

**СОЛДАТОВ**

**Вадим Михайлович**

**ЭКСПРЕССИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ  
В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ:  
РОЛЬ И ЗНАЧЕНИЕ В РАЗВИТИИ АТЕРОСКЛЕРОЗА  
КАК ВОЗРАСТ-АССОЦИИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ**

**14.01.30 – геронтология и гериатрия**

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Санкт-Петербург – 2015**

Работа выполнена в отделе клеточной биологии и патологии  
и в лаборатории возрастной патологии сердечно-сосудистой системы  
Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор  
Козлов Кирилл Ленарович

**Официальные оппоненты:**

**Прощаев Кирилл Иванович** – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации ФМБА» (ФГБОУ ДПО «ИПК ФМБА»), профессор кафедры терапии, гериатрии и антивозрастной медицины.

**Хмельницкая Наталия Михайловна**, заслуженный врач РФ, доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры патологической анатомии.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное казенное военное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации (ФГКВОУ ВПО «ВМедА им. С.М. Кирова»).

Защита диссертации состоится «19» октября 2015 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 601.001.01 при Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН по адресу: 197110 Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН <http://www.gerontology.ru>.

Автореферат разослан «30» июля 2015 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук, профессор

Козина Л.С.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность темы.** Известно, что сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), связанные с атеросклерозом, являются основными причинами заболеваемости, инвалидности и смертности в развитых странах. Согласно оценкам ВОЗ, в ближайшее десятилетие они угрожают стать основной причиной смертности в развивающихся странах. При этом эпидемия ССЗ разворачивается на фоне больших успехов в их диагностике и лечении.

Одной из причин значительного роста числа инфарктов, инсультов, случаев сердечной недостаточности считается неуклонное старение населения. В США к 2030 г каждый пятый житель будет старше 65 лет, а к 2050 г численность этой возрастной группы превысит 90 млн. человек, аналогичная тенденция наблюдается и в Российской Федерации [Lim M.A., Townsend R.R., 2009].

Целый ряд исследований показал, что пожилой возраст является одним из основных факторов риска развития ССЗ [Гаврилова Н.Е. и соавт., 2013]. Частота развития атеротромботических состояний постоянно увеличивается с возрастом. В США в настоящее время 80-летние хотя и составляют 5% населения, среди госпитализированных с инфарктом миокарда их уже 20%, а среди умерших от инфаркта 30%.

Вопросы нейроиммуноэндокринной регуляции, в частности, данные о сигнальных молекулах эндотелия, участвующих в механизмах развития возраст-ассоциированной патологии, являются ключевым аспектом в понимании причин развития эндотелиальной дисфункции и старения ССЗ [Белоусов С.С., Новиков И.И., 2010]. Доказано, что основными регуляторными функциями диффузной нейроиммуноэндокринной системы в пожилом возрасте при отсутствии заболеваний является сосудодвигательная, антитромбоцитарная, антикоагулянтная, тромболитическая, противовоспалительная, антиоксидантная, антипролиферативная. Многочисленные фундаментальные исследования последних лет подтвердили роль патологии эндотелия и его дисфункции в патогенезе ССЗ. В литературе описаны некоторые нейрогуморальные маркеры (ренин, эндотелин-1, натрийуретические пептиды, цитокины), определение которых может быть использовано для уточнения риска и прогноза возраст-ассоциированной патологии ССЗ, имеющей высокую социальную значимость. Однако, выявление общих закономерностей молекулярно-клеточных возрастных изменений эндотелия и развития атеросклероза до сих пор остается актуальной задачей современной геронтологии и кардиологии.

### **Цель и задачи исследования**

Целью диссертационного исследования явился сравнительный анализ экспрессии сигнальных молекул при старении эндотелия в норме и при атеросклерозе для выявления общих молекулярно-клеточных механизмов старения эндотелия и патогенеза атеросклероза, как социально значимой возраст-ассоциированной патологии. Для достижения указанной цели были поставлены и последовательно решены следующие задачи:

1. Изучить возрастную динамику экспрессии молекул клеточной адгезии ICAM-1 и P-селектина в эндотелии аорты людей разного возраста и культурах клеток эндотелия, полученных от пациентов с атеросклерозом.
2. Изучить возрастную динамику процессов клеточного обновления в эндотелии аорты человека в норме и при развитии атеросклероза по экспрессии белков Ki67, P53, VEGF.
3. Изучить возрастные особенности межклеточных взаимодействий эндотелиоцитов аорты по экспрессии коннексина Cx37 в норме и при атеросклерозе.
4. Оценить способность эндотелиоцитов при их старении и развитии атеросклероза экспрессировать стресспротекторный белок теплового шока HSP60.
5. Охарактеризовать роль изученных сигнальных молекул в процессе старения эндотелия и развития атеросклероза.

### **Научная новизна**

Впервые показано, что при старении эндотелия в норме в нем замедляются процессы клеточного обновления. Это выражается в снижении экспрессии пролиферотропного белка Ki67 и фактора роста эндотелия сосудов VEGF и одновременном повышении уровня каспаза-зависимого апоптоза. Сходные, но более выраженные изменения экспрессии этих белков верифицированы при атеросклерозе.

Кроме того, впервые установлено, что при развитии атеросклероза и старении эндотелия сосудов повышена экспрессия молекул клеточной адгезии ICAM-1 и P-селектина. При этом функциональная активность эндотелиоцитов снижается, что выражается в нарушении межклеточных коммуникаций (4-кратное снижение экспрессии коннексина Cx37) и снижении устойчивости клеток к стрессу (5-кратное снижение экспрессии белка теплового шока HSP60).

Полученные данные по экспрессии сигнальных молекул ICAM-1, P-селектина, VEGF, P53, Ki67, HSP60, Cx37 в нормальном и атеросклеротическом эндотелии позволяют расширить знания о молекулярно-клеточных механизмах старения эндотелия и патогенезе атеросклероза, как социально значимой возраст-ассоциированной патологии.

### **Практическая значимость**

Полученные результаты указывают на перспективность изучения экспрессии сигнальных молекул – маркеров функциональной активности эндотелия сосудов (VEGF, P53, Ki67, HSP60, Cx37) и молекул клеточной адгезии (ICAM, P-селектин) для выявления молекулярно-клеточных механизмов старения эндотелия в норме и при патологии. Кроме того, исследование экспрессии указанных маркеров в культурах эндотелиоцитов, полученных после операций на сосудистой ткани (аорто-коронарное шунтирование, удаление атеросклерозированных вен и др.) при их старении

пассажами позволит прогнозировать возможные осложнения в постоперационном периоде и дальнейшее развитие заболевания. Также операционный материал эндотелия при культивировании может служить для оценки молекулярно-биологических эффектов вазопротекторных средств в зависимости от индивидуальных особенностей пациента, что позволит назначить ему адресную лекарственную терапию.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. В пожилом и старческом возрасте возрастает экспрессия молекул клеточной адгезии – ICAM-1 и P-селектина, что может лежать в основе увеличения риска развития атеросклероза. В культурах эндотелиоцитов, полученных из аорты, подверженной атеросклерозу, экспрессия молекул клеточной адгезии возрастает в 4 раза.
2. В пожилом, старческом возрасте и у долгожителей наблюдается снижение экспрессии пролиферотропного протеина Ki67 и фактора роста эндотелия сосудов VEGF. При этом уровень апоптоза в эндотелии возрастает в 1,5 раза. Аналогичные, изменения экспрессии Ki67, VEGF и P53 выявлены при атеросклерозе.
3. О снижении функциональной активности эндотелия сосудов с возрастом свидетельствует уменьшение экспрессии белка межклеточных контактов коннексина Cx37 и белка теплового шока HSP60 в 2-4 раза по сравнению с эндотелием людей молодого и среднего возраста. При атеросклерозе снижение выявлено 5-кратное снижение экспрессии белка HSP60 и Cx37.
4. Молекулярные механизмы развития атеросклероза и процессы естественного старения во многом характеризуются сходным профилем изменения экспрессии ключевых сигнальных молекул (ICAM-1, P-селектина, VEGF, P53, Ki67, HSP60, Cx37), однако при атеросклерозе эти изменения выражены более значительно.

### **Связь с научно-исследовательской работой Института**

Диссертационная работа является научной темой, выполняемой по основному плану НИР Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, 4 глав, обсуждения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 101 странице, содержит 8 таблиц, иллюстрирован 25 рисунками. Список литературы содержит 112 источников, из них отечественных – 39, зарубежных – 73.

## **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованном ВАК Минобрнауки РФ для опубликования материалов диссертационных исследований и 7 тезисов докладов.

## **Апробация и реализация диссертации**

Материалы диссертации доложены на международной юбилейной конференции «100 лет отговской морфологии: от рутинной гистологии к молекулярной микроскопии» (Санкт-Петербург, 2014); XIX Международной научно-практической конференции «Пожилой больной. Качество жизни» (Санкт-Петербург, 2014); 64<sup>th</sup> European Congress for cardiovascular Surgery (Istanbul, 2015).

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### *Характеристика исследуемого материала*

Объектом для исследования служил аутопсийный материал аорты людей разного возраста без сердечно-сосудистой патологии и первичные культуры эндотелия аорты человека в норме и при атеросклерозе. Аутопсийный материал аорты был получен в СПб ГБУЗ «Городская больница святого великомученика Георгия» (Санкт-Петербург). Весь материал, полученный от 95 человек, был разделен на 4 группы в соответствии с возрастом пациентов (таблица 1).

Для создания культур клеток материал аорты без патологических изменений был получен от эмбриона человека (21 неделя гестации) в НИИ акушерства и гинекологии им Д.О. Отта РАМН (Санкт-Петербург). Ткань атеросклеротической аорты человека (диаметром 0,2 см, 4 фрагмента) была получена при операции аортокоронарного шунтирования у лиц пожилого возраста, проводимой в клинике сердечно-сосудистой хирургии ВМА им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург).

*Таблица 1*

Распределение образцов аутопсийного материала аорты человека по возрастным группам

№ группы	Возрастная категория	Возраст (средний возраст) пациентов, лет	Число пациентов
1	молодой и средний возраст	22-40 (35,4 ± 3,4)	30
2	пожилой возраст	60-74 (72,3 ± 4,2)	25
3	старческий возраст	75-89 (83,4 ± 4,1)	25
4	долгожители	>90 лет(93,5 ± 3,1)	15

Для исследования аутопсийного материала аорты использовали гистологический (окраска гематоксилин-эозином) и иммуногистохимический

методы исследования. Для изучения культур клеток применяли метод иммуоцитохимии. Все полученные данные подвергали морфометрическому и иммуоцитохимическому анализу.

Для оценки функциональной активности и процессов возрастной инволюции эндотелия нами были выбраны следующие сигнальные молекулы: ICAM-1 и P-селектин (маркеры клеточной адгезии), Ki-67 и P53 (маркеры клеточного обновления), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), Cx37 (коннексин – маркер межклеточных контактов в эндотелии), HSP60 (белок теплового шока, характеризующий стрессоустойчивость клетки).

Маркеры клеточной адгезии были выбраны нами для изучения корреляции возрастной инволюции эндотелия и развития атеросклероза, так как известно, что с возрастом в областях с высокой степенью полиплоидии эндотелиальных клеток существенно возрастают адгезивные свойства эндотелия, что может обуславливать локальность межклеточных взаимодействий (лейкоциты–эндотелий) и способствовать развитию атеросклеротических поражений в этих зонах.

Маркеры клеточного обновления, а также протеины VEGF, Cx37 были изучены с целью выявления возможного смещения баланса процессов клеточного обновления в сторону повышения апоптоза и нарушения межклеточных контактов, что характерно для многих органов и тканей.

Белок теплового шока был исследован нами для оценки способности клеток реагировать на образование свободных радикалов в эндотелии.

### ***Имуногистохимический метод***

Изучение функциональной активности клеток эндотелия аорты человека проводили с применением мышиных моноклональных антител к маркерам ICAM-1 (Abcam, 1:100), Ki-67 (Dako, 1:75), P53 (Dako, 1:50), P-селектину (Abcam, 1:150), VEGF (Dako, 1:100), Cx37 (Dako, 1:100), HSP60 (Abcam, 1:50). Для выявления мышиных иммуноглобулинов использовали универсальный биотин-стрептавидин-пероксидазный набор (MP Biomedicals). Субстратный фермент проявляли диаминобензидином (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Dako). Иммуногистохимическое выявление антигенов на гистологических срезах было выполнено согласно основным требованиям для иммунопероксидазных методов по стандартному протоколу.

### ***Культивирование эндотелицитов***

Ткань атеросклеротической аорты человека была получена при операции аорто-коронарного шунтирования. Взятие материала проводилось в стерильных условиях операционного блока. Сразу после взятия образца ткани, его помещали в стерильную емкость с физиологическим раствором. Среда для культивирования содержала 87,5% M199, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1,5% HEPES, 1% PES, L-глутамин. Выделение первичной культуры проводили на чашках Петри (Sarstedt) обработанных раствором фибриногена (Gibco), последующее культивирование проводилось во флаконах с обработанной поверхностью объемом 50 мл (Sarstedt 25 см<sup>2</sup>). Пассирование производили через 3 дня на четвертый, когда культура

достигала состояние монослоя. Клетки культивировали до 7 пассажа (для эндотелия, пораженного атеросклерозом) и до 14 пассажа (для нормального эндотелия), на котором клетки были рассеяны на планшет. Клетки нормального эмбрионального эндотелия 14 пассажа соответствуют «старым» культурам в соответствии с рекомендацией Международной ассоциации исследований клеточных культур (США, Сан-Франциско, 2007). Экспериментально было установлено, что клетки эндотелия, пораженного атеросклерозом, полученные от лиц пожилого возраста, могут пройти не более 7 пассажей, далее культура гибнет. В связи с этим в данном случае за «старые» культуры атеросклеротического эндотелия принимали клетки 7 пассажа.

Затем было произведено иммуноцитохимическое окрашивание (модификация метода иммуногистохимии для мазков клеток и культур). Были исследованы 2 культуры клеток: культура эндотелиальных клеток нормальной аорты человека и культура эндотелиальных клеток аорты человека, пораженной атеросклерозом.

#### ***Морфометрические исследования и компьютерный анализ микроскопических изображений***

Для оценки результатов иммуногистохимического окрашивания проводили морфометрическое исследование с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа Nikon Eclipse E400, цифровой камеры Nikon DXM1200, персонального компьютера на базе Intel Pentium 4 и программного обеспечения Vidiotest Morphology 5.0». В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении 200 и 400 [Автандилов Г.Г., 2006].

Относительную площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Оптическую плотность экспрессии выявленных продуктов измеряли в условных единицах. Указанные параметры отражают интенсивность синтеза или накопления исследуемых сигнальных молекул.

#### ***Статистическая обработка результатов***

Статистическая обработка всех экспериментальных данных включала в себя подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки и проводилась в Statistica 6.0. Для анализа вида распределения использовали критерий Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W-test) Для проверки статистической однородности нескольких выборок были использованы непараметрические процедуры однофакторного дисперсионного анализа (критерий Крускала–Уоллиса). В случаях, когда дисперсионный анализ выявлял статистически значимую неоднородность нескольких выборок, для последующего выявления неоднородных групп применяли процедуры множественных сравнений с помощью критерия Манна-Уитни. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,01.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### **ЭКСПРЕССИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ В ЭНДОТЕЛИИ АОРТЫ ЛЮДЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА**

#### *Экспрессия молекулы адгезии ICAM в эндотелии аорты людей разного возраста*

В группе людей 25-40 лет специфическое окрашивание с антителами к ICAM было зарегистрировано в 95% всех исследуемых препаратов. По сравнению с первой возрастной группой на срезах эндотелиальных клеток второй группы (пожилые) отмечается иммуноокрашивание крупных одиночных клеток. Во второй и третьей возрастных группах (люди старческого возраста и долгожители) ткань аорты была частично замещена соединительно-тканными фрагментами.

*Таблица 2*

Экспрессия ICAM в эндотелиальных клетках аорты людей разного возраста

№ группы	Возраст	Оптическая плотность, у.е	Площадь экспрессии, %
1	25-40 лет	0,16 ± 0,01	3,56 ± 0,68
2	60-74 года	0,15 ± 0,01	8,12 ± 1,05*
3	75-89 лет	0,18 ± 0,01*	5,42 ± 1,04*
4	90 лет и более	0,17 ± 0,02	2,64 ± 0,52

*Примечание (здесь и в таблицах 3-8):* у.е. – условные единицы; результаты представлены в виде среднее значение ± доверительный интервал.

\* -  $p < 0,01$  – по сравнению с группой 1 (25-40 лет).

Специфическое иммуноокрашивание на ICAM наблюдалось в отдельных клетках паренхимы. Компьютерный анализ микроскопических изображений позволил сравнить уровень содержания ICAM в эндотелиальных клетках людей в разных возрастных группах (таблица 2).

Проведенные исследования позволяют заключить, что показатели оптической плотности иммуноокрашенных клеток эндотелия человека, содержащих ICAM, не изменялись с возрастом ( $p=0,45$ ). Подсчет площади экспрессии ICAM показал, что этот показатель в группе пожилых людей в 2,3 раза выше по сравнению с лицами в возрасте 25-40 лет. При этом площадь экспрессии ICAM в старческом возрасте снижается соответственно на 67% по сравнению с лицами пожилого возраста. Минимальное значение количества иммуноокрашенных клеток наблюдается в группе долгожителей по сравнению со второй и третьей возрастными группами. Таким образом, иммуногистохимическое исследование позволило верифицировать ICAM в эндотелиальных клетках аорты человека во всех изучаемых возрастных группах и установить особенности его возрастной динамики. Установлено, что количество клеток, содержащих ICAM, увеличивается, достигая

максимума в пожилом возрасте. Затем происходит постепенное снижение числа ICAM-содержащих клеток, но, тем не менее, их количество у долгожителей остается на том же уровне, что и в группе 25-40 летних. Интенсивность содержания ICAM в клетках с возрастом не изменяется.

Повышение экспрессии ICAM в эндотелии сосудов при переходе от молодого к старческому возрасту указывает на увеличение адгезионной способности эндотелиоцитов, что может явиться одним из факторов предрасположенности к развитию атеросклероза. Снижение экспрессии ICAM у лиц старческого возраста и долгожителей, вероятно, указывает на их генетическую устойчивость к развитию атеросклероза, т.к. этот аутопсийный материал был получен от людей без сердечно-сосудистой патологии.

### ***Экспрессия пролиферотропного протеина Ki67 в эндотелии аорты людей разного возраста***

В первой возрастной группе выявлено специфическое иммуноокрашивание на маркер клеточной пролиферации Ki67. На препаратах эндотелиальных клеток аорты людей пожилого, старческого возраста и долгожителей наблюдается единичное иммуноокрашивание. Компьютерный анализ микроскопических изображений позволил сравнить уровень экспрессии Ki67 в эндотелиальных клетках аорты человека в разных возрастных группах (таблица 3).

*Таблица 3*

**Экспрессия пролиферотропного протеина Ki67  
в эндотелиальных клетках аорты людей разного возраста**

№ группы	Возраст	Оптическая плотность, у.е.	Площадь экспрессии, %
1	25-40 лет	3,54 ± 0,006	48,51 ± 1,57
2	60-74 года	2,33 ± 0,002*	33,63 ± 1,75*
3	75-89 лет	2,32 ± 0,015*	29,64 ± 3,06*
4	90 лет и более	2,36 ± 0,004*	23,93 ± 2,85*

Установлено, что показатель оптической плотности иммуноокрашенных эндотелиальных клеток аорты человека достоверно уменьшается с возрастом и наиболее высок у людей 25-40 лет по сравнению со средними значениями оптической плотности во второй, третьей и четвертой возрастных группах. Подсчет площади экспрессии маркера пролиферации эндотелиальных клетках аорты человека показал, что этот показатель имеет самое высокое значение для группы людей в возрасте 25-40 лет. В этой группе площадь экспрессии Ki67 соответственно в 1,4, 1,6 и 2 раза выше, чем у людей пожилого, старческого возраста и долгожителей. Минимальное количество пролиферирующих клеток обнаружено в группе долгожителей по сравнению с первой возрастной группой.

Таким образом, иммуногистохимическое исследование позволило верифицировать экспрессию Ki67 в эндотелиальных клетках аорты человека в разных возрастных группах и проследить возрастную динамику экспрессии маркера пролиферации, - несмотря на снижение суммарной площади экспрессии Ki67 при старении, позволяет поддерживать пролиферацию на стабильно низком уровне после 60 лет, что так же является фактором, способствующим образованию атеросклеротических бляшек.

### ***Экспрессия проапоптотического протеина P53 в эндотелии аорты людей разного возраста***

В первой возрастной группе выявлено специфическое иммуноокрашивание апоптотического маркера P53. На препаратах эндотелиальных клеток аорты людей пожилого, старческого возраста и долгожителей наблюдается резкое увеличение количества иммуноокрашенных структур к маркеру апоптоза. Компьютерный анализ микроскопических изображений позволил сравнить уровень экспрессии P53 в эндотелиальных клетках аорты человека в разных возрастных группах (таблица 4).

*Таблица 4*

Экспрессия P53 в эндотелиальных клетках аорты человека

№ группы	Возраст	Оптическая плотность, у.е.	Суммарная площадь, %
1	25-40 лет	2,54 ± 0,006	21,48 ± 1,33
2	60-74 года	4,33 ± 0,003*	34,87 ± 1,62*
3	75-89 лет	5,05 ± 0,015*	36,04 ± 2,26*
4	90 лет и более	5,16 ± 0,004*	35,93 ± 2,85*

Установлено, что показатель оптической плотности иммуноокрашенных апоптотических эндотелиальных клеток аорты человека в 1,7 раза выше у лиц старческого возраста по сравнению с первой возрастной группой и достоверно не отличается от значений во второй и третьей группах. Подсчет площади экспрессии иммуноокрашенных маркером апоптоза эндотелиальных клеток аорты человека показал, что этот показатель имеет самое высокое значение для людей старческого возраста, что достоверно выше, чем у людей 25-40 лет и достоверно не отличается от пожилых и долгожителей. Минимальное количество апоптотических клеток обнаружено в группе людей 20-45 лет. У лиц пожилого, старческого возраста и долгожителей площадь экспрессии P53 возрастала соответственно в 1,6, 1,7 и 1,7 раза по сравнению первой возрастной группой. Таким образом, иммуногистохимическое исследование позволило верифицировать апоптоз в эндотелиальных клетках аорты человека в разных возрастных группах и проследить возрастную динамику экспрессии маркера P53, - апоптотические процессы с возрастом усиливаются, однако в пожилом, старческом возрасте

и у долгожителей остаются на примерно равном уровне, что позволяет говорить о компенсационных механизмах, которые отвечают за апоптоз.

### **Экспрессия Р-селектина в эндотелии аорты людей разного возраста**

В первой группе иммуноокрашенные антителами к Р-селектину области преимущественно локализовались во всем пласте эндотелиальных клеток. На препаратах эндотелиальных клеток людей пожилого, старческого возраста и долгожителей наблюдалось иммуноокрашивание селектина преимущественно в пласте эндотелиальных клеток. Данные компьютерного анализа иммуноокрашенной молекулы формирования атеросклеротической бляшки (Р-селектина) в эндотелиальных клетках артерии человека представлены в таблице 5.

*Таблица 5*

Экспрессия Р-селектина в эндотелиальных клетках аорты человека

№ группы	Возраст	Оптическая плотность, у.е.	Площадь экспрессии, %
1	25-40	2,30 ± 0,005	28,33 ± 1,13
2	60-74 года	2,36 ± 0,002	33,19 ± 2,35*
3	75-89 лет	2,34 ± 0,001	31,77 ± 1,65*
4	90 лет и более	2,35 ± 0,002	20,78 ± 1,55*

Сравнение средних значений оптической плотности Р-селектина для разных возрастных групп позволило получить следующие результаты: минимальное значение обнаружено в эндотелии людей 25-40 лет и оно достоверно отличается от значений других трех групп. Максимальные значения оптической плотности содержания Р-селектина в эндотелиальных клетках наблюдается во второй, третьей и четвертой возрастных группах. Средние значения площади экспрессии также различаются между группами: данный показатель достоверно меньше в группе долгожителей по сравнению с первой, второй, третьей возрастными группами.

Таким образом, изучение экспрессии Р-селектина позволило установить достоверное снижение этого маркера при старении. Показатель оптической плотности демонстрирует сходную тенденцию, что подтверждает возрастную зависимость количества этого маркера от скорости и частоты формирования атеросклеротической бляшки.

### **Экспрессия VEGF в эндотелии аорты людей разного возраста**

В первой группе специфическое иммуноокрашивание на маркер VEGF было обнаружено во всех структурах, что является нормой для данной возрастной группы. Известно, что процесс образования новых сосудов происходит активно у людей до 40-летнего возраста, что препятствует образованию атеросклеротических бляшек. Во второй, третьей и четвертой

возрастных группах (люди пожилого, старческого возраста и долгожители) количество иммунопозитивных клеток к фактору роста сосудов резко снижается. На микрофотографиях эндотелия людей старших возрастных групп помимо немногочисленных иммуноокрашенных клеток, экспрессирующих VEGF, видны проявления возрастной инволюции. В противоположность этому на микрофотографиях людей 25-40-летнего возраста признаки инволюции отсутствуют. Данные компьютерного анализа иммуногистохимического окрашивания представлены в таблице 6.

*Таблица 6*

**Экспрессия VEGF в эндотелиальных клетках аорты человека**

№ группы	Возраст	Оптическая плотность, у.е.	Площадь экспрессии, %
1	25-40 лет	0,28 ± 0,01	3,28 ± 0,4
2	60-74 года	0,19 ± 0,03*	2,15 ± 0,23*
3	75-89 лет	0,17 ± 0,008*	1,8 ± 0,2*
4	90 лет и более	0,18 ± 0,01*	1,4 ± 0,19*

Сравнение средних значений оптической плотности для разных возрастных групп позволило установить достоверное снижение (практически в 2 раза) данного показателя у лиц пожилого, старческого возраста и долгожителей. Сравнение средних значений площади экспрессии VEGF для разных возрастных групп позволило получить следующие результаты: максимальное значение обнаружено в эндотелии людей 25-40 лет и оно достоверно отличается от значений групп пожилого, старческого возраста и долгожителей. Минимальное значение, обнаруженное в группе долгожителей, достоверно отличается от значений в группах людей 25-40 лет.

***Экспрессия коннексина Cx37 в эндотелии аорты людей разного возраста***

В первой группе специфическое иммуноокрашивание на маркер Cx37 было обнаружено во всех структурах. Во второй, третьей и четвертой возрастных группах (люди пожилого, старческого возраста и долгожители) были обнаружены немногочисленные иммуноокрашенные клетки. На микрофотографиях эндотелия людей старших возрастных групп помимо немногочисленных иммуноокрашенных клеток, экспрессирующих маркерный протеин Cx37, видны проявления возрастной инволюции, выражающиеся в виде уменьшения общего числа клеток. В противоположность этому на микрофотографиях людей 25-40-летнего возраста признаки инволюции отсутствуют. Данные компьютерного анализа иммуногистохимического окрашивания представлены в таблице 7.

Таблица 7

## Экспрессия Сх37 в эндотелиальных клетках аорты человека

№ группы	Возраст	Оптическая плотность, у.е.	Суммарная площадь, %
1	25-40 лет	0,16 ± 0,02	4,23 ± 0,68
2	60-74 года	0,17 ± 0,01	2,75 ± 0,43*
3	75-89 лет	0,19 ± 0,009	2,14 ± 0,31*
4	90 лет и более	0,16 ± 0,01	1,56 ± 0,28*

Сравнение средних значений оптической плотности для разных возрастных групп позволило установить отсутствие различий данного параметра в ходе старения. Сравнение средних значений процента суммарной площади для разных возрастных групп позволило получить следующие результаты: максимальное значение обнаружено в эндотелии людей 25-40 лет и оно достоверно отличается от значений групп пожилого, старческого возраста и долгожителей. Таким образом, иммуноокрашивание антителами к Сх37 позволило установить резкое снижение факторов, обеспечивающих межклеточную сигнализацию в эндотелии человека при старении.

**Экспрессия белка теплового шока HSP60 в эндотелии аорты людей разного возраста**

В первой группе специфическое иммуноокрашивание на маркер HSP60 было обнаружено во всех структурах. Что свидетельствует о том, что в этой возрастной группе межклеточная сигнализация находится на довольно высоком уровне и препятствует образованию атеросклеротических бляшек. Во второй, третьей и четвертой возрастных группах (люди пожилого, старческого возраста и долгожители) были обнаружены немногочисленные иммуноокрашенные клетки. Данные компьютерного анализа иммуногистохимического окрашивания представлены в таблице 8.

Таблица 8

## Экспрессия HSP60 в эндотелиальных клетках аорты человека

№ группы	Возраст	Оптическая плотность, у.е.	Площадь экспрессии, %
1	25-40 лет	0,21 ± 0,02	4,4 ± 0,68
2	60-74 года	0,22 ± 0,01	2,48 ± 0,43*
3	75-89 лет	0,17 ± 0,01*	2,34 ± 0,32*
4	90 лет и более	0,14 ± 0,009*	1,48 ± 0,26*

Сравнение средних значений оптической плотности для разных возрастных групп позволило установить отсутствие различий данного параметра в ходе старения. Сравнение средних значений площади экспрессии белка теплового шока для разных возрастных групп позволило получить следующие результаты: максимальное значение обнаружено в эндотелии людей 25-40 лет и оно достоверно отличается от значений групп пожилого, старческого возраста и долгожителей.

Таким образом, иммуноокрашивание антителами к HSP60 позволило установить резкое снижение факторов, обеспечивающих межклеточную устойчивость эндотелия при старении к различным повреждающим факторам.

## **ЭКСПРЕССИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ СТАРЕНИИ В НОРМЕ И ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**

### *Экспрессия молекул ICAM и P-селектина в культуре клеток эндотелия при его старении*

В культуре эндотелия из зоны атеросклеротического поражения установлено значительное повышение показателей площади экспрессии маркера ICAM1 ( $2,07 \pm 0,81\%$ ) по сравнению с контрольной группой «старой» культуры эндотелиоцитов ( $8,08 \pm 0,93\%$ ) (рисунок 1).

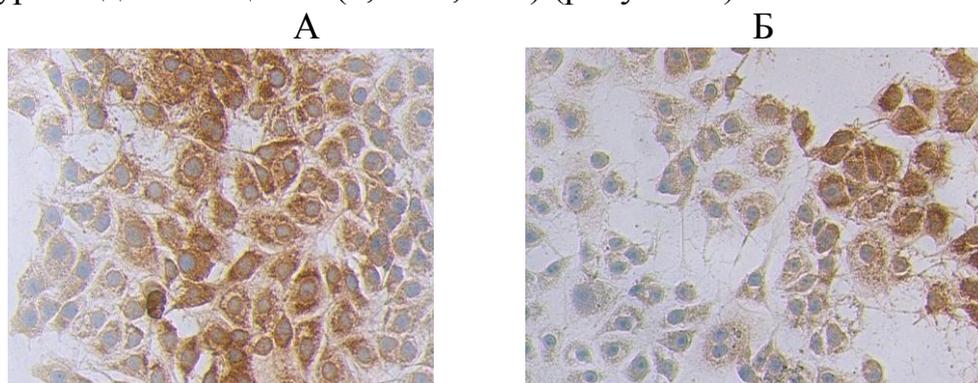


Рисунок 1. Экспрессия P-селектина в культуре клеток эндотелия,  $\times 200$ . А- нормальный эндотелий при старении в культуре, Б – эндотелий из очага атеросклероза.

В культуре клеток интактного «старого» эндотелия показатель площади экспрессии P-селектина были в 4 раза меньше ( $3,21 \pm 0,24\%$ ) чем относительная площадь экспрессии данного маркера в «атеросклеротическом» эндотелии ( $12,00 \pm 0,27\%$ ).

### *Экспрессия пролиферотропного протеина Ki67 и маркера апоптоза P53 в культуре клеток эндотелия при его старении*

При исследовании маркера пролиферации Ki67 в культурах клеток эндотелия, было выявлено, что в норме при его старении площадь

экспрессии составляет  $7,98 \pm 1,15\%$ , тогда как в эндотелии из очага атеросклероза данный показатель значительно снижен и составляет  $2,16 \pm 0,35\%$ .

Результаты исследования площади экспрессии маркера апоптоза P53 в культурах эндотелия, показали, что при атеросклерозе в культурах эндотелия аорты человека данный показатель составляет  $5,67 \pm 0,31\%$  и повышен в 3 раза по сравнению с группой «старого» эндотелия в норме ( $1,82 \pm 0,23\%$ ) (рисунок 2).

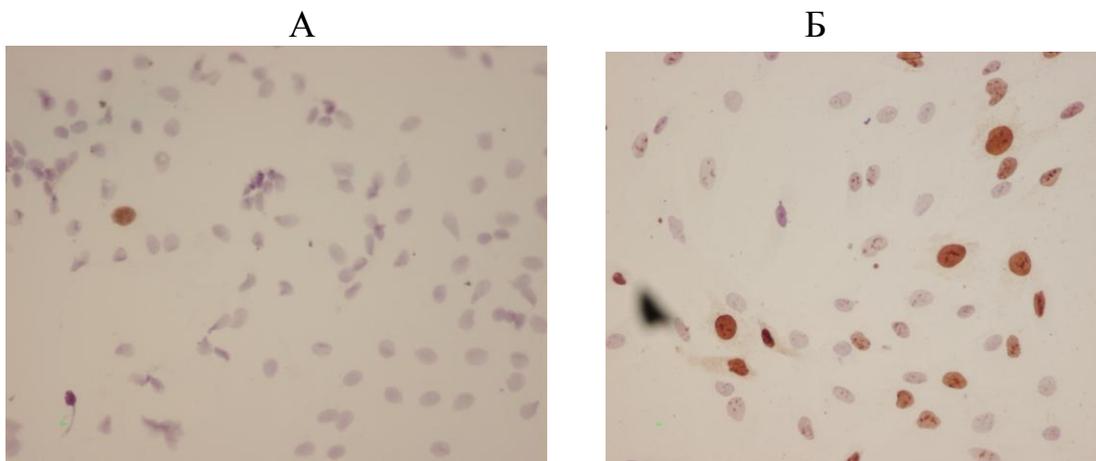


Рисунок 2. Экспрессия P53 в эндотелии сосудов, x200. А- нормальный эндотелий при старении в культуре, Б – эндотелий из очага атеросклероза.

### ***Экспрессия VEGF, коннексина Cx37 и белка теплового шока HSP60 в культуре клеток эндотелия при его старении***

Статистический анализ экспрессии маркера VEGF в культуре клеток «атеросклеротического» эндотелия показал, что площадь экспрессии изучаемого маркера составляет  $3,58 \pm 0,73\%$ , что достоверно ниже по сравнению с нормальным эндотелием при его старении ( $9,44 \pm 1,01\%$ ). Статистический анализ экспрессии маркера Cx37 в культуре клеток «атеросклеротического» эндотелия показал, что площадь экспрессии изучаемого маркера,  $1,37 \pm 0,14\%$ , достоверно ниже по сравнению с нормальным эндотелием 14 пассажа, где этот показатель составил  $6,42 \pm 0,31\%$ .

В контрольной группе нормального эндотелия при его старении экспрессия маркера белка теплового шока составила  $10,11 \pm 1,03\%$  и была достоверно выше, чем в эндотелии из очага атеросклероза ( $2,21 \pm 0,16\%$ ).

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Проблема сердечно-сосудистой патологии имеет важное социальное значение, что обусловлено увеличением трудоспособного периода и продолжительности жизни людей в развитых и развивающихся странах. Смертность от сердечно-сосудистых заболеваний в Европе у пожилых людей составляет около 50% [Perk J. et al., 2007]. Для создания новых подходов к

терапии сердечно-сосудистой патологии необходимо понимание молекулярно-клеточных механизмов старения ткани сосудов. Дисфункция эндотелиальной выстилки сосудов играет ведущую роль в патогенезе и прогрессировании ряда ассоциированных с возрастом заболеваний сердечно-сосудистой системы - атеросклероза, гипертонической болезни и др. [Пальцев М.А., Кветной И.М., 2014]. Проявления дисфункции эндотелия принято связывать с нарушением синтеза оксида азота и дисбалансом между продукцией вазодилатирующих, ангиопротекторных, вазоконстрикторных, протромботических, пролиферативных факторов и других сигнальных молекул [Биглецкий С.В., 2008; Пальцев М.А. и соавт., 2012]. Однако, первичной причиной всех перечисленных функциональных нарушений эндотелия во многом является старение клеток сосудистой ткани, молекулярные механизмы которого в настоящее время практически не изучены. В связи с этим нами были изучены молекулярные механизмы старения клеток сосудов на аутопсийном материале людей разного возраста и в культуре эндотелиоцитов в норме и при атеросклерозе.

Первая часть исследования была посвящена изучению возрастных особенностей экспрессии сигнальных молекул эндотелия у людей молодого, среднего, пожилого, старческого возраста и долгожителей.

Установлено, что в пожилом и старческом возрасте возрастает экспрессия молекул клеточной адгезии – ICAM-1 и P-селектина, что может лежать в основе увеличения риска развития атеросклероза. В то же время у долгожителей отмечается пониженный по сравнению с людьми в возрасте 25-40 лет уровень экспрессии ICAM-1 и P-селектина. Вероятно, генетически детерминированный низкий уровень экспрессии этих белков может служить одним из факторов увеличения длительности жизни.

Кроме того, в работе были изучены процессы клеточного обновления в эндотелии аорты людей при старении. Установлено, что в пожилом, старческом возрасте и у долгожителей наблюдается выраженное (в 2 раза) снижение экспрессии пролиферотропного протеина Ki67. При этом уровень апоптоза в эндотелии возрастает в 1,5 раза. Таким образом, баланс поддержания субпопуляции эндотелиоцитов с возрастом снижается в сторону клеточной гибели. Кроме того, наблюдалось возрастное снижение (в 2 раза) экспрессии фактора роста эндотелия сосудов VEGF.

О снижении функциональной активности эндотелия сосудов с возрастом свидетельствует уменьшение экспрессии белка межклеточных контактов коннексина Cx37 и белка теплового шока HSP60 в 2-4 раза по сравнению с эндотелием людей молодого и среднего возраста.

Вторая часть исследования была проведена на культурах эндотелия человека. Культуры нормального эндотелия из аорты эмбриона человека подвергались старению пассажами (14 пассаж). Культуры, полученные из аорты лиц пожилого возраста, пораженной атеросклерозом, также подвергались старению (7 пассаж, далее наблюдалась гибель клеток). Установлено, что в культурах эндотелиоцитов, полученных из аорты, подверженной атеросклерозу, так же как и при старении нормального

эндотелия, только в большей степени (в 4 раза), возрастает экспрессия молекул клеточной адгезии ICAM-1 и P-селектина. Кроме того, процессы клеточного обновления при атеросклерозе приводят к резкому (в 4 раза) снижению пролиферативной активности эндотелиоцитов на фоне трехкратного повышения уровня апоптоза. При этом атеросклероз аорты характеризуется снижением экспрессии VEGF в 2,5 раза по сравнению с нормальным старением эндотелия в культуре (14 пассаж). Установлено, что атеросклеротическое поражение аорты человека характеризуется снижением сопротивляемости эндотелиоцитов к воздействию стрессорных факторов и нарушением межклеточных контактов, что выражается в 5-кратном снижении экспрессии белка теплового шока HSP60 и коннексина Cx37.

Таким образом, молекулярные механизмы развития атеросклероза и процессы естественного старения во многом характеризуются сходным профилем изменения экспрессии ключевых сигнальных молекул (ICAM-1, P-селектина, VEGF, P53, Ki67, HSP60, Cx37), однако при атеросклерозе эти изменения выражены более значительно.

## ВЫВОДЫ

1. При атеросклерозе в эндотелии наблюдается повышение экспрессии молекул клеточной адгезии ICAM-1 и P-селектина. Сходные, но менее выраженные изменения верифицированы в эндотелии здоровых людей старших возрастных групп.
2. Атеросклеротические изменения в эндотелии и его старение в норме характеризуются снижением способности эндотелия к пролиферации и повышением уровня апоптоза в нем в 1,5- 4 раза. При атеросклерозе аорты резко снижается экспрессия фактора роста эндотелия сосудов VEGF, тогда как при нормально старении эти изменения менее выражены.
3. Развитие атеросклероза и старение сосудов характеризуются снижением эндотелиоцитов к межклеточным контактам, о чем свидетельствует недостаточная экспрессия коннексина Cx37.
4. В патогенезе атеросклероза и старении сосудистого русла важную роль играет снижение экспрессии белка теплового шока HSP60, что свидетельствует о нарушении защитных функций эндотелиоцитов.
5. Молекулярные механизмы развития атеросклероза и нормального старения во многом сходны. Однако, при атеросклерозе изменение уровня экспрессии сигнальных молекул (ICAM-1, P-селектина, VEGF, P53, Ki67, HSP60, Cx37) значительно более выражено, чем при возрастных изменениях эндотелия.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. В качестве персонифицированной диагностики возможных осложнений атеросклероза после операции аортокоронарного шунтирования может быть рекомендовано исследование экспрессии маркеров функционального состояния эндотелия сосудов (VEGF, P53, Ki67, HSP60, Cx37) в культуре клеток операционного материала.
2. Для выбора оптимальных возопротекторных и аниатеросклеротических лекарственных средств после операции аортокоронарного шунтирования может быть рекомендовано исследование экспрессии молекул адгезии (ICAM, P-селектин) при добавлении в культуру эндотелия операционного материала этих лекарственных препаратов.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ПРИНЯТЫХ В АВТОРЕФЕРАТЕ**

**ВОЗ** – Всемирная организация здравоохранения

**ССЗ** – Сердечно-сосудистые заболевания

**CD** – Кластер дифференцировки

**Cx** – Коннексин

**HSP** – Белок теплового шока

**ICAM-1** – Молекула межклеточной адгезии -1

**VEGF** – Фактор роста эндотелия сосудов

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Статьи в журналах, включенных в Перечень ВАКа Минобрнауки РФ*

1. Молекулярные аспекты старения сосудов *in vitro* / К.Л. Козлов, В.М. Солдатов, В.О. Полякова, Н.С. Линькова, А.О. Дурнова, Д.С. Медведев // Молекулярная медицина – 2015. – №3.– С. 53-56.
2. Роль сигнальных молекул эндотелия в патогенезе возраст-ассоциированных заболеваний / К.Л. Козлов, В.М. Солдатов, Е.М. Пальцева, Е.В. Седов, В.О. Полякова, Н.С. Линькова // Успехи геронтологии. – 2015. – Т. 28. №1. – С.29-36.
3. *Солдатов, В.М.* Значение экспрессии сигнальных молекул эндотелия сосудов в развитии атеросклероза / В.М. Солдатов, К.Л. Козлов, Н.С. Линькова // Молекулярная медицина – 2015. – № 6.– С. 113-122.

### *Тезисы докладов*

4. *В.М.* Верификация белка теплового шока HSP60 в культуре эндотелиальных клеток при старении / В.М. Солдатов, К.Л. Козлов / Матер. юбилейной конф. «100 лет Оттовской морфологии». – СПб., – 2014. – С. 32-33.
5. *Солдатов, В.М.* Молекулярные механизмы развития атеросклероза при клеточном старении *in vitro* / В.М. Солдатов, К.Л. Козлов, Н.С. Линькова // XIX Международная научно-практическая конференция «Пожилой больной. Качество жизни». - С.-Петербург, 2014. - С. 107-108.
6. *Солдатов, В.М.* Сравнительный анализ экспрессии Р-селектина в культурах эндотелия аорты в норме и при атеросклерозе / В.М. Солдатов, К.Л. Козлов // XIX Международная научно-практическая конф. «Пожилой больной. Качество жизни», С.-Петербург, 2014. - С. 109.
7. *Солдатов, В.М.* Экспрессия маркеров обновления в эндотелиальных клетках *in vitro* в норме и при атеросклерозе / В.М. Солдатов, К.Л. Козлов // XIX Международная научно-практическая конф. «Пожилой больной. Качество жизни», С.-Петербург, 2014. - С. 110.
8. Экспрессия сигнальных молекул в эндотелии при старении клеток в культуре / В.М. Солдатов, К.Л. Козлов, А.О. Дурнова, Н.С. Линькова // Матер. юбилейной конф. «100 лет Оттовской морфологии». – СПб., 2014. С. 45-46.
9. Экспрессия сигнальных молекул в эндотелии: роль и значение в развитии атеросклероза как возрастной патологии / К.Л. Козлов, В.М. Солдатов, Е.В. Седова Е.В., В.О. Полякова, Н.С. Линькова // Международный форум «Старшее поколение». – С. 88.
10. *Солдатов, V.M.* Laser confocal microscopy of endothelium: role of signaling molecules in mechanisms of restenosis / Kozlov K.L., V.M. Soldatov, V.O. Polyakova et al. // 64th European Congress for cardiovascular Surgery. - Istanbul, 2015. – P. 93

**СОЛДАТОВ Вадим Михайлович** ЭКСПРЕССИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ: РОЛЬ И ЗНАЧЕНИЕ В РАЗВИТИИ АТЕРОСКЛЕРОЗА КАК ВОЗРАСТ-АССОЦИИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ //Автореф. дисс. ... канд. мед.наук.: 14.01.30. – СПб., 2015. – 20 с.

---

Подписано в печать «25» июня 2015. Формат 60Ч84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ \_\_\_\_\_.

---

Отпечатано с готового оригинал-макета.

ЗАО «Принт-Экспресс»

197101, С.-Петербург, ул. Большая Монетная, 5 лит. А.

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

*Автандилов Г.Г.* Диагностическая медицинская плоидометрия. - М.: Медицина, 2006. – 192 с.; *Белоусов С.С., Новиков И.И.* Роль молекулярно-иммунологических нарушений в патогенезе инфаркта миокарда и их модуляции в клинической практике // Медицинский альманах. - 2010. - Т. 11. - № 2. - С. 66-69.; *Билецкий С.В.* Эндотелиальная дисфункция и патология сердечно-сосудистой системы// Внутренняя медицина. - 2008. – Т. 2(8). – С. 134-139.; *Гаврилова Н.Е. и соавт.* Взаимосвязь между выраженностью коронарного атеросклероза, факторами риска и маркерами атеросклеротического поражения каротидных и периферических артерий // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. - 2013. - Т. 12. - № 1. - С. 40-45; *Пальцев М.А., Кветной И.М.* Руководство по нейроиммуноэндокринологии. 2014. 3-е изд. М.: Шико. - 756 с.; *Пальцев М.А. и соавт.* Сигнальные молекулы: место в персонифицированной диагностике, лечении и профилактике социально значимых заболеваний // Молекулярная медицина. - 2012. - № 5. - С. 4-8.; *Lim M.A., Townsend R.R.* Arterial compliance in the elderly: its effect on blood pressure measurement and cardiovascular outcomes// Clin Geriatr Med – 2009. – Vol. 25. – P. 191-205.; *Perk J., et al.* Guidelines of cardiovascular disease prevention in clinical practice. Joint task force of the European society of cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice// Eur. Heart J. – 2007. – Vol. 28. – P. 2375-2414.