

## Модификация иммунного ответа при атеросклерозе

Н. В. Акулич, А. И. Тепляков, Е. В. Прищепова, Т. И. Чегерова\*, Н. Г. Кручинский

Могилевский государственный университет им. А. А. Кулешова,

Белорусско–российский университет\*; г. Могилев, Беларусь

## Modification of Immune Response During Atherosclerosis

N. V. Akulich, A. I. Tsiepliakov, E. V. Prischepova, T. I. Chegerova\*, N. G. Kruchinski

Mogilev State University of A. A. Kuleshov,

Russian-Belorussian University\*, Mogilev, Belarus

### Аннотация

Проведена оценка морфо–функционального состояния хроматина ядер лимфоцитов у пациентов с атеросклерозом. Предмет исследования — хроматин лимфоцитов, объект исследования — больные ИБС и ИБМ. Структурно–функциональное состояние иммунокомпетентных клеток оценивалось методом компьютерной морфоденситометрии. У пациентов с атеросклерозом отмечено снижение дисперсности (числа гранул) гетерохроматина и эухроматина. При атеросклерозе имеет место модификация структурно–функциональных характеристик лимфоцитов, поскольку PDGF оказал различное влияние на морфоденситометрические параметры лимфоцитов у пациентов с атеросклерозом и у пациентов без видимых признаков этой патологии.

### Ключевые слова

Морфоденситометрия, хроматин, лимфоциты, атеросклероз.

Реакция иммунной системы осуществляется на основании имеющихся адресных защитных программ, но не исключена вероятность того, что они могут быть изменены, поскольку существует иммунологическая память и повторные ответы на один и тот же патоген отличаются от начальных.

В патогенезе атеросклероза ведущую роль играют форменные элементы крови, прежде всего, лейкоциты. Показано, что в местах воспаления происходит активация интегринов хемокинами, что является ключевым фактором для интегрин–опосредованной адгезии, когда сигнал передается в лейкоцит [1, 2]. При этом функционально неактивный интегрин переходит в активную адгезивную конфигурацию. Молекулы клеточ-

### Summary

Purpose: estimate a structurally functional state of a chromatin of nucleus of lymphocytes at patients with an atherosclerosis. The method of morphodensitometry gives the possibility to study cytological objects on a new quality level. Analysis of a chromatin at patients with an atherosclerosis in comparison with control group has shown, that nucleus of lymphocytes at patients with an atherosclerosis have smaller perimeter and absorbency. Differences are found in patients of the basic group in heterochromatin areas of nucleus of lymphocytes in comparison with control group: decrease of dispersity granular components, but augmentation of its contrast; decrease of the general area and perimeter of perigranular zone than at healthy people. Change of the parameters describing a state of perigranular zone, is a marker of structurally functional rearrangements of a chromatin of the lymphocytes connected to an atherosclerosis. During atherosclerosis are modifications of immune response.

### Keywords

Morphodensitometry, chromatin, lymphocytes, atherosclerosis.

ной адгезии (МКА) — Р- и Е-селектины, обладая хемоаттрактантным эффектом, обеспечивают роллинг лейкоцитов вдоль эндотелиального слоя к сайту активации и первичную (обратимую) адгезию к эндотелию и адгезию лейкоцитов к поврежденному участку, которая носит необратимый характер (активация лейкоцитов с экспрессией на их поверхности VCAM–1 и LFA–1–ICAM–1) [3–6].

Такие взаимодействия определяют секреторный потенциал адгезировавших клеток, их агрегацию, трансмиграцию и экстравазацию нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов/макрофагов в субэндотелиальное пространство [7]. Так, при секреции содержимого лизосомальных гранул нейтрофильных гра-

нулоцитов высвобождаются нейтрофильная эластаза, катепсин G, миелопероксидаза и, вероятно, перекись водорода [8]. Адгезия и агрегация тромбоцитов сопровождается секрецией тромбоцитарного фактора роста (PDGF). На следующем этапе происходит Т-клеточная активация.

Если на стандартное воздействие в основной и контрольной группах обследуемых будет получена различная реакция, то можно говорить как минимум о разной реактивности и как максимум о разном фенотипе изучаемых объектов. Результаты исследования должны ответить и на более частный вопрос, в какой мере функциональная активность изучаемых объектов зависит от концентрации и времени экспозиции?

Морфоденситометрические показатели, описывающие структуру интерфазного хроматина клеток, позволяют оценить морфофункциональное состояние эпигенома в ядре единичных клеток [9]. Кроме того, с помощью данной методики можно установить маркеры различных патологических состояний. Все вышеизложенное и определило нашу задачу: оценить структурно-функциональное состояние интерфазного хроматина ядер лимфоцитов у пациентов с атеросклерозом при инкубации крови с PDGF по сравнению с контрольной группой.

В качестве предмета исследования нами был выбран хроматин лимфоцитов (как наиболее реактивных клеток), а в качестве объекта — практически здоровые добровольцы и больные ИБС и ИБМ.

### Материал и методы

Основная группа сформирована из 23 пациентов с основными нозологическими формами (ишемическая болезнь сердца и головного мозга) атеросклеротического поражения артерий (репрезентативна по полу). Контрольная группа состояла из 10 практически здоровых мужчин 25–30 лет, проживающих в г. Могилеве.

Структурно-функциональное состояние иммунокомпетентных клеток (ИКК) оценивалось методом компьютерной морфоденситометрии (КМДМ) [9]. Исследовались ядра лимфоцитов в стандартных мазках на предметных стеклах, обработанных рибонуклеазой в растворе сахарозы и окрашенных галлоцианин-хромовыми квасцами и заключенных в *Canadian balsam*. Видеотехнология КМДМ реализована на аппаратно-программном комплексе «ДиаМорф» (фирма «ДиаМорф», Москва) [10]. Алгоритм технологии включал в себя создание изображения выбранных ядер, которые компоновались в видеоархивы с сохранением последних в памяти компьютера. Далее изображения ядер подвергались процессу улучшения изображения, и затем проводился их анализ с микроанатомированием ядра на компоненты и измерением заданного комплекса параметров.

Постулируется [10], что хроматин подразделяется на 4 компоненты. Две из них относятся к тому, что обычно называется конденсированным (гетерохроматином); и две — к деконденсированному (эухроматину). Наиболее темная, гранулярная, ком-

понента гетерохроматина обозначена q1; светлая, так называемая перигранулярная зона — q2. Наиболее светлая компонента эухроматина — q4, и соответственно промежуточная между q2 и q4 — компонента q3 (не измеряется, т.к. практически не несет в себе значимой информации).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с применением методов непараметрической статистики: критерий знаков, критерий U Манна-Уитни.

### Результаты и их обсуждение

Сравнительный анализ исходного состояния хроматина у пациентов с атеросклерозом с контрольной группой показал, что ядра лимфоцитов в основной группе имеют значимо меньший периметр и интегральную оптическую плотность.

У пациентов основной группы в гетерохроматиновых областях ядер лимфоцитов обнаружены следующие различия по сравнению с контрольной группой:

1. снижение дисперсности и повышение контрастности гранулярной компоненты q1, в сравнении с контрольной группой;
2. снижение суммарной площади и периметра перигранулярной зоны q2, ее изрезанность в 4.5 раза больше, чем у здоровых лиц.

Эухроматиновые области ядер лимфоцитов различаются незначительно в группах сравнения. Так, дисперсность компоненты q4 у пациентов достоверно ниже, чем в контроле. Остальные параметры хроматина в обеих группах статистически значимо не различаются. Таким образом, основными различиями между группами являются снижение дисперсности (числа гранул) гетерохроматина (q1) и эухроматина (q4).

Изменение параметров, характеризующих состояние перигранулярной зоны (q2), возможно является следствием структурно-функциональных перестроек хроматина лимфоцитов у пациентов с атеросклерозом.

### Влияние тромбоцитарного фактора роста на хроматин ядер лимфоцитов

Согласно разработанной нами схеме эксперимента изучался эпигеном лимфоцитов при воздействии тромбоцитарного фактора роста в концентрациях 0.5, 5.0 и 10.0 нг/мл в трех временных интервалах 30, 60, 360 минут.

В опыте с наименьшей концентрацией цитокина (0.5 нг/мл) не было выявлено достоверных изменений ИХ ядер клеток во всех временных точках.

После получасовой инкубации с PDGF в 10-кратной концентрации (5.0 нг/мл) параметры ядра изменились. Увеличились его размеры ( $p=0.037$ ), и снизилась изрезанность ядер ( $p=0.036$ ). Отмечено достоверное увеличение суммарной площади перигранулярной компоненты q2 ( $p=0.023$ ).

Статистически значимых изменений параметров при более длительной инкубации (60 мин) с данной концентрацией PDGF не обнаружено. После 6-часовой

инкубации по сравнению с исходным состоянием достоверно изменилась лишь контрастность хроматина  $q4$ , которая выросла в 1.2 раза ( $p=0.032$ ). Также не обнаружено каких либо изменений при воздействии PDGF в концентрации 10.0 нг/мл (после 30 мин инкубации). Более длительное воздействие (60 мин) вызвало снижение оптической плотности хроматина в отдельных компонентах ядра и ядре в целом, достоверно изменились площадь  $q2$  ( $p=0.047$ ) и  $q4$  ( $p=0.029$ ).

Наиболее выраженный ответ лимфоцитов вызвала 6-часовая инкубация с PDGF в концентрации 10.0 нг/мл. В данной временной точке достоверно увеличились показатели контрастности всех компонент и ядра в целом.

После проведения анализа параметров хроматина в аналогичном опыте у контрольной группы было выявлено, что ответ лимфоцитов этой группы на воздействие PDGF значительно отличается от такового у пациентов с атеросклерозом. Так после 30 мин инкубации с PDGF (0.5 нг/мл) в контрольной группе оптические параметры остались неизменными; лишь доля перигранулярной компоненты в ядре увеличилась с  $0.33\pm 0.0065$  до  $0.288\pm 0.005$  ( $p=0.04$ ).

Наиболее выраженный ответ клеток на воздействие был зарегистрирован при воздействии PDGF в концентрации 5.0 нг/мл. Причем при инкубации в течение 60 минут не отмечено достоверных изменений параметров. В то же время кратковременное (30 минут) и длительное (360 минут) воздействия данного цитокина на пробы цельной крови группы здоровых людей вызвали статистически достоверные перестройки интерфазного хроматина. Следует отметить, что в опытной группе подобных изменений не обнаружено.

Следовательно, после получасовой инкубации PDGF в отличие от пациентов с атеросклерозом, в контрольной группе наблюдались значительные перестройки как ядра в целом, так и в гетеро- и эухроматиновых областях. Прежде всего, в 1.6 раза снизилось отношение гетерохроматина к эухроматину ( $p=0.019$ ). Изменились параметры ядра: увеличились (площадь ( $p=0.018$ ), периметр ( $p=0.03$ )), снизилась их изрезанность ( $p=0.027$ ), контрастность хроматина достоверно снизилась ( $p=0.036$ ), как и оптическая плотность всего ядра ( $p=0.007$ ).

Таким образом, выявлена активация хроматина с перестройками в гетеро- и эухроматиновых областях ядра в контрольной группе после 30-минутного воздействия PDGF в концентрации 5.0 нг/мл.

При 6 часовой инкубации при той же концентрации зарегистрированы обратные изменения хроматина ядер лимфоцитов. Показатель соотношения гетеро- и эухроматина вырос в 1.6 раза с  $0.918\pm 0.078$  до  $1.43\pm 0.08$ . Ядра лимфоцитов уменьшились ( $p=0.013$ ), их изрезанность выросла в 1.8 раза ( $p=0.015$ ). Оптические показатели изменились обратно таковым при 30 мин. Оптические плотности компоненты и ядер в целом достоверно выросли.

Таким образом, после 6 часов инкубации в интерфазном хроматине ядер здоровых людей, в отличие от опытной группы, происходит снижение биосинтети-

ческой активности, клетки приближаются к состоянию покоя. В опыте с высокой концентрацией цитокина PDGF (10.0 нг/мл) в группе контроля не было обнаружено значительных изменений структурно-функционального состояния хроматина. Так же, как и в опытной группе, при 30- и 60-минутной инкубации в концентрации 10.0 нг/мл в контрольной группе не было зарегистрировано статистически значимых изменений параметров хроматина.

Лишь после 360 минут воздействия PDGF, как и в группе пациентов, увеличились площадь ( $p=0.023$ ) и периметр ( $p=0.029$ ) гранулярной компоненты, площадь  $q2$  снизилась ( $p=0.03$ ).

В опыте с воздействием PDGF в количестве 5.0 нг/мл различия в ответе у здоровых и больных атеросклерозом людей обнаружены после 6 часов воздействия цитокина на клетки крови. В самой компактной компоненте  $q1$  в опытной группе повышается дисперсность, увеличиваются площадь, периметр и оптическая плотность. А в контрольной группе, напротив, дисперсность резко снижается, площадь  $q1$  растет, периметр, оптическая плотность и контрастность хроматина увеличиваются. В компоненте  $q2$  (опытная группа) снижается площадь, но увеличивается периметр, растет оптическая плотность. В контрольной группе площадь и периметр  $q2$  снижаются, а оптическая плотность возрастает. В  $q4$  контрольной группы снижается общий периметр компоненты, и увеличивается оптическая плотность  $q4$ . В опытной группе, напротив, увеличивается периметр, а оптическая плотность снижается.

Анализ изменений параметров хроматина показал, что воздействие PDGF в концентрации 10.0 нг/мл в течение 30 мин и 360 мин вызвало в группах сравнения однонаправленный ответ клеток. Однако инкубация в течение часа привела к различным изменениям в хроматине лимфоцитов.

В контрольной группе в гетерохроматиновых областях ядер произошло снижение активности, наиболее отчетливо проявившееся в гранулярной компоненте. Увеличились доля, оптическая плотность, контрастность гранул  $q4$ . Также увеличилась оптическая плотность  $q2$ . В опытной группе подобных изменений не наблюдается, напротив, отмечена тенденция к повышению активационных процессов.

Изменения параметров, характеризующих состояние эухроматина и ядра в целом, свидетельствуют о достоверных разнонаправленных изменениях параметров гетерохроматиновых компонент  $q1$  и  $q2$  в контрольной и опытной группах при заданных параметрах инкубации и концентрации PDGF.

В эухроматиновых областях опытной группы наблюдается тенденция к активации, в то время как в контрольной группе биосинтетическая активность снижается, и, видимо, клетки приближаются к состоянию покоя.

### Заключение

Полученные данные показали, что влияние PDGF по-разному влияет на морфоденситометрические парамет-

ры лимфоцитов у пациентов с атеросклерозом и у контрольной группы. Это можно расценить как пермиссивный эффект, обусловленный разным функциональным

состоянием иммунокомпетентных клеток. Следовательно, при атеросклерозе имеет место модификация структурно-функциональных характеристик лимфоцитов.

## Литература

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for 1990s. *Nature*, 1993; 362: 801–809
2. Cell Adhesion Molecules. *Fundamental Facts*/edit by Wilson G.A. R&D Systems, 1996; 82.
3. O'Brien, K., Allen M., McDonald T. et al. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques: implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest*, 1993; 92: 945–951.
4. Vora D.K., Fasng Z.T., Liva S.N. et al. Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins: separate effects on a synthesis and surface expression. *Circ Res*, 1997; 80: 810–818.
5. Dong Z.M., Chapman S.M., Brown A.A. et al. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*, 1998; 102: 145–152.
6. Tanaka Y., Chemokines in health and diseases. *Clin. Exp. Immunol*, 2002; 127 (1): 183–189.
7. Gimbrone M. Endothelial dysfunction, haemodynamic forces and atherosclerosis. *Thromb. Haemost*, 1999; 82: 722–727.
8. Rajavasdhisth T., Yamada H., Mishra N. Transcriptional activation of the MCSF gene by minimally modified LDL: involvement of NFkB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995; 15: 1591–1598.
9. Бутусова Н.Н., Жукоцкий А.В., Коган Э.М. Опыт применения телевизионных анализаторов изображения в цитологических и иммуноморфологических исследованиях. *Биофизические методы исследования: Сб. науч. трудов*, М. 1990, 133–165
10. Жукоцкий А.В. Компьютерная телевизионная морфоденситометрия нормальных и патологических структур клеток и тканей: Дис.... д-ра мед. наук: М., 1992, 496.