S., Shimada Y., Kaji K., Hayashi H. Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 168: 1194–1200.
9. Bennet M.R., Evan G.I., Newby A.C. Deregulated c-myc oncogene expression blocks vascular smooth muscle cell inhibition mediated by heparin, interferon mitogen depletion and cyclic nucleotide analogues induces apoptotic cell death. *Circ. Res*. 1994; 74: 525–536.
10. Reed V.C., Hardwick S.J., Mitchinson M.S. Fragmentation of DNA in P388D1 macrophages exposed to oxidised low-density lipoproteins. *FEBS Lett*. 1993; 332: 218–220.
11. Bjorkerud B. Contrary effects of lighting and storgly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells. *Arterioscl. Thrombosis Vasc. Biol*. 1996; 16: 416–424.
12. Jovinge S., Crisby M., Thyberg J. DNA fragmentation and ultrastructural changes of degenerating cells in atherosclerotic lesions. *Arterioscl. Thrombosis Vasc. Biol*. 1997; 17: 2225–2231.
13. Escargueilbane I., Meilhac O., Pieraggi M.T. Oxidized LIOLS induced massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway prevention by aurintricalboxylic acid. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol*. 1997; 17: 331–339.
14. Papassotiropoulos A., Ludwig M. Induction of apoptosis and secondary necrosis in ganglion cell cultures by oxidized low density lipoprotein. *Neurosci. Lett*. 1996; 209: 33–36.
15. Hegyi L., Skepper J.N., Cary N.R. Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis. *J. Pathol*. 1996; 180: 423–429.

26

FOR CORRESPONDANCE

Vladimirskaya Tat'yana Ernstovna, MD, leading research scientist of the Research Laboratory of Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education.

Address: 3, P. Brovki St., Minsk, 220013; **tel.:** (37517) 265-34-33; **e-mail:** tan_2304@inbox.ru

Shved Ivan Adamovich, PhD, professor, senior scientist of the Research Laboratory of Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education.

Address: 3, P. Brovki St., Minsk, 220013; **tel.:** (37517) 265-34-33; **e-mail:** cnil@belmapo.by

Krivorot Svetlana Georgievna, research scientist of the Research Laboratory of Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education.

Address: 3, P. Brovki St., Minsk, 220013; **tel.:** (37517) 265-34-33; **e-mail:** naumenko_sveta@mail.ru