

УДК 616.132:612.017.34—053.9

А. П. Зайченко, Г. В. Копылова, О. П. Наумова, Г. М. Бутенко

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПОРАЖЕНИЕ АОРТЫ КРОЛИКОВ РАЗНОГО ВОЗРАСТА ИММУННЫМИ КОМПЛЕКСАМИ

С иммунной дисфункцией в старости прямо или косвенно связывают возникновение ряда патологических процессов, типичных для позднего возраста, в том числе и атеросклероза.

В последнее время особое значение придается иммунокомплексным повреждениям артериальной стенки, которые могут явиться первопричиной и важным патогенетическим фактором развития сосудистых поражений у человека. С возрастом увеличивается как частота аутоиммунных реакций гуморального типа, могущих явиться источником образования циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), так и заболеваемость атеросклерозом.

Мы изучали действие введенных извне иммунных комплексов на аорту молодых и старых кроликов на фоне экспериментальной гиперхолестеринемии.

Методика исследований

В опыт были взяты кролики породы шиншилла в возрасте 8—10 мес (молодые — 9 штук) и 4—4,5 лет (старые — 9 штук). На протяжении месяца животным внутривенно через день вводили комплексы (ИК) — антиген-антитело, приготовленные посредством соединения кроличьих антител против сердца собаки и избытком соответствующего антигена (в соотношении 1:5). Части кроликов (4 молодых и 4 старых) наряду с введением ИК скармливали холестерин, ежедневно по 0,1 г/кг. Для приготовления антигена сердце собаки тщательно промывали через коронарные сосуды холодным (4 °C) физиологическим раствором для удаления крови, мышечную ткань по возможности освобождали от жира и соединительнотканых элементов, измельчали ножницами, растирали с песком до пастообразного состояния и гомогенизировали в микроизмельчителе тканей РТ-2 в течение 5 мин после добавления физиологического раствора в соотношении 1:5. Гомогенат выдерживали при 4 °C в течение 18—20 ч, центрифугировали 3—4 мин. Надосадочная жидкость служила антигеном. В 1,0 мл такого гомогената содержалось 15—20 мг белка.

Для получения антител 10 кроликов породы шиншилла среднего возраста иммунизировали сердечным антигеном, который на протяжении 8 нед вводили через 3—4 дня по 1,0 мл одновременно внутривенно и подкожно. Через 2 мес была произведена реиммунизация двухразовым (с интервалом в 3 дня) введением антигена в те же места по 1,0 мл. Через неделю кролики были обескровлены. Из смеси сывороток путем осаждения 40 % сернистым аммонием были выделены глобулины. Титр противосердечных антител в реакции связывания комплемента в этом глобулине составлял 1:800.

У животных, которым вводили иммунные комплексы, в динамике 1 раз в неделю, перед очередным введением определяли циркулирующие иммунные комплексы по методу Гашковой и соавт. [1] в относительных единицах, посредством осаждения их полиэтиленгликолем 6000. По окончании эксперимента аорты кроликов были исследованы морфологически. Производили тотальную окраску суданом III—IV по методу Техада и Стронга. Кусочки из участков поражений заливали в парафин, изготовленные срезы окрашивали гематоксилин-эозином; замороженные срезы из этих же участков окрашивали жирным красным «О».

Результаты исследований и их обсуждение

Исходный уровень циркулирующих иммунных комплексов у молодых и старых кроликов, которым вводились только ИК, практически одинаков ($4,0 \pm 1,7$ и $4,7 \pm 2,4$ ед. соответственно). Через неделю эксперимента наблюдалось значительное, примерно в 5 раз ($p < 0,02$) увеличение их содержания у животных обеих групп (до $26,4 \pm 4,3$ у молодых и $24,2 \pm 5,5$ ед. у старых). На второй и третьей неделе происходи-

ло снижение уровня ЦИК до исходных величин и новое повышение к концу опыта, хотя и статистически недостоверное (до $20,5 \pm 9,0$ у молодых и $21,5 \pm 9,6$ ед. у старых кроликов). Такая же картина в изменении изучаемого показателя в первые две недели эксперимента наблюдалась у животных, которые помимо ИК получали холестерин.

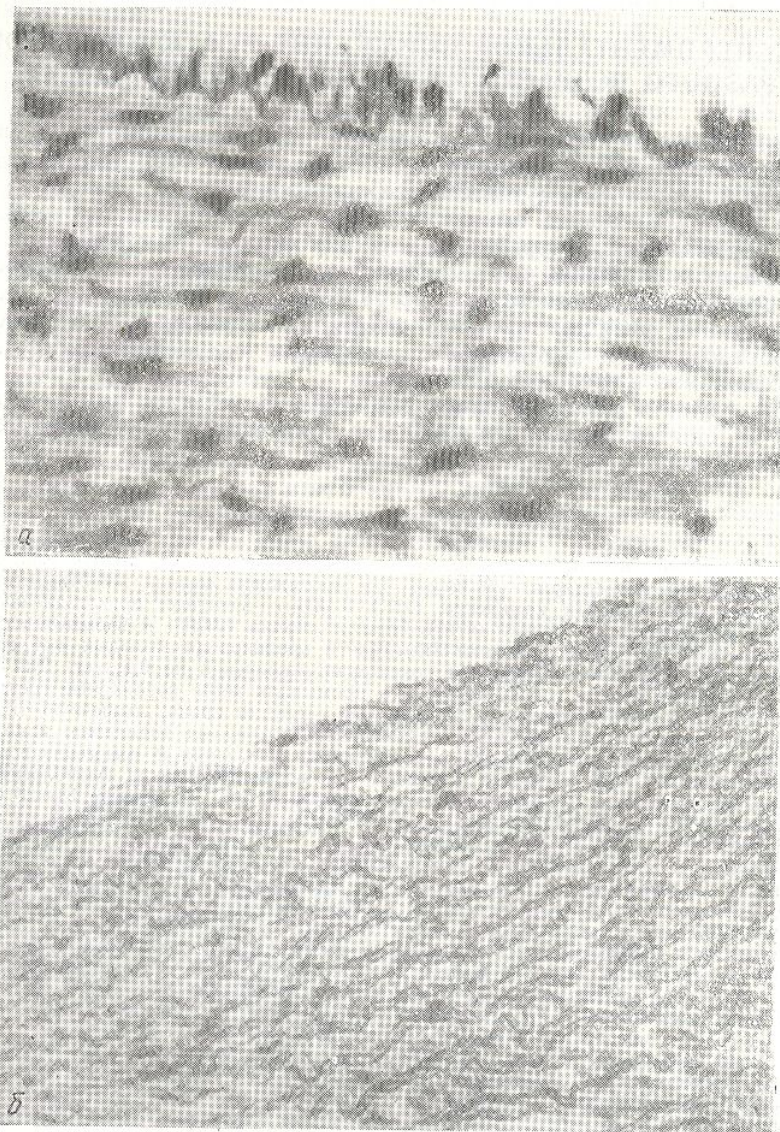


Рис. 1. Участок аорты молодого кролика.

а — после введения ИК наблюдается выбухание в просвет эндотелиальных клеток, отек межклеточного вещества, переориентация гладкомышечных клеток, $\times 200$. б — участок аорты молодого контрольного кролика. $\times 90$. Полутонкие эпоновые срезы. Окраска гематоксилин-эозином.

При морфологическом исследовании аорт кроликов, которым вводили только иммунные комплексы, забитых через месяц от начала эксперимента, на внутренней ее поверхности были обнаружены изменения в виде появления V-образных плоских бляшек в местах отхождения сонных, почечных и вертебральных артерий, нежных и узких

белесоватых полосок на всем протяжении в области дуги.

Тотальная окраска из пяти молодых и



Рис. 2. Часть аорты молодого кролика. Окраска гематоксилин-эозином.

аорты в местах обнаружены пятна и полоски. Лизованы в местах от части аорты. У старых животных выявлены во в интима выпячивания.

При параллельных срезах аорт из участка эозином и жировым красителем и изменения структуры заключались в отеклоновидных выпячиваниях клеток подлежащих слюкодисперсные отложения.

Наиболее глубокие изменения в области бифуркаций сосуда были в более значительных изменениях в образовании бляшек в лежащих дистрофически

белесоватых полосок шириной 0,1—0,2 мм и длиной до 2 см, рассеянных на всем протяжении аорты, и более широких полос — $0,3 \times 1,0$ см — в области дуги.

Тотальная окраска сосудов суданом III—IV показала, что у трех из пяти молодых и у четырех из пяти старых животных на стенке

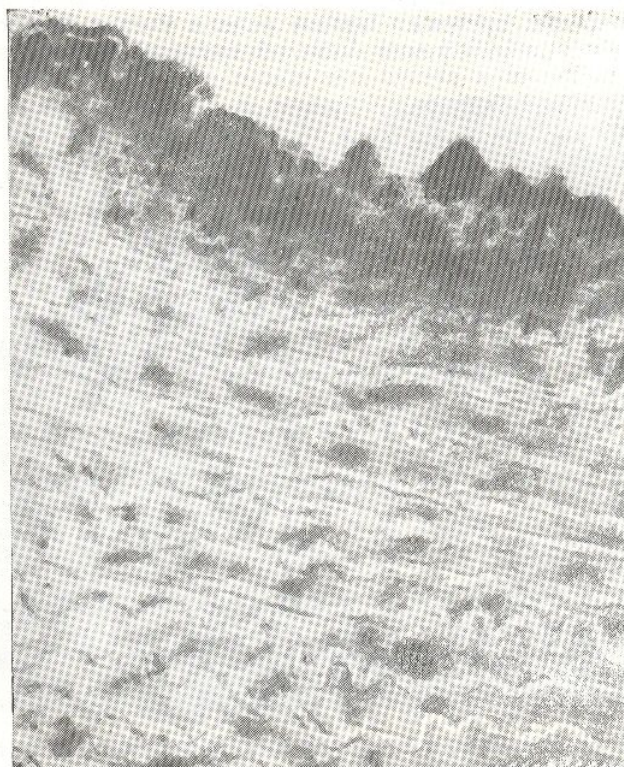


Рис. 2. Часть бляшки инфильтрированной липидами в аорте молодого кролика при введении иммунных комплексов. Окраска гематоксилином и жировым красным «О». $\times 200$.

аорты в местах обнаружения визуальных поражений имеются липидные пятна и полоски. У молодых кроликов эти пятна и полоски локализованы в местах отхождения сосудов и лишь у одного — в грудной части аорты. У старых кроликов диффузные отложения липидов в интиме выявлены во всех 4 случаях.

При параллельных исследованиях парафиновых и замороженных срезов аорт из участков с поражениями, окрашенных гематоксилином и жировым красным «О», было обнаружено накопление липидов и изменения структуры сосудистой стенки. Минимальные нарушения заключались в отеке субинтимы, частокольном расположении и баллоновидных выпячиваниях в просвете сосуда клеток эндотелия, пикнотических изменениях их ядер и переориентации гладкомышечных клеток подлежащих слоев (рис. 1, а). В зонах отека обнаружены мелкодисперсные отложения нейтральных жиров и кристаллы холестерина.

Наиболее глубокие поражения локализовались в дуге аорты и в области бифуркаций сонных и почечных артерий. Последние заключались в более значительном очаговом утолщении и отеке интимы аорты, образовании бляшек высотой от 6 до 120 мкм, состоящих из рыхло лежащих дистрофически измененных гладкомышечных и «пенистых»

клеток, огромного количества детрита, содержащего липиды, обрывки эластических мембран и плазму крови (рис. 2).

Из четырех молодых кроликов, которые помимо ИК получали холестерин, два были забиты через 15 дней после начала эксперимента. При тотальной окраске на липиды аорт этих животных у одного из них были обнаружены V-образные липидные полосы в месте отхождения почечных артерий. Через 4 недели у одного из оставшихся кроликов липидные отложения были обнаружены в области ответвле-

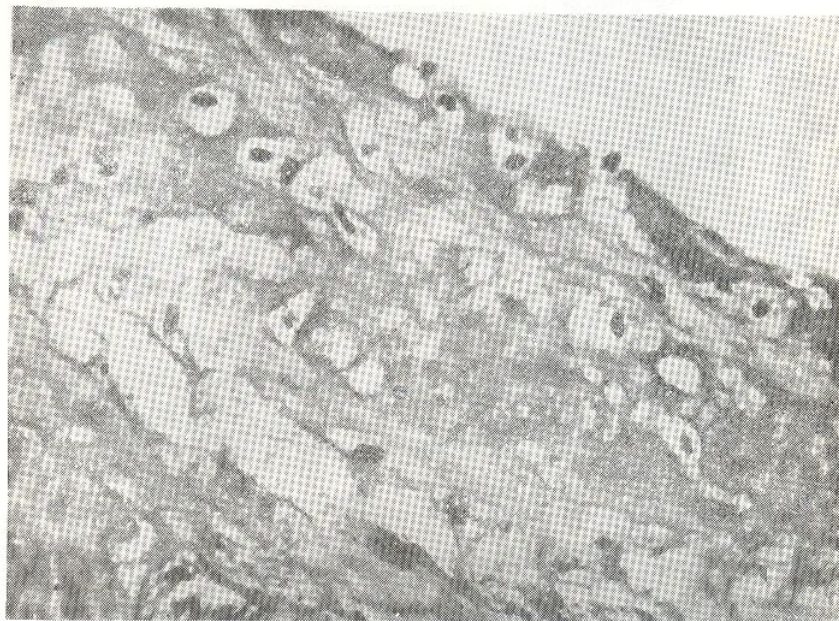


Рис. 3. Часть фибро-липидной бляшки с «пенистыми» клетками в аорте старого кролика, получавшего холестерин в течение 2 нед в период введения иммунных комплексов. Окраска гематоксилин-эозином. $\times 200$.

ний сонных артерий и артерий брюшного отдела аорты. У другого выявлено тотальное поражение интимы, составляющее 38,17 % от общей площади аорты.

Из 4 старых кроликов (ИК+холестерин) один был забит на восьмой день эксперимента. Изменений в аорте у него не обнаружено. Два других забиты через 11 и 14 дней. У этих животных уже в такой ранний срок были выявлены крупные липидные пятна в области отхождения сосудов и диффузное липидное пропитывание остальной части аорты. Площадь поражения у одного из них составляла 14,3 %. У четвертого кролика из этой группы через 4 нед также обнаружены изменения, аналогичные описанным выше.

При морфологическом исследовании зон поражения аорты выявлены липидно-фиброзные бляшки большей протяженности и глубины (до 7—8 слоев гладкомышечных клеток), чем при введении одних иммунных комплексов (рис. 3).

Бляшки, как правило, массивно инфильтрированы липидами, кроме того, отмечено накопление липидов внутри клеток почти по всей толще медиального слоя и обширные очаги дезориентации дистрофически измененных гладкомышечных клеток и дезорганизации межклеточного вещества интимы и медиального слоя аорты за пределами утолщений сосудистой стенки. В бляшках при поляризационной микроскопии выявлялись массивные отложения холестерина.

В литературе к ные и, в меньшей с смиривать как дов в этиологии и пато сосудов.

Было показано, β -липопротеидам ни: большое значение в аутоантитела. Отлож ло — липопроteid п копленню в этом ме гократном введении ни, сыворотки крыс, Фрейнда или больши чительного числа аорты, артерий, арт носили характер ар развивались на фон никали изменения, м блуодаемыми при ат

При иммунохим бляшек аорт челове ных классов (G, A, Высказываниям о к способствовали такж ца в случае их отто изменениям, неотлич поражений [8].

Эксперименталь ных сосудов могут в антител, но и под н Была обнаружена св лезную сердца и н особенно выраженн тельные коррелятив личием некоторых г его осложнениями [7] ных комплексов в п сводится к тому, чт особенно в местах активирова систему к деления большого к рующий артеринт с слоя, полиморфнояд шечных клеток. Пр включением холесте анализа данных лит ние артериальной ст ный ответ на многи пищу, табак), равно важным причинным человека.

Полученные на одних только иммун стенки с накопление нием в местах пора

Сама по себе г к нарушению прони ческих бляшек [2],

В литературе к настоящему времени накоплены экспериментальные и, в меньшей степени, клинические данные, которые можно рассматривать как доказательство роли изменений системы иммунитета в этиологии и патогенезе артерио- и атеросклеротических поражений сосудов.

Было показано, что при нарушении естественной толерантности к β -липопротеидам низкой и очень низкой плотности, которым придается большое значение в развитии атеросклероза [3], могут образовываться аутоантитела. Отложение в сосудистой стенке комплексов аутоантитела — липопротеид приводит к локальному повреждению сосуда и накоплению в этом месте липидов, в том числе и холестерина. При многократном введении кроликам гомогената тканей сердца, аорты, печени, сыворотки крыс, бычьего сывороточного альбумина с адьювантом Фрейнда или больших количеств другого гетерологичного белка у значительного числа животных выявлялись деструктивные изменения аорты, артерий, артериол и мышцы сердца, причем в сосудах они носили характер атеросклероза. В том случае, если эти поражения развивались на фоне алиментарной гиперхолестеринемии, в них возникали изменения, морфологически и по локализации сходные с наблюдаемыми при атеросклерозе человека [8, 12, 13].

При иммунохимическом исследовании элюатов атероматозных бляшек аорт человека обнаруживаются иммуноглобулины всех основных классов (*G, A, M*), а также компоненты комплемента [6, 10]. Высказываниям о каузальной роли нарушений в системе иммунитета способствовали также данные о том, что сосуды трансплантатов сердца в случае их отторжения подвергались резким атеросклеротическим изменениям, неотличимым от естественно развивающихся коронарных поражений [8].

Экспериментальные данные свидетельствуют, что поражения крупных сосудов могут возникнуть не только при действии специфических антител, но и под влиянием неспецифических иммунных комплексов. Была обнаружена связь между частотой заболевания ишемической болезнью сердца и наличием антител к антигенам коровьего молока, особенно выраженная у больных инфарктом миокарда [4, 5]. Положительные коррелятивные взаимоотношения обнаруживаются между наличием некоторых генетических маркеров (*C3-F*) и атеросклерозом с его осложнениями [7]. Приводится ряд доказательств участия иммунных комплексов в поражении сосудов [11]. Основной вывод авторов сводится к тому, что комплексы, откладываясь на стенках сосудов, особенно в местах неблагоприятных в гемодинамическом отношении, активируя систему комплемента и являясь пусковым механизмом выделения большого количества биогенных аминов, вызывают склерозирующий артериит с пролиферацией эндотелия, некроз медиального слоя, полиморфноядерную инфильтрацию, пролиферацию гладкомышечных клеток. При гиперхолестеринемии развиваются бляшки с включением холестерина. На основании собственных исследований и анализа данных литературы [9] сделано заключение, что повреждение артериальной стенки является причиной атеросклероза, а иммунный ответ на многие антигены (инфекционные, вакцины, лекарства, пищу, табак), равно как и антигены собственных тканей, может быть важным причинным фактором в развитии сосудистых заболеваний у человека.

Полученные нами данные подтверждают этот вывод. Введение одних только иммунных комплексов вызывает поражение сосудистой стенки с накоплением липидов внутри клеток и умеренным отложением в местах поражений холестерина.

Сама по себе гиперхолестеринемия у кроликов также приводит к нарушению проницаемости эндотелия и образования атеросклеротических бляшек [2], однако эти поражения развиваются не раньше,

чем через 2 мес от начала кормления животных холестерином в высоких дозах (0,5 г/кг). В наших опытах при сочетанном введении ИК и холестерина (0,1 г/кг) атеросклеротические бляшки возникают уже через 2 нед от начала эксперимента. Таким образом, циркулирующие иммунные комплексы могут явиться пусковым механизмом атеросклеротических поражений аорты, которые усугубляются наличием гиперхолестеринемии. У старых кроликов поражения выражены в большей степени, что указывает на значение в этом процессе репаративных реакций в сосудистой стенке и влияние возрастных изменений в аорте на возникновение атеросклероза.

A. P. Zaichenko, G. V. Korylova, O. P. Naumova, G. M. Butenko

EXPERIMENTAL INJURY OF AORTA BY IMMUNE COMPLEXES IN RABBITS OF VARIOUS AGE

Summary

Preformed immune complexes were administered intravenously to young (8-10 mo) and old (4.0-4.5 yr) rabbits against a background of hypercholesterolemia every second day during 4 weeks. Morphological examination of the aorta in animals receiving immune complexes only revealed lipid-containing plaques and strips. A microscopic study of injured zones showed focal thickenings and edema of the intima, dystrophically altered smooth muscular cells, fragmentation of elastic membranes, intra- and extracellular accumulation of neutral lipids and deposition of cholesterol crystals. Plaques which developed in rabbits as early as after a two-week additional feeding on cholesterol diet are similar to human ones. An increase of animal's age promotes the manifestation of atherosclerotic process.

Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Kiev

Список литературы

1. Гашкова В., Матл И., Кашилик И., Кочандрле В. Циркулирующие комплексы антиген-антитело у больных с иммунокомплексными заболеваниями и после трансплантации почек. — Чехосл. медицина, 1978, № 2, с. 117—122.
2. Горев Н. Н., Кожура И. М., Костюк Л. В. и др. Экспериментальный атеросклероз и возраст. — М.: Медицина, 1972.—208 с.
3. Климов А. Н. Иммунологические аспекты развития атеросклероза. — Вестн. АМН СССР, 1974, № 2, с. 29—36.
4. Davies D. F., Rees B. W., Davies P. T. Cow's milk antibodies and coronary heart disease. — Lancet, 1980, N 8179, p. 1190—1191.
5. Davies D. F. Immunological aspects of atherosclerosis. — Proc. Nutr. Soc., 1976, 35, N 3, p. 293—295.
6. Hollander W., Colombo M. A., Cramsch D. M., Kirkpatrick B. Immunological aspects of atherosclerosis. — Adv. Cardiol., 1974, vol. 13, p. 192—207.
7. Kristensen B. Immunogenetic markers in essential hypertension. — Clin. and Exp. Hypertens, 1981, 3(4), p. 763—774.
8. Minick R. C., Alonso D. R., Rankin L. Role of immunologic arterial injury in atherogenesis. — Thromb. and Haemost., 1978, 39, N 2, p. 304—311.
9. Minick C. R. Immunologic arterio injury in atherogenesis. — Ann. N. Y. Acad. Sci. 1976, N 275, p. 210—227.
10. Parums D., Mitchinson M. J. Demonstration of immunoglobulin in the neighbourhood of advanced atherosclerotic plaques. — Atherosclerosis, 1981, 38, N 1—2, p. 211—216.
11. Poston R. N., Davies D. F. Immunity and inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis. — Ibid., 1974, 19, N 3, p. 353—367.
12. Renais J., Hadjiisky P., Scebat L. Aspects immunologiques de l'atherosclerose. — In: Problemes Actuels Biochimie Application. Paris, 1976, p. 203—210.
13. Van Winkle M., Levi R. Effect of removal of cholesterol diet upon serum sickness-cholesterol-induced atherosclerosis. — J. Exp. Med., 1968, 128, N 3, p. 497—515.

Институт геронтологии
АМН СССР, Киев

Поступила в редакцию
05.02.82

ИЗМЕНЕНИЕ ЛИМФОЦИТОВ

В литературе и белков аллосенсибилизированных органов [5]. При этом аппарат клеточной иммунологической четко показана роль

Вместе с тем д ханизме участия яде цессе формирования что отрицательно за имодействуя с полоз тесняют их из комп тивных гистонов счи ДНК, защищать ее выключать ее из тр сом и более сложн жение [3] о том, что ческие иммунные за стройке функции ген тезу новых compone качественные и коли из звеньев белоксинт лимфоузлов в процес ного ответа на аллоа

Исследования проведен лосенсибилизации воспримого кожного антигена, вт первой инъекции. Выделен хроматина — по [16], гист лиакриламидного геля по пряжении 80—120 В. Доза Электрофоретический спек лиакриламидном геле изу опытных): 1 — интактные вета к алдрантигену на 3 мунного ответа на 3 сут; V Электрофореграммы (Англия). Статистическая раметрического критерия U

Результаты

При выделении с кроликов и разделени вали ряд трудностей, экстракции гистонов и