

ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.127-005.8

СТАБИЛИН-1-ПОЗИТИВНЫЕ МАКРОФАГИ В МИОКАРДЕ ПАЦИЕНТОВ С ФАТАЛЬНЫМ ИСХОДОМ ИНФАРКТА МИОКАРДА

А.Э. Гомбожапова^{1,2}, Ю.В. Роговская^{1,2}, М.С. Ребенкова¹, В.С. Шурупов¹, Ю.Г. Кжышковская², В.В. Рябов^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт кардиологии", Томск

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Национальный исследовательский Томский государственный университет"

E-mail: gombozhapova@gmail.com

MYOCARDIAL STABILIN-1-POSITIVE MACROPHAGES IN PATIENTS WITH FATAL MYOCARDIAL INFARCTION

A.E. Gombozhapova^{1,2}, Yu.V. Rogovskaya^{1,2}, M.S. Rebenkova¹, V.S. Shurupov¹, Yu. G. Kzhyshkowska², V.V. Ryabov^{1,2}

¹Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Cardiology", Tomsk

²National Research Tomsk State University

Ремоделирование сердца и развивающаяся вследствие этого сердечная недостаточность по-прежнему является одной из основных причин смертности больных, перенесших инфаркт миокарда. Необходимость углубления знаний о том, какие же факторы приводят к различным исходам инфаркта миокарда, привело к смещению акцента исследований в сторону изучения процессов воспаления как клеточно-молекулярной основы постинфарктного ремоделирования. В последние годы предметом научного интереса стали клетки иммунной системы (макрофаги) как в здоровых тканях, так и при патологических состояниях. Выделяют две субпопуляции макрофагов: воспалительные M1 макрофаги и M2 макрофаги, выполняющие адаптивную, регенераторную, противовоспалительную функции. Одним из маркеров M2 макрофагов является сквенджер-рецептор стабиллин-1. M2 макрофаги, экспрессируя стабиллин-1, принимают участие в процессе деградации ацетилированных липопротеинов низкой плотности и гликопротеина SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine), являющегося универсальным регулятором процессов репарации, ангиогенеза и тканевого ремоделирования. Цель настоящей работы: показать наличие/отсутствие стабиллин-1-позитивных макрофагов в миокарде пациентов с фатальным исходом инфаркта миокарда при помощи иммуногистохимического анализа. Полученные данные, подтверждающие наличие стабиллин-1-позитивных M2 макрофагов, позволяют продолжить дальнейшие исследования по определению молекулярного профиля и функции этих клеток в процессах развития неблагоприятного ремоделирования сердца.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, макрофаг, иммуногистохимия, сквенджер-рецептор, стабиллин-1.

Cardiac remodeling following myocardial infarction leads to impaired ventricular function and heart failure which remain a major cause of mortality and morbidity. The need to extend our knowledge about what factors lead to different outcomes of myocardial infarction has led to a research of immuno-inflammatory pathways and molecular activities as the basis of post-infarction remodeling. Recently, macrophages, cells of the immune system, became a subject of scientific interest both under normal and pathological conditions. There are two subpopulations of macrophages: inflammatory M1 macrophages and M2 macrophages, which perform adaptive, regenerative, and anti-inflammatory function. One of the M2 macrophage biomarkers is scavenger receptor stabilin-1. M2 macrophages, expressing stabilin-1, mediate degradation of acetylated low-density lipoproteins and glycoprotein SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine), a universal regulator of wound healing, angiogenesis and tissue remodeling. The aim of this study was to show the presence/absence of myocardial stabilin-1-positive macrophages in patients with fatal myocardial infarction by means of immunohistochemistry. Data confirming the presence of stabilin-1-positive macrophages M2 allow for continuing further studies to identify the molecular profile and function of these cells in the development of adverse cardiac remodeling.

Key words: myocardial infarction, macrophage, immunohistochemistry, scavenger receptor, stabilin-1.

Введение

Последние данные свидетельствуют о том, что современные методики инвазивного и медикаментозного лечения полностью реализовали свой потенциал по ограничению размера некроза, снижению смертности и улучшению функции миокарда у больных во время и после инфаркта миокарда [1–3]. Ремоделирование сердца и развивающаяся вследствие этого сердечная недостаточность по-прежнему является одной из основных причин смертности больных, перенесших инфаркт миокарда [4, 5]. Необходимость углубления знаний о том, какие же факторы приводят к различным исходам инфаркта миокарда, привело к смещению акцента исследований в сторону изучения процессов воспаления как клеточно-молекулярной основы постинфарктного ремоделирования [6].

Механизм развития неблагоприятного ремоделирования сердца до сих пор остается во многом не ясным. В последние годы предметом научного интереса стали клетки иммунной системы (макрофаги) как в здоровых тканях, так и при различных патологических состояниях [7]. Первыми были открыты макрофаги, участвующие в процессах воспаления – так называемые воспалительные M1 или классически активируемые макрофаги. Далее были установлены новые функции этих клеток: противовоспалительная, адаптивная, регенераторная. Макрофаги, которые выполняют эти функции, получили название M2 или альтернативно активируемых макрофагов. Продемонстрирован противовоспалительный фенотип M2 макрофагов, экспрессирующий на своей поверхности такие маркеры, как макрофагальный маннозный рецептор C тип 1 или CD206, скавенджер-рецепторы – CD163 и стабиллин-1 [7, 8].

Мультифункциональный скавенджер-рецептор стабиллин-1 был впервые идентифицирован как MS-1 антиген, экспрессированный на поверхности синусоидальных эндотелиальных клеток селезенки человека [9]. Дальнейшие исследования показали наличие экспрессии стабиллина-1 на поверхности тканевых макрофагов при хроническом течении воспаления и туморогенезе [9]. M2 макрофаги, экспрессируя стабиллин-1, принимают участие в процессе деградации ацетилированных липопротеинов низкой плотности и гликопротеина SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine), являющегося универсальным регулятором процессов репарации, ангиогенеза и тканевого ремоделирования [9, 10].

В последние десять лет роль активно изучалась роль стабиллина-1 в патогенезе злокачественных новообразований. В одном из недавних исследований, проведенных на мышах, получены данные о наличии этого маркера макрофагов на начальных стадиях развития глиомы и уменьшении его экспрессии по мере прогрессирования заболевания. Таким образом, было предположено, что изменение выраженности экспрессии стабиллина-1 может помочь в оценке опухолевого роста [8]. В другом исследовании стабиллин-1 рассматривался как новая иммуносупрессивная молекула, предполагалось, что моноциты кровяного русла с выраженной экспрессией стабиллина-1 могут подавлять провоспалительные реакции *in vivo* [10].

Таким образом, моноциты/макрофаги являются клю-

чевыми участниками воспалительной реакции, секретируют про- и противовоспалительные факторы, фагоцитируют погибшие клетки, способствуют формированию соединительной ткани, выделяют факторы ангиогенеза и фиброгенеза, во многом могут определять ремоделирование сердца, выделяя эластазу, коллагеназу и гиалуронидазу, а также воздействуя на процессы апоптоза и пролиферации кардиомиоцитов. К сожалению, фенотипические характеристики и функциональная роль этих клеток в процессе постинфарктного ремоделирования сердца остаются малоизвестными [11, 12]. Необходимо проведение исследований, направленных на изучение субпопуляций макрофагов в ткани сердца человека и определение их значения в процессах постинфарктного воспаления и заживления, результаты которых могли бы быть применены в клинической медицине, в том числе в поиске новых терапевтических мишеней для предотвращения неблагоприятного ремоделирования миокарда.

Цель работы: показать наличие/отсутствие стабиллин-1-позитивных макрофагов в миокарде пациентов с фатальным исходом инфаркта миокарда при помощи иммуногистохимического анализа.

Задачи исследования:

1. Изучить методику иммуногистохимического анализа и оценки клеточного состава зоны инфаркта, перинфарктной зоны и отдаленных от инфаркта участков миокарда.
2. Выявить наличие/отсутствие стабиллин-1-позитивных макрофагов в миокарде пациентов с летальным исходом инфаркта миокарда.

Материал и методы

В настоящей работе объектом исследования являлись фрагменты миокарда больных, умерших от острого инфаркта миокарда I типа.

Аутопсия проводилась на базе патологоанатомического отделения НИИ кардиологии. С парафиновых блоков были приготовлены микротомные срезы для последующего иммуногистохимического исследования. В каждом случае проводился забор от трех до пяти парафиновых блоков. С каждого блока выполнено двадцать срезов. Срезы фиксированы на стеклах с полилизинным покрытием (по два среза на одно стекло); при этом один из срезов в каждом стекле использовался для отрицательного контроля. Кроме того, в каждой партии окрашиваемых срезов для положительного и отрицательного контроля использовались срезы плаценты.

Иммуногистохимическое исследование фрагментов сердечной мышцы проводилось с помощью набора мышечных моноклональных антител к стабиллин-1. Во всех случаях мы использовали систему визуализации HRP-DAB (horseradish peroxidase – 3,3'-diaminobenzidine, пероксидаза хрена – 3,3'-диаминобензидин). Работа проводилась на современном универсальном прямом исследовательском микроскопе. Материал исследовался по количественным (количество стабиллин-1-позитивных макрофагов в 1 мм²) и качественным признакам (локализация, характер распределения клеток – единичные клетки или инфильтраты).

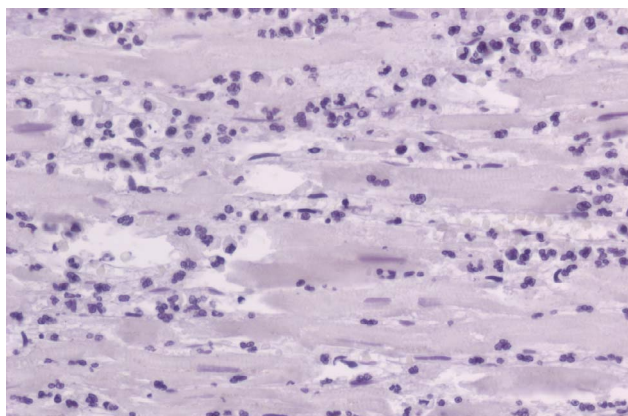


Рис. 1. Зона инфаркта. Инфильтрация миокарда нейтрофилами у пациента, умершего на 3-и сутки от развития инфаркта миокарда, стабиллин-1-позитивные макрофаги отсутствуют. Аутопсия, иммуногистохимическое исследование, х400

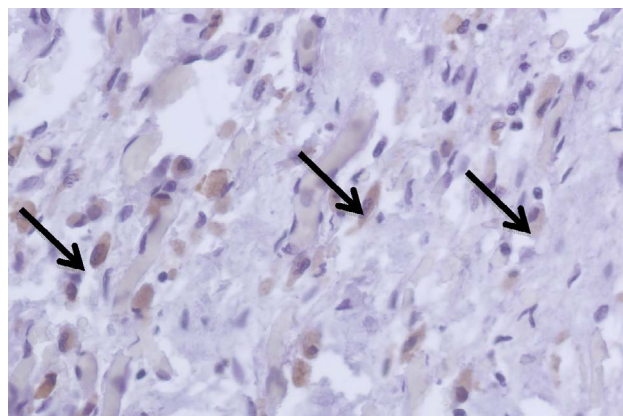


Рис. 2. Зона инфаркта. Инфильтрация миокарда стабиллин-1-позитивными макрофагами у пациента, умершего на 16-е сутки от развития инфаркта миокарда. Аутопсия, иммуногистохимическое исследование, х400

Результаты и обсуждение

Проведено иммуногистохимическое исследование парафиновых срезов миокарда от девяти пациентов с различной давностью инфаркта миокарда. На светоптическом уровне были исследованы стабиллин-1-позитивные макрофаги в зоне инфаркта, перинфарктной зоне и отдаленных от инфаркта участках миокарда.

Стабиллин-1-позитивные макрофаги не определялись в участках некроза (рис. 1). Данная субпопуляция макрофагов появлялась в зоне инфаркта на стадии развития грануляционной ткани (рис. 2). В перинфарктной зоне стабиллин-1-позитивные клетки выявлялись в виде одиночных клеток при давности инфаркта от 48 до 72 ч и более. В участках, отдаленных от зоны инфаркта, в срезе встречались единичные стабиллин-1-позитивные макрофаги при площади среза 1 см² и более.

Настоящий материал является первым этапом работы, выполняемой на базе отделения неотложной кардиологии, посвященной изучению функциональной пластичности моноцитов/макрофагов в процессах восстановительной регенерации и постинфарктного ремоделирования сердца.

Выводы

В результате проведенной работы мы подтвердили наличие стабиллин-1-позитивных M2 макрофагов в миокарде пациентов с фатальным исходом инфаркта миокарда, что позволяет продолжить дальнейшие исследования по определению молекулярного профиля и функции этих клеток в процессах развития неблагоприятного ремоделирования сердца.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №16-04-01268 и программы повышения конкурентоспособности Томского государственного университета. Работа ведется на базе Томского регионального центра коллективного пользования научным оборудованием при финан-

совой поддержке государства в лице Минобрнауки России в рамках Соглашения 14.594.21.0001 (RFMEFI59414X0001).

Литература

1. Min X., Burchfield J., Hill J. Pathological ventricular remodeling: therapies // *Circulation*. – 2013. – Vol. 128(4). – P. 388–400.
2. Рябов В.В., Соколов А.А., Рябова Т.Р. Структурно-функциональная перестройка сердца в условиях реперфузионной терапии инфаркта миокарда. – Томск: STT, 2010. – 252 с.
3. Марков В.А., Рябов В.В., Вышлов Е.В. и соавт. Особенности ремоделирования сердца после инфаркта миокарда при фармакоинвазивных методах реперфузии и усиленной наружной контрпульсации. – Томск: STT, 2014. – 244 с.
4. Ishii H., Amano T., Matsubara T. et al. Pharmacological intervention for prevention of left ventricular remodeling and improving prognosis in myocardial infarction // *Circulation*. – 2008. – Vol. 118. – P. 2710–2718.
5. Федоров А.Ю., Усов В.Ю., Трубаева И.А. и соавт. Коронарная и сердечная недостаточность: Коллективная монография, посвященная 25-летию НИИ кардиологии Томского научного центра Сибирского отделения РАМН и 20-летию Филиала ГУ НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН Тюменский кардиологический центр. – Томск: STT, 2005. – 716 с.
6. Ismail M., Hamid T., Bansal S. et al. Remodeling of the mononuclear phagocyte network underlies chronic inflammation and disease progression in heart failure: critical importance of the cardiosplenic axis // *Circulation Research*. – 2014. – Vol. 114. – P. 266–282.
7. Murray P., Wynn T. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets // *Nature Reviews Immunology*. – 2011. – Vol. 11. – P. 723–737.
8. Clement D., Nance J. Philip, Hubbard J. et al. Stabilin-1 expression in tumor associated macrophages // *Brain Research*. – 2012. – Vol. 1481. – P. 71–78.
9. Kzhyskowska J., Gratchev A., Goerdt S. Stabilin-1, a homeostatic scavenger receptor with multiple functions // *J. Cell. Mol. Med*. – 2006. – Vol. 10. – P. 635–649.
10. Palani S., Elima K., Ekhlom E. et al. Monocyte Stabilin-1 suppresses the activation of Th1 lymphocytes // *J. Immunol*. – 2015. – Vol. 196. – P. 115–123.
11. Fujii K., Wang J., Nagai R. Cardioprotective function of cardiac macrophages // *Cardiovasc. Research*. – 2014. – Vol. 102. – P. 191–193.

12. Frantz S., Bauersachs J., Ertl G. Post-infarct remodeling: contribution of wound healing and inflammation // Cardiovasc. Research. – 2009. – Vol. 81. – P. 474–481.

Поступила 17.02.2016

Сведения об авторах

Гомбожапова Александра Энхэевна, аспирант отделения неотложной кардиологии НИИ кардиологии, младший научный сотрудник Лаборатории трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины ТГУ.

Адреса: 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а; 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36.

E-mail: gombozhapova@gmail.com.

Роговская Юлия Викторовна, канд. мед. наук, заведующая патологоанатомическим отделением НИИ кардиологии, старший научный сотрудник Лаборатории трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины ТГУ.

Адреса: 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а; 634050, г. Томск, пр. Ленина 36.

E-mail: mynga@sibmail.com.

Ребенкова Мария Сергеевна, младший научный сотрудник клинко-диагностической лаборатории НИИ кардиологии.

Адрес: 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а.

E-mail: mariambf@mail.ru.

Шурупов Владимир Сергеевич, канд. мед. наук, врач анестезиолог-реаниматолог отделения неотложной кардиологии НИИ кардиологии.

Адрес: 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а.

E-mail: shurupov81@mail.ru.

Кзышкowska Юлия Георгиевна, докт. биол. наук, профессор Гейдельбергского университета, руководитель Лаборатории трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины ТГУ.

Адрес: 68167, Mannheim, 1–3 Theodor-Kutzer Ufer.

E-mail: ulia.kzhyshkowskal@gmail.com.

Рябов Вячеслав Валерьевич, докт. мед. наук, ведущий научный сотрудник отделения неотложной кардиологии НИИ кардиологии, ведущий научный сотрудник Лаборатории трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины ТГУ, профессор кафедры кардиологии ФПК и ППС ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Адреса: 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а; 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36; 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

E-mail: rvvt@cardio-tomsk.ru.

УДК 616-092.18:616.12

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА КАРДИОМИОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА, АССОЦИИРОВАННОЙ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

А.Ф. Канев¹, Д.С. Кондратьева²

¹Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Сибирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт кардиологии", Томск
E-mail: alexkanev92@gmail.com

SARCOPLASMIC RETICULUM REMODELING IN CARDIOMYOCYTES FROM PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE ASSOCIATED WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

A.F. Kanev¹, D.S. Kondratyeva²

¹Siberian State Medical University, Tomsk

²Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Cardiology", Tomsk

Цель: изучение функции саркоплазматического ретикулума (СР) кардиомиоцитов пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа (СД2). Материал и методы. Работа выполнена на трабекулах ушка правого предсердия пациентов с ИБС и больных ИБС, ассоциированной с СД2. Функцию СР оценивали по изменению показателей инотропной функции изолированных мышц в изометрическом режиме при выполнении теста с периодами покоя. Уровень Са₂⁺-АТФ-азы (SERCA2a) определяли методом Вестерн-блоттинга. Результаты. Обнаружено, что инотропная реакция на периоды покоя может быть двух типов. I тип характеризовался тем, что после периодов покоя амплитуда сокращений либо оставалась на уровне базовых зна-