

УДК 616.13.002.2-004.6

<https://doi.org/10.17816/MAJ19089>

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ И МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА-17 В РАЗЛИЧНЫХ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЯХ У ЧЕЛОВЕКА

П.В. Пигаревский, В.А. Снегова, С.В. Мальцева, Н.Г. Давыдова

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

Для цитирования: Пигаревский П.В., Снегова В.А., Мальцева С.В., Давыдова Н.Г. Сравнительное иммуногистохимическое и морфометрическое исследование интерлейкина-17 в различных атеросклеротических поражениях у человека // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19. – № 4. – С. 109–113. <https://doi.org/10.17816/MAJ19089>

Поступила: 29.10.2019

Одобрена: 15.11.2019

Принята: 27.11.2019

Цель — исследовать клеточную и тканевую локализацию интерлейкина-17 (IL-17) в различных атеросклеротических поражениях артерий человека и на основании полученных данных выдвинуть гипотезу о возможной роли Т-хелпера 17 (Th17) клеток в дестабилизации атеросклеротической бляшки.

Материалы и методы. На аутопсийном материале с помощью гистологических, иммуногистохимических и морфометрических методов исследования были изучены сегменты аорты, коронарных артерий и *a. basilaris* с различными типами атеросклеротических поражений (43 образца ткани). В образцах ткани изучали эндотелиальные и мононуклеарные клетки, экспрессирующие IL-17.

Результаты. Показано, что эндотелиальные клетки интимы способны секретировать IL-17 во всех типах атеросклеротических поражений. Одновременно было выявлено увеличение числа мононуклеарных клеток, экспрессирующих IL-17, в интима артерий. Максимальное число клеток, экспрессирующих IL-17, наблюдалось в интима нестабильной атеросклеротической бляшки, особенно часто в районе разрыва ее покрышки, что может свидетельствовать о провоспалительном действии Th17-клеток и секретируемого ими IL-17 и о существенном влиянии их на формирование нестабильных атеросклеротических поражений.

Заключение. На основании полученных данных впервые удалось выдвинуть гипотезу о возможной роли Th17-клеток в дестабилизации атеросклеротической бляшки.

Ключевые слова: нестабильная атеросклеротическая бляшка; интерлейкин-17; эндотелиальные и мононуклеарные клетки.

COMPARATIVE IMMUNOHISTOCHEMICAL AND MORPHOMETRIC RESEARCH OF INTERLEUKIN-17 IN VARIOUS ATHEROSCLEROTIC LESIONS IN HUMAN

P.V. Pigarevsky, V.A. Snegova, S.V. Maltseva, N.G. Davydova

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

For citation: Pigarevsky PV, Snegova VA, Maltseva SV, Davydova NG. Comparative immunohistochemical and morphometric research of interleukin-17 in various atherosclerotic lesions in human. *Medical Academic Journal*. 2019;19(4):109-113. <https://doi.org/10.17816/MAJ19089>

Received: October 29, 2019

Revised: November 15, 2019

Accepted: November 27, 2019

The aim of the article — to investigate cellular and tissue localization of IL-17 in various atherosclerotic lesions of arteries of human and on the basis of the obtained data to make a hypothesis of a possible role of Th17 of cells in destabilization of an atherosclerotic plaque.

Material and methods. On autopsy material by means of histologic, immunohistochemical and morphometric research techniques aorta segments, the coronary arteries and *a. basilaris* with various types of atherosclerotic lesions (43 samples of tissue) were studied. In samples of tissue studied the endothelial and mononuclear cells expressing IL-17.

Results. It is shown that endothelial cells of an intima are capable to produce IL-17 in all types of atherosclerotic plaques. Increase in number of the mononuclear cells expressing IL-17 in an intima of arteries was at the same time revealed. It is shown that the maximum number of the cells expressing IL-17 was found in an intima of an unstable atherosclerotic plaque, it is especially frequent around a rupture of its cap. What can demonstrate pro-inflammatory action of Th17-cells and IL-17 expressed by them and significant effect them on formation of unstable atherosclerotic lesions.

Conclusion. On the basis of the obtained data for the first time it was succeeded to make a hypothesis of a possible role of Th-17 of cells in destabilization of an atherosclerotic plaque.

Keywords: unstable atherosclerotic plaque; interleukin-17; endothelial and mononuclear cells.

Список сокращений

IL-17 — интерлейкин-17; Th17 — Т-хелперы, продуцирующие интерлейкин-17.

Введение

Продуцирующие интерлейкин-17 (IL-17) Т-хелперы (Th17) — недавно открытая популяция лимфоцитов, играющая ключевую роль в развитии аутоиммунных заболеваний [1]. Многие исследователи обнаружили в сосудистой стенке IL-17A-продуцирующие клетки, накапливающиеся там в процессе развития атеросклероза [2, 3].

В настоящее время образование и развитие атеросклеротической бляшки связывают с экспрессией и активностью в сосудистой стенке провоспалительных маркеров [4]. Именно к таким маркерам и может относиться IL-17. Он обладает способностью активировать макрофаги, гладкомышечные и эндотелиальные клетки и ускорять образование атеросклеротической бляшки. Однако роль Th17-клеток и продуцируемого ими IL-17 в атерогенезе однозначно не определена [5].

В отдельных работах высказано предположение о возможной защитной роли IL-17 в патогенезе атеросклероза [6]. Например, в экспериментальной модели нокаут гена, кодирующего IL-17A (Il17a^{-/-}), у мышей *ApoE*^{-/-} приводит к увеличению продукции интерферона-гамма CD4⁺-Т-клетками (популяция Т-лимфоцитов-хелперов) в селезенке, тем самым способствуя развитию атеросклеротических бляшек [7].

В то же время многие исследования демонстрируют проатерогенную роль IL-17A. Так, нейтрализация IL-17A нокаутированием гена у мышей *ApoE*^{-/-} приводила к снижению экспрессии молекул клеточной адгезии VCAM-1, уменьшению инфильтрации иммунных клеток в сосудистую стенку, снижению секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов (IL-6, фактор некроза опухоли, хемокин-связывающий рецептор-5), что существенно подавляло прогрессирование заболевания [8]. В то же время введение рекомбинантного IL-17A, напротив, усиливало развитие атеросклероза [6, 9].

В исследованиях на мышинных моделях X. Tang (2019) показал, что концентрация IL-17 в крови у группы животных с нормальной сосудистой стенкой значительно снижена по сравнению с группами, имеющими нестабильные и стабильные атеросклеротические поражения [4]. Одновременно концентрация IL-17 в крови у мышей с нестабильными бляшками была значительно выше, чем в группе со стабильными атеросклеротическими поражениями. На основе этих данных было сделано предположение о возможном влиянии IL-17 на развитие и дестабилизацию атеросклеротической бляшки.

В настоящее время большинство исследований, посвященных выяснению роли Th17-клеток и продуцируемому ими IL-17 в атерогенезе, выполнено на экспериментальных моделях.

Цель нашего иммуногистохимического и морфометрического исследования заключалась в установлении клеточной и тканевой локализации IL-17 в различных атеросклеротических поражениях артерий человека и на основании полученных данных формулировании гипотезы о возможной роли Th17-клеток в дестабилизации атеросклеротической бляшки.

Материал и методы

Объектом исследования стал материал 9 аутопсий, полученных от мужчин (средний возраст — 60 ± 8 лет), умерших от острой сердечно-сосудистой недостаточности атеросклеротической этиологии. Непременным условием для отбора материала являлось отсутствие тяжелых сопутствующих заболеваний, способных воздействовать на иммунологическую реактивность.

Исследованию были подвергнуты сегменты аорты (из района дуги, грудного и брюшного отделов), коронарные артерии и *a. basilaris*, всего 43 образца ткани.

Иссеченные кусочки фиксировали в 4 % забуференном параформальдегиде. Иммуноморфологическое и микроскопическое исследование проводили на парафиновых и криостатных срезах толщиной 4–6 мкм. На первом этапе работы с помощью традиционных гистологических методов и окраски препаратов Oil Red O верифицировали типы атеросклеротических поражений с целью отбора нестабильных, обладающих признаками прогрессирующего роста бляшек. Иммуногистохимическое исследование IL-17 в парафиновых срезах проводили по стандартной методике с использованием моноклональных антител к IL-17 (50 мкг/мл, R&D Systems) в сочетании с высокочувствительным двухступенчатым стрептавидин-биотинным методом (R&D Systems, Cell & Tissue Staining Kit, HRP-DAB System).

Полученные препараты исследовали в световом микроскопе Leica DM 2500. Микрофотографии получали с использованием цифровой фотокамеры Leica DFC 420 и компьютерной программы Leica Application Suite Version 3.4.0.

Морфометрический анализ эндотелиальных и мононуклеарных клеток, экспрессирующих IL-17, осуществляли в следующих зонах сосудистой стенки: в интима нормальных участков артерий, в зонах интимы под липидным

пятном, в фиброзной покрышке нестабильных и стабильных бляшек, а также в участках адвентиции, подлежащих под соответствующими атеросклеротическими поражениями. В каждой изучаемой зоне численность клеток определяли в 10 полях зрения. Подсчеты производили без морфометрической сетки при увеличении $\times 600$ под микроскопом Olympus CX41 (Япония). Статистический анализ полученных данных выполняли при помощи компьютерной программы Statistica Version 10. Значимость различий между изучаемыми выборками определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Нами впервые был осуществлен иммуногистохимический и морфометрический анализ эндотелиальных и мононуклеарных клеток, экспрессирующих IL-17, в интима и адвентиции артерий на разных стадиях формирования нестабильных атеросклеротических поражений (рис. 1). Известно, что при атеросклерозе IL-17 активирует эндотелиальные клетки интимы, способствует воспалению, апоптозу, коагуляции и тромбозу. Однако наши исследования показали, что клетки эндотелия в интима сосудистой стенки сами способны активно

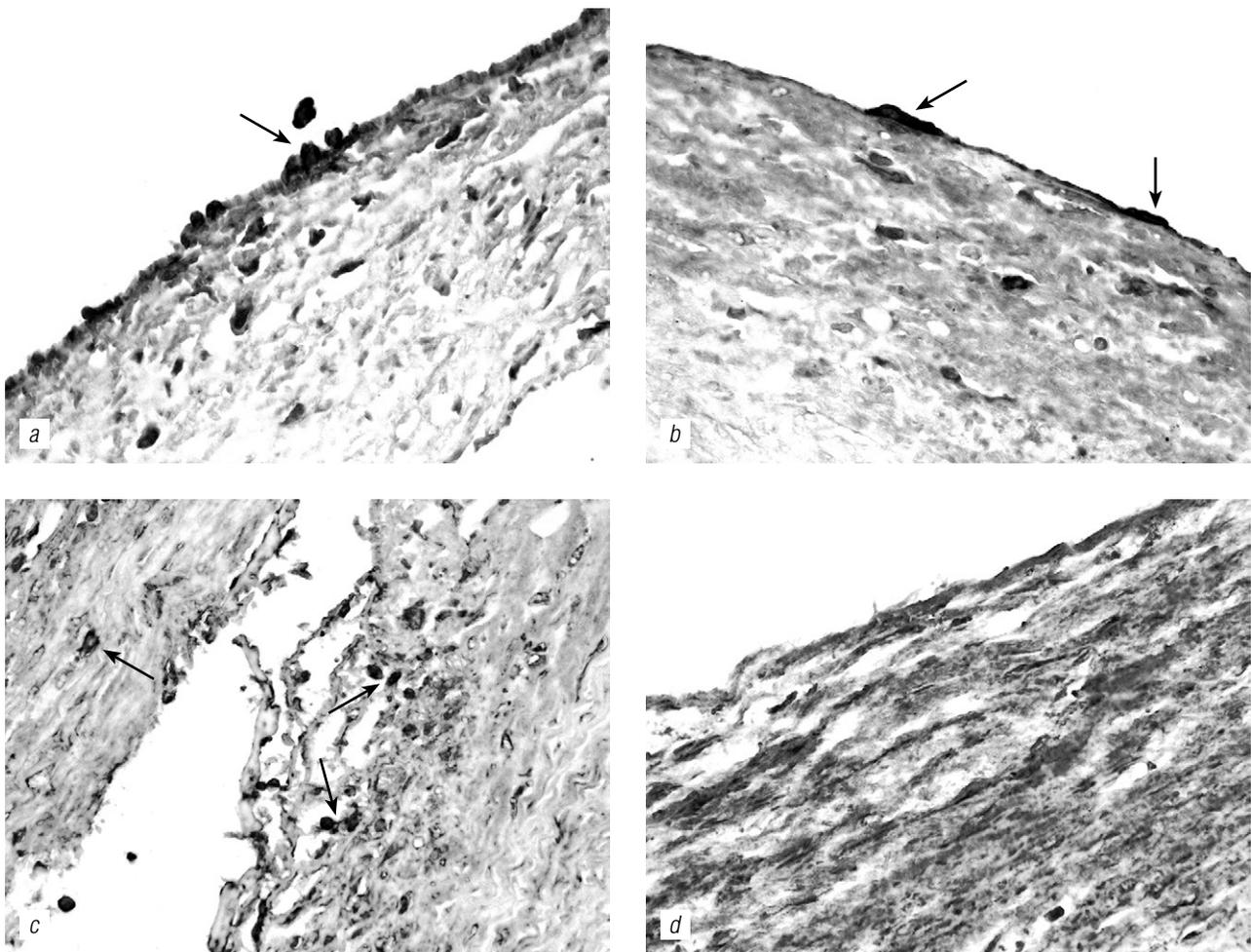


Рис. 1. Экспрессия интерлейкина-17 (IL-17) в атеросклеротических поражениях аорты человека. Иммуногистохимическое окрашивание с использованием моноклональных антител к IL-17: *a* — адгезия мононуклеарных клеток, экспрессирующих IL-17 (*стрелка*) на эндотелии интимы нестабильной бляшки в коронарной артерии; *b* — экспрессия IL-17 в цитоплазме эндотелиальных клеток (*стрелки*), покрывающих молодую липидно-фиброзную бляшку в аорте; *c* — мононуклеарные клетки, экспрессирующие IL-17 (*стрелки*), в районе разрыва покрышки нестабильной атеросклеротической бляшки; *d* — отсутствие IL-17 в интима стабильной атеросклеротической бляшки. *a, b* — $\times 630$, *c, d* — $\times 350$

Fig. 1. Expression of IL-17 in atherosclerotic damages of an aorta of human. Immunohistochemical staining with use of monoclonal antibodies to IL-17: *a* — adhesion of the mononuclear cells expressing IL-17 (*arrow*) on an endothelium of an intima of an unstable plaque in a coronary artery; *b* — IL-17 expression in cytoplasm of the endothelial cells (*arrows*) covering a young lipid-fibrous plaque in an aorta; *c* — the mononuclear cells expressing IL-17 (*arrows*) around a rupture of a cap of an unstable atherosclerotic plaque; *d* — lack of IL-17 in an intima of a stable atherosclerotic plaque. *a, b* — $\times 630$, *c, d* — $\times 350$

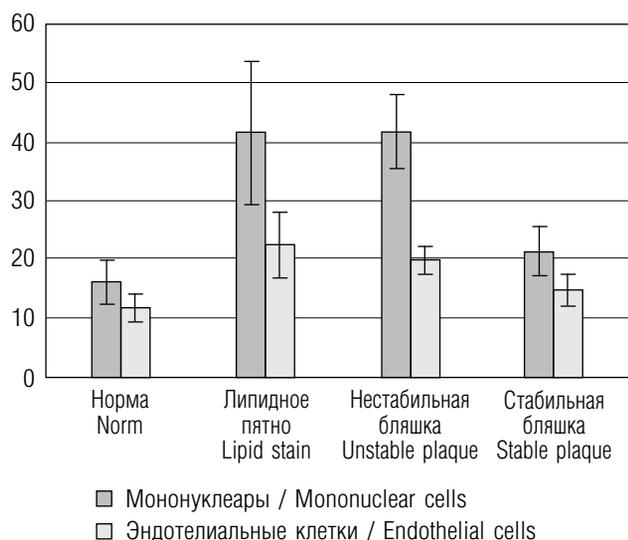


Рис. 2. Содержание эндотелиальных и мононуклеарных клеток в интиме артерий, экспрессирующих интерлейкин-17, в норме и в различных типах атеросклеротических поражений интимы артерий. По оси ординат обозначено количественное содержание клеток с интерлейкином-17 в десяти полях зрения микроскопа

Fig. 2. The quantitative maintenance of endothelial and mononuclear cells expressing IL-17 in normal also in various types of atherosclerotic lesions of an intima of arteries. On an axis of ordinates the quantitative maintenance of cells with IL-17 in 10 fields of microscope is designated

секретировать IL-17 при формировании атеросклеротической бляшки (рис. 1, *b*). При этом часто наблюдается адгезия мононуклеарных клеток — моноцитов и лимфоцитов, также экспрессирующих IL-17, на эндотелиальных клетках, выстилающих поверхность нестабильной атеросклеротической бляшки (рис. 1, *a*). Это может свидетельствовать об активном проникновении иммунновоспалительных Th17-клеток в интиму артерий при формировании нестабильных поражений. По мере прогрессирования процесса в выраженных нестабильных атеросклеротических бляшках, и прежде всего в районах максимальной деструкции их интимы и разрыва их покрышки, накапливаются многочисленные мононуклеарные клетки, экспрессирующие IL-17 (рис. 1, *c*). В то же время в интиме нормальных участков артерий и в стабильных атеросклеротических поражениях клетки, экспрессирующие IL-17, либо выявлены в незначительном количестве, либо отсутствовали совсем (рис. 1, *d*).

При сравнительном морфометрическом анализе этих же артерий человека максимальное число эндотелиальных клеток, экспрессирующих IL-17, было выявлено на начальной стадии поражения. Так, их количество в липидном пятне оказалось выше в 1,8 раза по

сравнению с нормой, в 1,5 раза по сравнению со стабильной бляшкой. Число эндотелиальных клеток, экспрессирующих IL-17, также возрастает в нестабильной атеросклеротической бляшке — в 1,7 раза по сравнению с нормой и в 1,3 раза по сравнению со стабильным поражением (рис. 2).

Одновременно с эндотелиальными клетками существенно увеличено количество мононуклеарных клеток, экспрессирующих IL-17, в интиме липидного пятна и в нестабильной атеросклеротической бляшке — в 2,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с нормальными участками сосудистой стенки. В интиме стабильного атеросклеротического поражения, напротив, количество мононуклеаров с IL-17 снижено в 1,9 раза по сравнению с липидным пятном и нестабильной бляшкой (см. рис. 2).

Таким образом, при иммуногистохимическом и морфометрическом исследовании было показано, что эндотелиальные клетки интимы способны секретировать IL-17 во всех типах атеросклеротических поражений. Одновременно было выявлено увеличение числа мононуклеарных клеток, экспрессирующих IL-17, в интиме артерий. Максимальное число клеток, экспрессирующих IL-17, наблюдалось в интиме нестабильной атеросклеротической бляшки, особенно часто в районе разрыва ее покрышки, что может свидетельствовать о провоспалительном действии Th17-клеток и секретированного ими IL-17 и о существенном влиянии их на формирование нестабильных атеросклеротических поражений. Интерлейкин-17 можно отнести к семейству провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкины-6, -18, интерферон-гамма и фактор некроза опухоли, которые оказывают выраженное проатерогенное действие [10].

Важно, что полученные результаты полностью коррелируют с данными X. Tang (2019), который продемонстрировал исключительную роль Th17-клеток и продуцируемого ими сывороточного IL-17 в формировании нестабильных атеросклеротических поражений [4]. Однако все его исследования выполнены на экспериментальных мышинных моделях, в то время как нам впервые удалось выявить возможную роль IL-17 в дестабилизации атеросклеротической бляшки у человека.

Заключение

С помощью гистологических, иммуногистохимических и морфометрических методов исследования удалось установить, что эндотелиальные клетки интимы способны секретировать IL-17 во всех типах атероскле-

ротических поражений. Одновременно было выявлено увеличение числа мононуклеарных клеток, экспрессирующих IL-17, в интима артерий. Показано, что максимальное число клеток, экспрессирующих IL-17, обнаружено в интима нестабильной атеросклеротической бляшки, особенно в районе разрыва ее покрышки, что может свидетельствовать о провоспалительном действии Th17-клеток, секретлируемого ими IL-17 и их роли в образовании нестабильных атеросклеротических поражений. Сформулирована гипотеза о возможной роли Th17-клеток в дестабилизации атеросклеротической бляшки у человека.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. — СПб.: Фолиант, 2018. — 510 с. [Simbirtsev AS. Tsitokiny v patogeneze i lechenii zabolevaniy cheloveka. Saint Petersburg: Foliant; 2018. 510 p. (In Russ.)]
- Xie JJ, Wang J, Tang TT, et al. The Th17/Treg functional imbalance during atherogenesis in ApoE(-/-) mice. *Cytokine*. 2010;49(2):185-193. <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2009.09.007>.
- Ma T, Gao Q, Zhu F, et al. Th17 cells and IL-17 are involved in the disruption of vulnerable plaques triggered by short-term combination stimulation in apolipoprotein E-knockout mice. *Cell Mol Immunol*. 2013;10(4):338-348. <https://doi.org/10.1038/cmi.2013.4>.
- Tang X. Analysis of interleukin-17 and interleukin-18 levels in animal models of atherosclerosis. *Exp Ther Med*. 2019;18(1):517-522. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7634>.
- Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. Interleukin-17: friend or foe in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol*. 2010;21(5):404-408. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32833dc7f9>.
- Gao Q, Jiang Y, Ma T, et al. A critical function of Th17 proinflammatory cells in the development of atherosclerotic plaque in mice. *J Immunol*. 2010;185(10):5820-5827. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000116>.
- Madhur MS, Funt SA, Li L, et al. Role of interleukin 17 in inflammation, atherosclerosis, and vascular function in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(7):1565-1572. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.227629>.
- Erbel C, Chen L, Bea F, et al. Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice. *J Immunol*. 2009;183(12):8167-8175. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901126>.
- Fatkhullina AR, Peshkova IO, Koltsova EK. The role of cytokines in the development of atherosclerosis. *Biokhimiya*. 2016;81(11):1358-1370. <https://doi.org/10.1134/S0006297916110134>.
- Пигаревский П.В. Атеросклероз. Нестабильная атеросклеротическая бляшка (иммуноморфологическое исследование): атлас. — СПб.: СпецЛит, 2018. — 148 с. [Pigarevskiy PV. Ateroskleroz. Nestabil'naya ateroskleroticheskaya blyashka (immunomorfologicheskoe issledovanie): atlas. Saint Petersburg: SpetsLit; 2018. 148 p. (In Russ.)]

Сведения об авторах / Information about the authors

Петр Валерьевич Пигаревский — д-р биол. наук, заведующий отделом общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-5906-6771>. SPIN-код: 8636-4271. E-mail: pigarevsky@mail.ru.

Влада Андреевна Снегова — научный сотрудник отдела общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-9925-2886>. SPIN-код: 8088-4446. E-mail: biolaber@inbox.ru.

Светлана Владимировна Мальцева — канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. SPIN-код: 8367-9096. E-mail: moon25@rambler.ru.

Наталья Геннадьевна Давыдова — канд. мед. наук, старший научный сотрудник отдела общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. SPIN-код: 4761-3575.

Peter V. Pigarevsky — PhD (Biology), Head, Department of General Morphology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-5906-6771>. SPIN-code: 8636-4271. E-mail: pigarevsky@mail.ru.

Vlada A. Snegova — Researcher Associate, Department of General Morphology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-9925-2886>. SPIN-code: 8088-4446. E-mail: biolaber@inbox.ru.

Svetlana V. Maltseva — PhD (Biology), Researcher Associate, Department of General Morphology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. SPIN-code: 8367-9096. E-mail: moon25@rambler.ru.

Natalya G. Davydova — PhD (Medicine), Researcher Associate, Department of General Morphology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. SPIN-code: 4761-3575.

✉ Контактное лицо / Corresponding author

Петр Валерьевич Пигаревский / Peter V. Pigarevsky
E-mail: pigarevsky@mail.ru