

## Экспрессия и секреция цитокинов в интима аорты и макрофагах при атерогенезе

Котяшова С.Ю.<sup>1,2</sup>, Карагодин В.П.<sup>3</sup>, Орехов А.Н.<sup>1,3</sup>, Собенин И.А.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> — Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Москва, 143025, ул. Новая, д. 100, тел. +7(495)4120113, +7(495)4121557, e-mail: office@inat.ru

<sup>2</sup> — Московский физико-технический институт (Государственный университет), Московская обл., 141700, г.Долгопрудный, Институтский пер., 9, тел. +7 (495) 408-64-36, e-mail: info@mipt.ru

<sup>3</sup> — ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, д. 8, тел. +7(499)6012181, e-mail: niopp@mail.ru

*Обнаружено увеличение продукции как фактора некроза опухоли (ФНО), так и цитокина CCL-18 в атеросклеротических бляшках в сравнении с непораженной интимой. Однако атерогенные липопротеиды низкой плотности (ЛНП) снижали экспрессию провоспалительного цитокина ФНО и способствовали противовоспалительной модуляции макрофагов, что проявлялось в повышенной экспрессии CCL18. Характер этого эффекта сохранялся и при измерении секреции ФНО и CCL-18, хотя степень выраженности эффекта снижалась. Баланс системы провоспалительных и противовоспалительных цитокинов требует дальнейшего изучения, так как он определяет динамику развития атеросклеротического поражения.*

**Ключевые слова:** атеросклероз, цитокины, макрофаги, липопротеиды низкой плотности, воспаление

### Введение

Известно, что макрофаги играют важную роль в развитии атеросклеротических повреждений [3]. Предполагается, что под действием модифицированных липопротеидов низкой плотности (ЛНП) макрофаги выделяют цитокины, стимулирующие деление гладкомышечных клеток (ГМК) и синтез межклеточного вещества. Другие цитокины, например, интерферон-гамма (ИФН- $\gamma$ ) из активированных Т-лимфоцитов, тормозят деление ГМК и синтез коллагена. Таким образом, происходит сложное взаимодействие факторов как ускоряющих, так и тормозящих атерогенез.

В связи с этим исследование цитокинового баланса трудно переоценить по причине того, что он позволяет монитормировать характер течения процесса атерогенеза, прогнозировать исход заболевания, контролировать эффективность терапии, особенно в случаях применения средств с иммуномодулирующей и иммунокорректирующей активностью.

Однако к настоящему времени роль многих цитокинов в связи с функционированием разных клеток интимы, включая иммунокомпетентные, остается недостаточно исследованной. Это послужило основанием для изучения процессов экспрессии и секреции двух цитокинов (провоспалительного ФНО и противовоспалительного CCL-18) как в интима аорты, так и в клеточной культуре макрофагов в условиях развития атеросклеротического поражения.

### Материалы и методы

Грудную аорту человека извлекали через 1,5—3 ч после внезапной смерти у семи мужчин в возрасте 30—60 лет. Сосуды вскрывали продольно и промывали изотоническим фосфатным буферным раствором, pH 7.6. Внешне непораженные участки и участки с атеросклеротическими изменениями (липофиброзные и фиброзные бляшки) обнаруживали макроскопически, согласно классификации Совета по атеросклерозу Американской ассоциации сердца [8]. Макроскопически непораженные участки имели гладкую поверхность просвета. После макроскопической идентификации участки образцов размером 5 x 10 мм<sup>2</sup>

вырезали перпендикулярно длинной оси сосуда. Нефиксированные образцы погружали в OCT compound (Miles Inc., Elkhart, IN, США), замораживали в жидком азоте и готовили криостатные срезы толщиной 5 мкм. Снимки срезов делались при помощи светового микроскопа (увеличение x20). Иммуногистохимическое окрашивание вырезанных из аорты человека участков интимы с целью обнаружения цитокинов проводилось с помощью набора UltraVision Quanto Detection System HRP в соответствии с рекомендациями производителя.

Моноциты получали из периферической крови здоровых доноров с добавлением антикоагулянта. Кровь разделяли на подушке Фикола для получения лейкоцитарной фракции. Для выделения чистой популяции моноцитов CD14+ проводили магнитную сепарацию, добавляя к клеткам парамагнитные наночастицы (Milteniy Biotec), конъюгированные с антителами к CD14 [2]. Клетки ресуспендировали в концентрации 1 млн клеток/мл в среде X-vivo 10 (Biowhittaker) и распределяли в 24-луночный планшет из расчета 1 млн клеток на лунку.

Для получения моноцитов-макрофагов провоспалительного фенотипа к клеткам добавляли ИФН- $\gamma$  в конечной концентрации 100 нг/мл. Для получения моноцитов-макрофагов противовоспалительного фенотипа в среду добавляли интерлейкин ИЛ-4 в конечной концентрации 10 нг/мл. Индукция атерогенеза вызывалась путем добавления к клеткам нормальных или атерогенных ЛНП (выделенных из сыворотки больных атеросклерозом) до конечной концентрации 100 мкг/мл. Инкубацию клеток проводили при 37°C в насыщенной парами воды атмосфере в CO<sub>2</sub>-инкубаторе без смены среды в течение суток для макрофагов провоспалительного фенотипа и 6 суток для макрофагов противовоспалительного фенотипа. По окончании инкубации культуральную среду отбирали в пробирки объемом 1,5 мл и хранили при -70°C до измерения концентрации секретированных цитокинов. К клеткам добавляли по 300 мкл тризола на лунку и хранили при -70°C до выделения РНК.

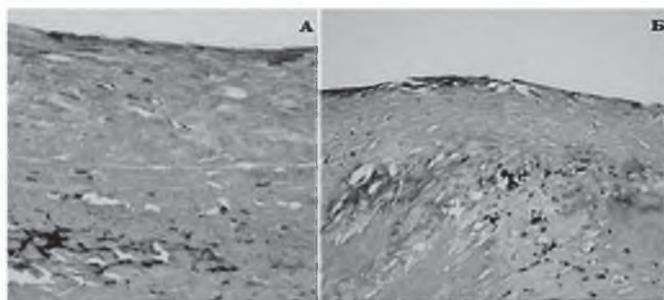


Рис. 1. Вертикальный срез интимы аорты человека, иммуногистохимическое окрашивание. Темно-серые области – окраска на ССL-18; черные области – окраска на ФНО. А – непораженная интима; Б – атеросклеротические бляшки.

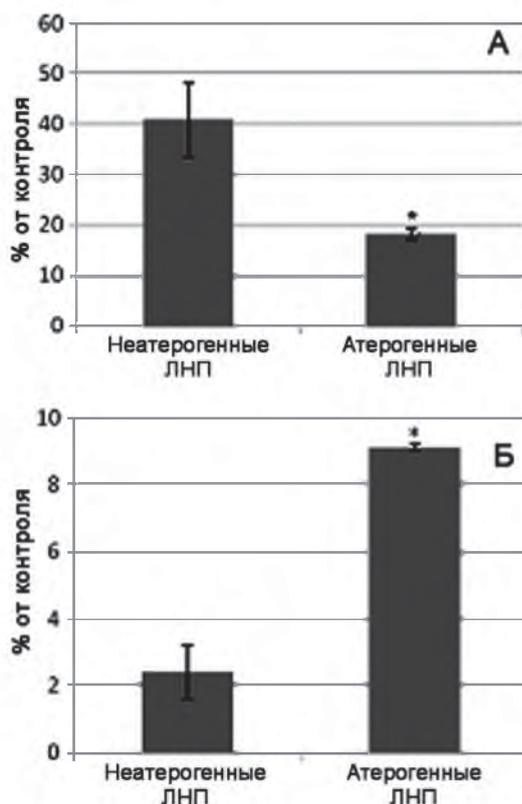


Рис. 2. Относительная экспрессия цитокинов в макрофагах при инкубации с ЛНП:

А – экспрессия ФНО; стимуляция ИФН-γ; число доноров N = 4;

Б – экспрессия ССL18; стимуляция ИЛ-4; число доноров N = 3.

\* – достоверное отличие уровня экспрессии при инкубации с атерогенными ЛНП,  $p < 0,005$ .

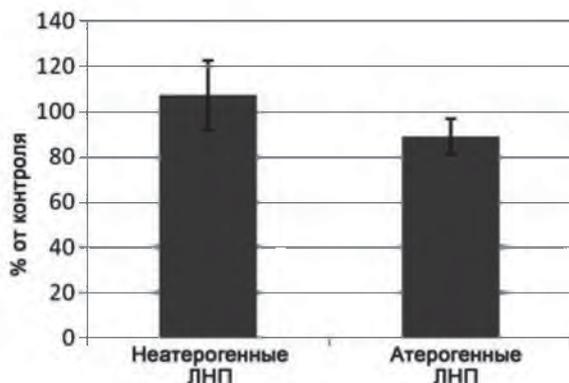


Рис. 3. Уровень секреции ФНО макрофагами при инкубации с модифицированными ЛНП; стимуляция ИФН-γ; число доноров n = 8.

Секрецию ФНО и ССL-18 измеряли в культуральной среде методом твердофазного ИФА. Для измерения экспрессии ФНО и ССL-18 из моноцитов-макрофагов выделяли РНК методом фенол-хлороформной экстракции [9], методом обратной транскрипции строили кДНК с помощью набора ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Экспрессию соответствующих генов определяли методом ПЦР в реальном времени.

### Полученные результаты

На первой стадии экспериментов была проведена иммуногистохимическая идентификация цитокинов ССL-18 и ФНО в срезах интимы аорты человека. Для непораженной интимы наблюдалась невысокая интенсивность окрашивания, что указывало на слабое присутствие как ССL-18, так и ФНО (рис. 1А).

В атеросклеротических бляшках интенсивность гистохимического окрашивания существенно возрастала, т.е. наблюдалась значительная продукция как ССL-18, так и ФНО (рис. 1Б).

С учетом гетероклеточной структуры интимы и присутствия в ней иммунокомпетентных клеток, на втором этапе работы представлялось интересным выяснить связь экспрессируемых цитокинов с макрофагами. Достаточно распространенным является представление о том, что под действием модифицированных (т.е. атерогенных) ЛНП макрофаги способны экспрессировать цитокины, влияющие на участие в атерогенезе других типов клеток, например, ГМК [6].

Нами показано, что при инкубации *in vitro* макрофагов с атерогенными ЛНП наблюдается пониженная экспрессия ФНО по сравнению с клетками, инкубированными с неатерогенными ЛНП (рис. 2А).

Экспрессия ССL18 в макрофагах, инкубированных с атерогенными ЛНП, была выше по сравнению с клетками, инкубированными с неатерогенными ЛНП (рис. 2Б).

Наконец, на завершающем этапе работы цитокины определялись в культуральной среде первичной культуры моноцитов человека. При измерении секреции ФНО и ССL-18 были получены результаты, схожие с данными предыдущего эксперимента (рис. 3), но выраженность эффектов в отношении обоих цитокинов была ниже. На этом рисунке представлены данные только по снижению секреции ФНО, секреция ССL-18 обнаружила сходное по величине повышение под действием модифицированных ЛНП.

### Обсуждение результатов

По нашим представлениям, активация цитокинов в начальной стадии атеросклероза служит маркером прогрессирования заболевания с вовлечением в патогенез все новых и новых составляющих. Вероятно, баланс системы провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, факторов роста, регулирующих их выработку и взаимодействие, а также привлекающих к месту воспаления новые иммунокомпетентные клетки, определяет степень перехода обратимой обструкции внутренней стенки сосудов в необратимую и, следовательно, определяет тяжесть заболевания атеросклерозом.

Нами обнаружено увеличение продукции как ФНО, так и ССL-18 в атеросклеротических бляшках в сравнении с непораженной интимой. Исходя из имеющихся представлений об атерогенезе, можно предположить, что накопление холестерина во внутренней стенке аорты

с последующим образованием бляшек происходило под влиянием модифицированных ЛНП [7]. Однако проникающая в интиму из крови популяция гетерогенных моноцитов может, как известно, приводить к образованию макрофагов разного фенотипа [5], что не позволяет считать полученные результаты неожиданными (учитывая и регистрацию нами только двух цитокинов).

В то же время на уровне иммунокомпетентных клеток (моноцитов/макрофагов) действие атерогенных ЛНП имело принципиально другой характер. Атерогенные ЛНП снижали экспрессию провоспалительного цитокина ФНО и способствовали противовоспалительной модуляции макрофагов, что проявлялось в повышенной экспрессии CCL-18.

Эти результаты требуют дополнительной интерпретации, так как находятся в существенном противоречии с ранее полученными нами данными [1]. В частности, экспериментами на первичной культуре интимальных клеток аорты (исходно взятых из непораженных участков сосуда) показано увеличение экспрессии ФНО и ИЛ-1 при добавлении модифицированных ЛНП. Главное отличие в дизайне двух экспериментов — наличие в последнем случае в культуре, помимо макрофагов, других клеток, главным образом ГМК.

В связи с этим укажем на большой интерес исследователей к феноменам атерогенез-цитокины. Так, относительно недавно было установлено, что развитие атеросклероза сосудов нижних конечностей ассоциируется с повышением в сыворотке крови уровня проатерогенных цитокинов (ИФН- $\gamma$ , ИЛ-8, ИЛ-6), снижением уровня ИЛ-10 и ИЛ-4 [4]. Важную роль в прогрессировании атеросклероза могут играть также цитокины ИЛ-18, ИЛ-3 и некоторые другие [6]. Вероятно, клеточные и гуморальные иммунные реакции, возникающие в ответ на действие атерогенных ЛНП, на определенном этапе развития поражения имеют защитный характер. Однако в дальнейшем иммунное воспаление теряет защитный характер и приводит к усиленному повреждению и ремоделированию стенки сосуда в результате модификации ее клеточных элементов.

Как уже указывалось выше, цитокиновому балансу, по нашему мнению, отводится одна из ключевых ролей в атерогенезе. Более того, цитокиновый статус организма важно

оценивать во время лекарственного воздействия для оценки эффективности проводимого лечения, оптимизации иммуннокорректирующей терапии и в качестве прогностического критерия развития воспалительного процесса. Мониторинг концентраций различных цитокинов и их соотношения может, видимо, выявить тип иммунного ответа организма на атеросклеротическое поражение, что позволяет индивидуально подходить к назначению адекватной терапии.

#### Список литературы

1. Бобрышев Ю.В., Карагодин В.П., Мойсенович М.М., Мельниченко А.А., Орехов А.Н. Анализ воспалительных процессов в диффузном утолщении интимы аорты человека // Цитология. — 2013. — Т. 55, №6. — С. 394–405.
2. Грачев А.Н., Карагодин В.П., Мясова В.А., Кириченко Т.В., Рудимов Е.Н., Орехова Е.А., Хренов М.О., Архачева Н.В., Мубаракшина Э.К., Кжышковская Ю.Г., Орехов А.Н. Выделение моноцитов из крови человека для изучения влияния факторов внешней среды на иммунитет // Бюлл. МОИП. — 2009. — Т. 114, №3. — С. 291–296.
3. Душкин М.И. Макрофаги и атеросклероз: патофизиологические и терапевтические аспекты // Бюлл. СО РАМН. — 2006. — №2. — С. 47–55.
4. Запорожец Т.С., Майстровский К.В., Раповка В.Г., Иванушко Л.А., Гажа А.К., Смолина Т.П. Особенности иммунного и цитокинового статуса у пациентов с атеросклерозом сосудов нижних конечностей // Цитокины и воспаление. — 2011. — Т. 10, №3. — С. 68–75.
5. Кжышковская Ю.Г., Грачев А.Н. Маркеры моноцитов и макрофагов для диагностики иммунопатологий // Патогенез. — 2012. — Т. 10, №1. — С. 14–19.
6. Куликова А.Н. Роль воспаления в атерогенезе при сахарном диабете // Цитокины и воспаление. — 2007. — Т. 6, №3. — С. 14–19.
7. Чернова С.И., Плохов В.Н. Цитокиновый профиль у больных атеросклерозом // Вестник волгоградского медицинского университета. — 2009. — №4. — С. 36–40.
8. Orekhov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N., Koteliansky V.E., Glukhova M.A., Khashimov Kh.A., Smirnov V.N. Association of low-density lipoprotein with particulate connective tissue matrix components enhances cholesterol accumulation in cultured subendothelial cells of human aorta // Biochim. Biophys. Acta. — 1987. — Vol. 928, №3. — P. 251–258.
9. Velican C., Velican D. Heterogeneity in the composition and aggregation patterns of coronary intima acid mucopolysaccharides (glycosaminoglycans) // Atherosclerosis. — 1978. — Vol. 29, №2. — P. 141–159.
10. Vijay R., Angela L. Slit alteration of hepatic but not renal transporter expression in diet-induced obese mice drug // Metab. Dispos. — 2011. — Vol. 39, №6. — P. 992–999.

Поступила 11.10.2013

## *Expression and secretion of cytokines in the intima of the aorta and in macrophages during atherogenesis*

Kotyashova S.Y.<sup>1,2</sup>, Karagodin V.P.<sup>3</sup>, Orekhov A.N.<sup>1,3</sup>, Sobenin I.A.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center, POB #21, Moscow, 121609, Russia

<sup>2</sup> — Moscow Institute of Physics and Technology, 141700, Moscow, Russia

<sup>3</sup> — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, 8, Baltiyskaya Str., 125315, Moscow, Russia

*An increase in the production of TNF as well as CCL-18 in atherosclerotic plaques compared with the unaffected human aortic intima was detected. However, atherogenic LDL decreased expression of pro-inflammatory cytokine TNF and increased anti-inflammatory modulation of macrophages, stimulate by modified LDL. The nature of this effect persisted when measuring the secretion of TNF and CCL-18, although the degree of severity of the effect was reduced. Balance of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines requires further study, as it determines the dynamics of atherosclerotic lesions.*

**Key words:** atherosclerosis, cytokines, macrophages, low density lipoprotein, inflammation