

Белок S100A8 в атеросклеротических поражениях у человека

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

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. *Введение.* Согласно современным исследованиям, в патогенезе атеросклероза важную роль может играть изменение содержания различных представителей семейства белков S100 при формировании атеросклеротического поражения в сосудистой стенке. Цель работы – изучить содержание мононуклеарных клеток, экспрессирующих белок S100A8, в разных типах атеросклеротических поражений на фоне развития воспалительного процесса в сосудистой стенке при атерогенезе у человека.

Материалы и методы. Иммуногистохимическое и морфометрическое исследование проведено на аутопсийном материале (18 случаев), полученном от лиц, умерших от острой сердечно-сосудистой недостаточности атеросклеротической этиологии. Экспрессия белка S100A8 в сегментах аорты (из района дуги, грудного и брюшного отделов), коронарных артериях и артериях основания мозга – 40 образцов ткани – выявлялась высокочувствительным стрептавидин-биотиновым методом. Сравнительному анализу были подвергнуты нормальные участки артерий, липидные пятна, нестабильные и стабильные атеросклеротические бляшки. Статистический анализ проводился с использованием компьютерной программы Statistica Version 10. Значимость различий между изучаемыми выборками определяли с помощью Т-критерия Стьюдента.

Результаты. В интима нестабильных атеросклеротических поражений обнаружена внутриклеточная локализация белка S100A8. Его экспрессия сосредоточивается преимущественно в цитоплазме макрофагов. В нормальных участках интимы аорты, коронарных артерий, базилярной артерии (*a. basilaris*) и в покрышке стабильных атеросклеротических бляшек внутриклеточная продукция S100A8 минимальна либо отсутствует совсем. В участках сосудистой стенки с экспрессией S100A8 выявляются многочисленные воспалительные мононуклеарноклеточные инфильтраты. По данным морфометрии их содержание в интима нестабильных бляшек статистически значимо превышает аналогичный показатель в интима нормальных участков артерий и стабильных поражений.

Заключение. Выдвигается гипотеза, что белок S100A8 может способствовать активации иммуновоспалительных реакций в сосудистой стенке, которые лежат в основе формирования нестабильных прогрессирующих атеросклеротических поражений, приводящих к развитию острого коронарного синдрома. Дальнейшие исследования могут предоставить больше доказательств, подтверждающих, что S100A8 белки являются перспективной лекарственной мишенью в профилактике и терапии атеросклероза.

Ключевые слова: атерогенез, белок S100A8, нестабильная атеросклеротическая бляшка

Для корреспонденции: Петр Валерьевич Пигаревский. E-mail: pigarevsky@mail.ru

Для цитирования: Пигаревский П.В., Мальцева С.В., Снегова В.А., Давыдова Н.Г., Яковлева О.Г. Белок S100A8 в атеросклеротических поражениях у человека. Клини. эксп. морфология. 2022;11(1):43–49. DOI: 10.31088/CEM2022.11.1.43-49.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 24.03.2021. Получена после рецензирования 20.04.2021. Принята в печать 15.06.2021.

Protein S100A8 in atherosclerotic lesions in humans

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

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Abstract. *Introduction.* In the pathogenesis of atherosclerosis, a change in the content of different proteins in S100 protein family may play an important role in the formation of atherosclerotic lesions in the vascular wall. The aim was to study the content of mononuclear cells expressing protein S100A8 in different types

of atherosclerotic lesions secondary to the development of the inflammatory process in the vascular wall during atherogenesis in humans.

Materials and methods. Immunohistochemical and morphometric studies were performed on autopsy material (18 cases) obtained from patients who died from acute cardiovascular insufficiency of atherosclerotic etiology. We detected the expression of S100A8 protein in the aortic segments (from the arc, thoracic and abdominal regions), coronary arteries, and arteries of the circle of Willis (40 tissue samples) using a highly sensitive two-stage streptavidin-biotin method. Comparative analysis was subjected to normal areas of arteries, lipid stain, and unstable and stable atherosclerotic plaques. We performed a statistical analysis with the computer program Statistica Version 10. The significance of the differences between the samples studied was determined by the Student's T-criterion.

Results. Intracellular localization of S100A8 protein was found in the intima of unstable atherosclerotic lesions. Its expression was mainly concentrated in the cytoplasm of macrophages. Intracellular production of S100A8 was minimal or absent in normal areas of aorta intima, coronary arteries, a. basilaris, and in the cap of stable atherosclerotic plaques. We detected numerous inflammatory mononuclear cell infiltrates in the areas of the vascular wall with S100A8 expression. According to the morphometry, their content in the intima of unstable plaques significantly exceeded the similar rate in the intima of normal areas of arteries and stable lesions.

Conclusion. We hypothesize that protein S100A8 may contribute to the activation of immune-inflammatory reactions in the vascular wall, which are the basis for the formation of unstable progressive atherosclerotic lesions leading to the development of acute coronary syndrome. Further research may provide more evidence to support that S100A8 proteins are a promising drug target in the prevention and therapy of atherosclerosis.

Keywords: atherogenesis, S100A8 protein, unstable atherosclerotic plaque

Corresponding author: Peter V. Pigarevsky. E-mail: pigarevsky@mail.ru

For citation: Pigarevsky P.V., Maltseva S.V., Snegova V.A., Davydova N.G., Yakovleva O.G. Protein S100A8 in atherosclerotic lesions in humans. Clin. exp. morphology. 2022;11(1):43–49 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.1.43-49

Funding. The study was carried out within the framework of state budget funding.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 24.03.2021. **Received in revised form** 20.04.2021. **Accepted** 15.06.2021.

Введение

В настоящее время появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что морфологической основой острого коронарного синдрома (ОКС) являются нестабильные, легкоранимые атеросклеротические бляшки артерий, склонные к изъязвлению, разрыву и последующему тромбозу [1–5]. Единый патогенез всех форм заболевания ОКС, возможно, связан с общим морфологическим субстратом – нестабильной атеросклеротической бляшкой. Однако механизмы развития нестабильных атеросклеротических бляшек, причины их разрыва, а также роль иммуновоспалительных реакций в этом процессе остаются малоизученными.

Согласно современным исследованиям, в патогенезе атеросклероза важную роль может играть изменение содержания различных представителей семейства белков S100 в сосудистой стенке при формировании атеросклеротического поражения. Эти белки экспрессируются в гранулоцитах, моноцитах и макрофагах, но также могут быть индуцированы при активации в других типах клеток, таких как сосудистые эндотелиальные клетки, фибробласты и кератиноциты [6, 7]. Некоторые представители семейства белков S100, связываясь с рецепторами конечных продуктов глубокого гликирования (RAGE), рецеп-

торами-поглопителями (CD36) и Toll-подобными рецепторами 4 (TLR-4), участвуют в клеточном ответе при воспалении в процессе прогрессирования атеросклероза [8]. Показано, в частности, что внутриклеточная продукция S100A8/A9 вызывает миграцию фагоцитов в зону формирования атеросклеротического поражения [9].

Считается, что S100A8/A9 ускоряет атерогенез за счет привлечения и активации нейтрофилов и моноцитов в артериальной стенке, и, возможно, играет центральную роль в сложных взаимодействиях между врожденным иммунитетом и развитием сердечно-сосудистых заболеваний [6]. Отмечается, что увеличенная экспрессия в коронарных артериях S100 A8/A9/A12 вызывает дестабилизацию атеросклеротической бляшки и способствует развитию ОКС [10].

Следует отметить, что в отношении атеросклероза данные литературы основываются преимущественно на клинико-иммунологических и экспериментальных исследованиях. Иммуногистохимический анализ сосудистой стенки человека на предмет обнаружения в ней белка S100A8 отражен в единичных работах и носит фрагментарный характер. И практически отсутствуют работы, посвященные изучению роли этого белка при формировании прогрессирующих, нестабильных атеросклеротических поражений.

Целью нашего исследования было изучение содержания мононуклеарных клеток, экспрессирующих белок S100A8, в разных типах атеросклеротических поражений на фоне развития воспалительного процесса в сосудистой стенке при атерогенезе у человека.

Материалы и методы

Материалом исследования послужили 18 аутопсий, полученных от мужчин в возрасте 63 ± 7 лет, умерших от острой сердечно-сосудистой недостаточности атеросклеротической этиологии. Обязательным условием для отбора материала являлось отсутствие тяжелых сопутствующих заболеваний, способных оказывать воздействие на иммунологическую реактивность.

Исследовали сегменты аорты (из района дуги, грудного и брюшного отделов), коронарные артерии и артерии основания головного мозга (*a. basilaris*) – всего 40 образцов ткани.

Иссеченные кусочки фиксировали в 4% забуференном параформальдегиде. Иммуноморфологическое и микроскопическое исследование проводили на парафиновых и криостатных срезах толщиной 4–6 мкм.

Для верификации типов атеросклеротических поражений с целью отбора нестабильных, обладающих признаками прогрессирующего роста бляшек, проводили окрашивание препаратов на выявление липидов красителем Oil Red O (Dako, Дания).

Степень инфильтрации сосудистой стенки мононуклеарами оценивали на гистологических срезах, окрашенных гематоксилином Майера с докраской водно-спиртовым раствором эозина.

Для определения S100A8 в нестабильных и стабильных атеросклеротических поражениях было проведено иммуногистохимическое исследование высокочувствительным двухступенчатым стрептавидин-биотиновым пероксидазным методом. В качестве первичных использовали кроличьи антитела против белка S100A8 человека (Anti-S100A8 antibody, Sigma-Aldrich, США). Продукт реакции выявляли с помощью готового набора реагентов Cell & Tissue Staining Kit, HRP-DAB System (R&D Systems, США) и хромогена 3,3-диаминобензидина. Докрашивание ядер осуществляли метиловым зеленым (Methyl Green, Dako, США). С целью корректного анализа результата применялся отрицательный контроль по антителам на параллельных срезах: вместо первичных антител наносили используемый разбавитель антител 0,1% фосфатный буфер (pH 7,4), далее окрашивание препаратов проводилось согласно стандартному протоколу.

Морфометрический анализ для выявления степени инфильтрации сосудистой стенки проводили на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Всего исследовано 40 образцов сосудистой стенки. Суммарный подсчет всех мононуклеарных клеток, среди которых преобладающими являлись макрофаги и лимфоциты, осуществлялся в следующих зонах сосудистой стенки: в интиме нормальных участков артерий,

в зонах интимы под липидным пятном, в фиброзной покрышке нестабильных и стабильных бляшек, в их атероматозных ядрах. В каждой зоне определяли численность клеток в 10 полях зрения. Подсчеты проводили без морфометрической сетки при $\times 600$ в микроскопе Olympus CX41 (Olympus, Япония).

Для проверки вариационных рядов на нормальность применяли статистический критерий нормальности Колмогорова–Смирнова. Статистический анализ полученных данных проводился с помощью компьютерной программы Statistica Version 10. Значимость различий между изучаемыми выборками определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента парным методом сравнения выборок.

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

Результаты

При иммуногистохимическом анализе стенки артерий белок S100A8 не выявлялся в интиме нормальных участков аорты, коронарных артерий и артерий основания головного мозга (рис. 1 А). Его не удалось обнаружить ни в эндотелиальных клетках, ни в субэндотелиальном пространстве, ни в более глубоких отделах внутренней оболочки сосудов. В начальных атеросклеротических поражениях – липидных пятнах – либо выявлялись единичные макрофаги, содержащие в своей цитоплазме белок S100A8, преимущественно в поверхностных отделах интимы, либо они отсутствовали совсем.

Противоположная картина наблюдалась в нестабильных атеросклеротических поражениях, причем во всех трех типах изучаемых сосудов. Уже на ранних этапах формирования нестабильной атеросклеротической бляшки в поверхностных отделах ее фиброзной покрышки обнаруживались многочисленные макрофаги, содержащие в своей цитоплазме белок S100A8 (рис. 1 В).

На более поздних стадиях в поврежденной покрышке нестабильных поражений также выявлялись макрофаги, экспрессирующие этот белок (рис. 1 С). Следует отметить, что в атероматозном ядре нестабильных бляшек внутри- и внеклеточные отложения белка S100A8 полностью отсутствовали (рис. 1 D). Не были выявлены они ни в плотной фиброзной покрышке, ни и в других отделах стабильной атеросклеротической бляшки.

Параллельный гистологический анализ стенки этих же сосудов позволил установить, что в местах отложения белка S100A8 в покрышке нестабильных атеросклеротических поражений наблюдаются многочисленные мононуклеарноклеточные инфильтраты, представленные в основном лимфоцитами и макрофагами (рис. 2 А).

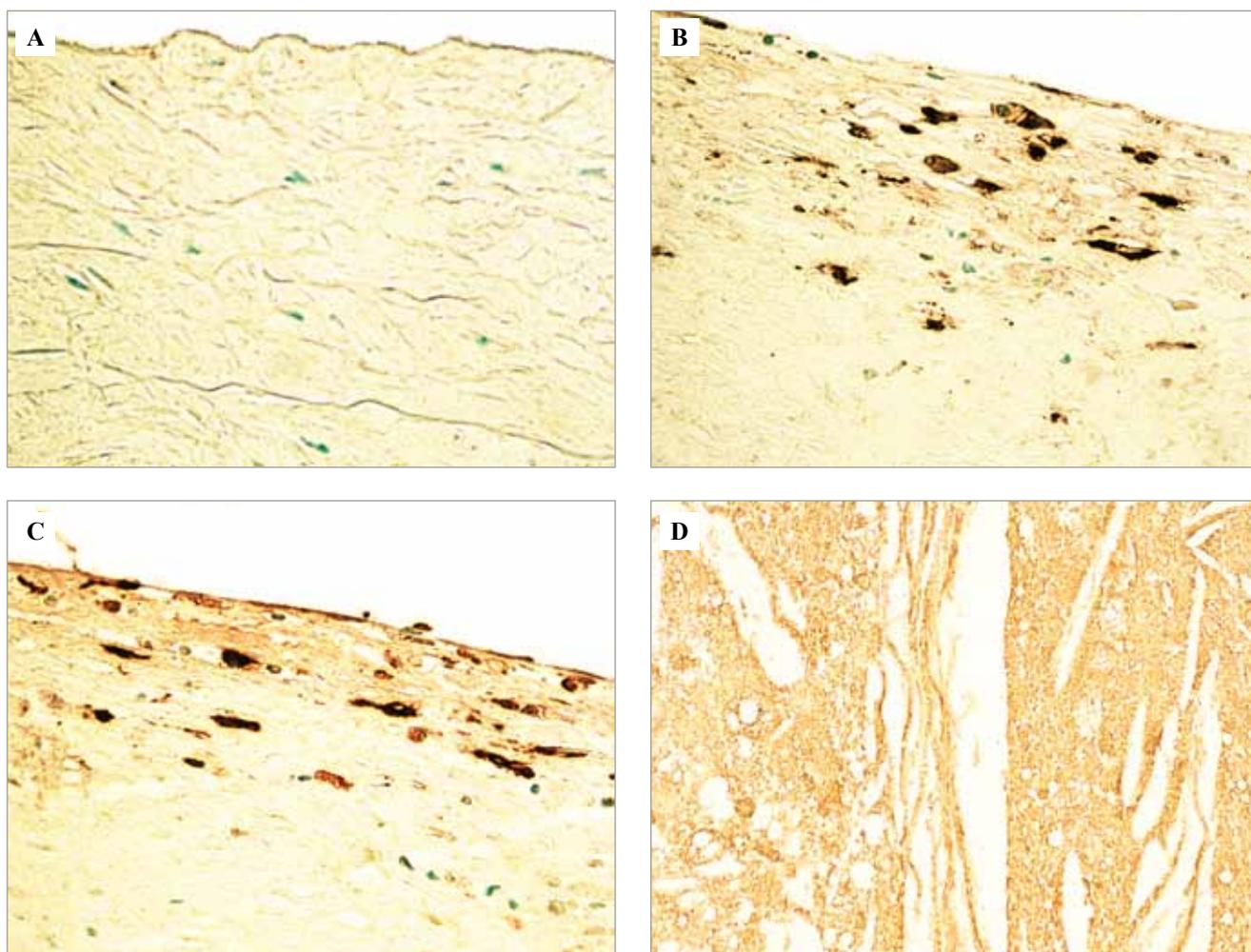


Рис. 1. Белок S100A8 в стенке артерий человека. Иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител к белку S100A8. Визуализация реакции ДАБ, докрасивание ядер метиловым зеленым, $\times 700$

А – отсутствие клеток, экспрессирующих белок S100A8, в нормальном участке интимы аорты человека, В – многочисленные макрофаги, экспрессирующие белок S100A8, в покрышке липидно-фиброзной бляшки и в поврежденной покрышке нестабильной атеросклеротической бляшки (С), D – отсутствие клеток с S100A8 в атероматозном ядре липидно-фиброзной бляшки

Fig. 1. S100A8 protein in the wall of human arteries. Immunohistochemical staining with antibodies to S100A8. DAB, methyl green, $\times 700$

A – no cells expressing S100A8 protein in the normal area of human aortic intima, B – numerous macrophages expressing S100A8 protein in the cap of the lipid-fibrous plaque and the damaged cap of the unstable atherosclerotic plaque (C), D – no cells with S100A8 in the atheromatous core of the lipid-fibrous plaque

Данные морфометрического анализа подтвердили эти наблюдения (рис. 3).

Число мононуклеарных клеток в интиме нестабильного поражения возрастает в 5,7 раза ($p < 0,05$) по сравнению с нормой, в 3,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с интимой стабильной бляшки, а также почти в 1,7 раза по сравнению с начальной стадией поражения (рис. 2 В, 3).

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что отложения белка S100A8 наблюдаются в поврежденной фиброзной покрышке нестабильных атероскле-

ротических поражений, в то время как в нормальных участках интимы изучаемых артерий и в покрышке стабильных атеросклеротических бляшек отложения отсутствуют. Эти данные подтверждают точку зрения, что внутриклеточная продукция S100A8 может вызывать миграцию фагоцитов в зону формирования атеросклеротического поражения, поскольку в покрышке нестабильных поражений обнаруживаются многочисленные макрофаги, экспрессирующие этот белок [9, 11, 12]. Важно, что очаги внутриклеточной локализации белка S100A8 окружены воспалительными мононуклеарноклеточными инфильтратами [13, 14]. Вероятно, белок S100A8 способствует активации им-

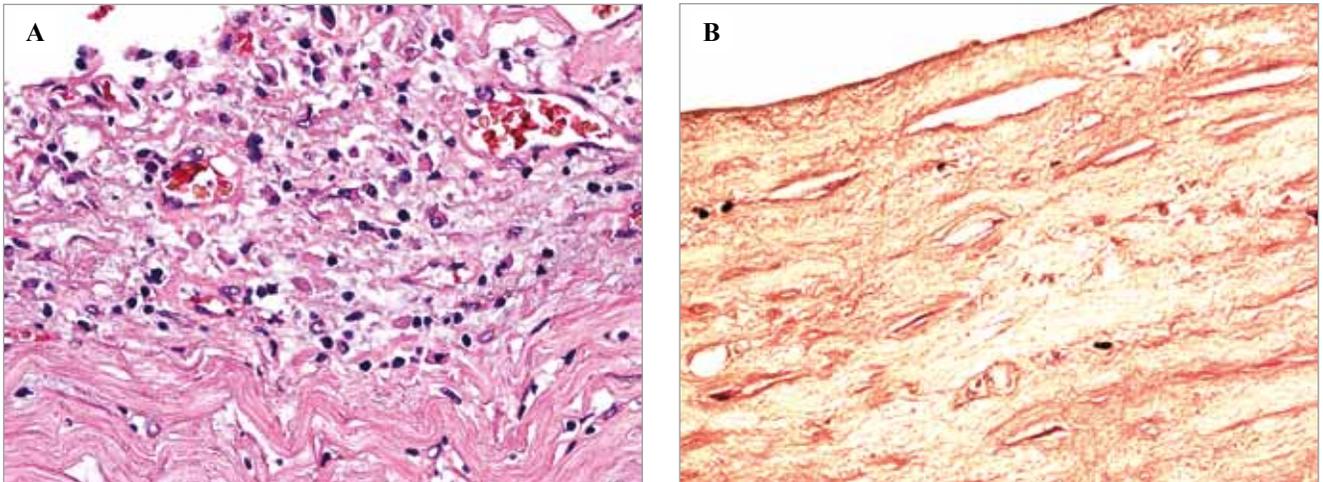


Рис. 2. Клеточные реакции в различных атеросклеротических поражениях. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 700$

А – многочисленные лимфоциты и макрофаги в районе поврежденной покрышки нестабильной атеросклеротической бляшки, В – отсутствие мононуклеарноклеточной инфильтрации в покрышке стабильной атеросклеротической бляшки

Fig. 2. Cellular reactions in various atherosclerotic lesions. H&E stain, $\times 700$

А – numerous lymphocytes and macrophages in the area of the damaged cap of unstable atherosclerotic plaque, В – no mononuclear cell infiltration in the cap of stable atherosclerotic plaque

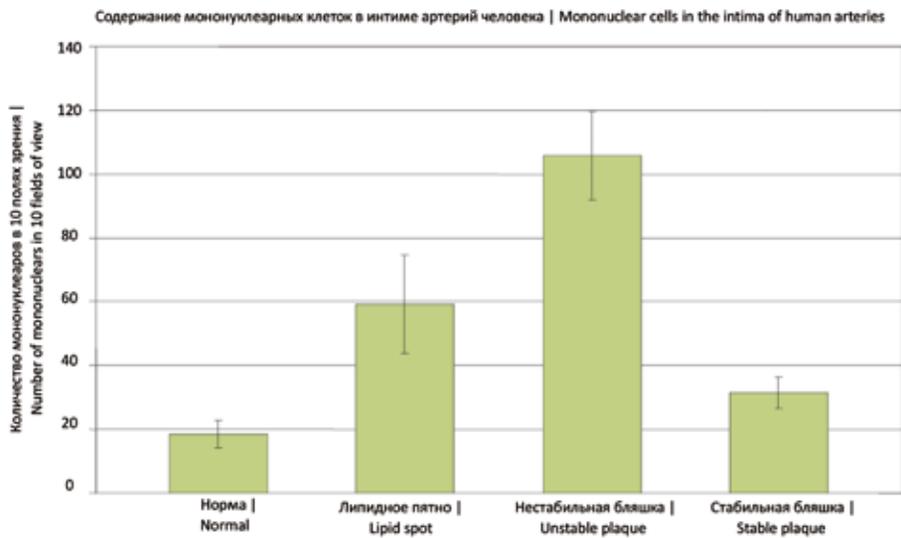


Рис. 3. Количественное содержание мононуклеарных клеток в норме и в различных типах атеросклеротических поражений интимы артерий

Fig. 3. The quantitative content of mononuclear cells in normal and in different types of atherosclerotic lesions of arterial intima

муновоспалительных реакций в сосудистой стенке, которые могут лежать в основе формирования нестабильных прогрессирующих атеросклеротических поражений и способствовать развитию острого инфаркта миокарда [15].

Таким образом, проведенное исследование позволяет расширить представления о роли S100A8 в атерогенезе. Не исключено, что в дальнейшем белки семейства S100A8 можно будет рассматривать в качестве клинического биомаркера и терапевтической мишени при сердечно-сосудистых заболеваниях [9, 16].

Заключение

В интима нестабильных атеросклеротических поражений обнаружена внутриклеточная локализация белка S100A8. Его экспрессия сосредоточивается преимущественно в цитоплазме макрофагов. В нормальных участках интимы аорты, коронарных артерий, *a. basilaris* и в покрышке стабильных атеросклеротических бляшек они отсутствуют. Одновременно в этих же участках сосудистой стенки выявляются многочисленные воспалительные мононуклеарноклеточные инфильтраты.

На основании полученных результатов выдвигается гипотеза, что белок S100A8 может способствовать активации иммуновоспалительных реакций в сосудистой стенке, которые могут лежать в основе формирования нестабильных прогрессирующих атеросклеротических поражений, приводящих к развитию острого коронарного синдрома. Не исключено, что в дальнейшем белки семейства S100 можно будет рассматривать в качестве клинического биомаркера и терапевтической мишени при сердечно-сосудистых заболеваниях.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – П.В. Пигаревский.
Сбор и обработка материала – С.В. Мальцева, В.А. Снегова, Н.Г. Давыдова, О.Г. Яковлева.
Написание текста – П.В. Пигаревский, С.В. Мальцева.
Редактирование – П.В. Пигаревский, С.В. Мальцева, В.А. Снегова, Н.Г. Давыдова, О.Г. Яковлева.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – P.V. Pigarevsky.
Collected the data and performed the analysis – S.V. Maltseva, V.A. Snegova, N.G. Davydova, O.G. Yakovleva.
Wrote the paper – P.V. Pigarevsky, S.V. Maltseva.
Edited the manuscript – P.V. Pigarevsky, S.V. Maltseva, V.A. Snegova, N.G. Davydova, O.G. Yakovleva.

Литература/References

1. *Kakturskii LV*. Clinical morphology of acute coronary syndrome. *Arkh Patol*. 2007;69(4):16–9. PMID: 17926570.
2. *Пигаревский П.В., Мальцева С.В., Снегова В.А.* Прогрессирующие атеросклеротические поражения у человека. Морфологические и иммуновоспалительные аспекты. Цитокины и воспаление. 2013;12(1–2):5–12.
Pigarevsky PV, Maltseva SV, Snegova VA. Progressive atherosclerotic lesions in humans. Morphological and immunoinflammatory aspects. *Cytokines and Inflammation*. 2013;12(1–2):5–12 (In Russ.).
3. *Bhatia V, Bhatia R, Dhindsa S, Virk A*. Vulnerable plaques, inflammation and newer imaging modalities. *J Postgrad Med*. 2003;49(4):361–8. PMID: 14699240.
4. *Shah PK, Wang L, Sharifi B*. Tu-W18:1. New insights into molecular mechanisms of plaque instability. *Atheroscler Suppl*. 2006;7(3):156. DOI: 10.1016/S1567-5688(06)80612-4.
5. *Shah PK*. Pathophysiology of plaque rupture and the concept of plaque stabilization. *Cardiol Clin*. 2003;21(3):303–14. DOI: 10.1016/s0733-8651(03)00058-4.
6. *Miyamoto S, Ueda M, Ikemoto M, Naruko T, Itoh A, Tamaki S et al*. Increased serum levels and expression of S100A8/A9 complex in infiltrated neutrophils in atherosclerotic plaque of unstable angina. *Heart*. 2008;94(8):1002–7. DOI: 10.1136/hrt.2007.121640.
7. *Domschke G, Gleissner CA*. CXCL4-induced macrophages in human atherosclerosis. *Cytokine*. 2019;122:154141. DOI: 10.1016/j.cyto.2017.08.021.
8. *Xiao X, Yang C, Qu SL, Shao YD, Zhou CY, Chao R et al*. S100 proteins in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2020;502:293–304. DOI: 10.1016/j.cca.2019.11.019.
9. *Schiopu A, Cotoi OS*. S100A8 and S100A9: DAMPs at the crossroads between innate immunity, traditional risk factors, and cardiovascular disease. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:828354. DOI: 10.1155/2013/828354.
10. *Buyukterzi Z, Can U, Alpaydin S, Guzelant A, Karaarslan S, Kocyigit D et al*. Enhanced S100A9 and S100A12 expression in acute coronary syndrome. *Biomark Med*. 2017;11(3):229–37. DOI: 10.2217/bmm-2016-0253.
11. *Erbel C, Wolf A, Lasitschka F, Linden F, Domschke G, Akhavanpoor M et al*. Prevalence of M4 macrophages within human coronary atherosclerotic plaques is associated with features of plaque instability. *Int J Cardiol*. 2015;186:219–25. DOI: 10.1016/j.ij-card.2015.03.151.
12. *Xia C, Braunstein Z, Toomey AC, Zhong J, Rao X*. S100 Proteins as an important regulator of macrophage inflammation. *Front Immunol*. 2018;8:1908. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01908.
13. *Пигаревский П.В.* Атеросклероз. Нестабильная атеросклеротическая бляшка (иммуноморфологическое исследование): Атлас. Санкт-Петербург: СпецЛит, 2018. 148 с.
Pigarevskiy PV. Atherosclerosis. Unstable atherosclerotic plaque (immunomorphological study): Atlas. Saint Petersburg: SpecLit, 2018. 148 p. (In Russ.).
14. *Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J*. S100A8/A9 in inflammation. *Front Immunol*. 2018;9:1298. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01298.
15. *Katashima T, Naruko T, Terasaki F, Fujita M, Otsuka K, Murakami S et al*. Enhanced expression of the S100A8/A9 complex in acute myocardial infarction patients. *Circ J*. 2010;74(4):741–8. DOI: 10.1253/circj.cj-09-0564.
16. *Cai ZL, Xie Q, Hu T, Yao Q, Zhao J, Wu Q et al*. S100A8/A9 in myocardial infarction: A promising biomarker and therapeutic target. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:603902. DOI: 10.3389/fcell.2020.603902.

Информация об авторах

Петр Валерьевич Пигаревский – доктор биологических наук, заведующий отделом общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины.

Светлана Владимировна Мальцева – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины.

Влада Андреевна Снегова – научный сотрудник отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины.

Наталья Геннадьевна Давыдова – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины.

Ольга Геннадьевна Яковлева – научный сотрудник отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины.

Author information

Peter V. Pigarevsky – Dr. Sci. (Biol.), Head of the Department of General and Special Morphology, Institute of Experimental Medicine.
<https://orcid.org/0000-0002-5906-6771>

Svetlana V. Maltseva – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Department of General Morphology, Institute of Experimental Medicine.
<https://orcid.org/0000-0001-7680-8485>

Vlada A. Snegova – Researcher, Department of General and Special Morphology, Institute of Experimental Medicine.
<https://orcid.org/0000-0002-9925-2886>

Natalya G. Davydova – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Department of General and Special Morphology, Institute of Experimental Medicine.
<http://orcid.org/0000-0002-4522-6789>

Olga G. Yakovleva – Researcher, Department of General and Special Morphology, Institute of Experimental Medicine.
<http://orcid.org/0000-0002-6248-9468>