

Н. А. Юзефович

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ЛАМИНИНА В СРЕДНЕЙ ОБОЛОЧКЕ СТЕНКИ АОРТЫ В НОРМЕ И ПРИ АНЕВРИЗМЕ БРЮШНОГО ОТДЕЛА АОРТЫ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Методом иммуногистохимии определен ламинин в средней оболочке стенки брюшного отдела аорты человека в норме в возрастных группах с 1 года до 70 лет у лиц мужского и женского пола и проведен морфометрический анализ количественных параметров его экспрессии. Изучена экспрессия ламинина в разных возрастных группах у мужчин и женщин и установлен характер ее изменений с возрастом в норме. Изучены показатели удельной площади ламинина в средней оболочке стенки аорты на границе с аневризматически измененной зоной. Проведен сравнительный анализ изменений экспрессии ламинина в норме и в пограничной с аневризмой зоне. На основе полученных количественных данных проведен регрессионный анализ.

Ключевые слова: ламинин, аорта, аневризма аорты, регрессионный анализ.

N. A. Yuzefovich

FEATURE OF THE EXPRESSION OF LAMININ IN AN AORTIC MEDIA IN NORMAL AND ABDOMINAL AORTIC ANEURYSM

The using a method of immunohistochemistry allowed to determine an expression of laminin in abdominal part of an aortic media in normal in age groups from 1 to 70 years at men and women was determined. The laminin expression in different age groups at men and women was studied and the nature of its changes in normal in different age groups was established. Indicators of the specific area of laminin in aortic media on border from an aneurysm was studied. The comparative analysis of changes of an expression of laminin in normal and in a zone, bordering with aneurism, was carried out. On the basis of the obtained quantitative data the regression analysis was carried out.

Keywords: laminin, aorta, aortic aneurysm, regression analysis.

Лами́нин является наиболее распространённым неколлагеновым гликопротеином, входящим в состав базальных мембран. Он взаимодействует со всеми структурными компонентами базальных мембран, включая коллаген IV типа, нидоген, фибронектин и др. Кроме того, молекула ламинина имеет несколько центров связывания с клетками и выполняет роль адгезионного белка для различных эпителиальных и мезенхимальных клеток.

Главные функции ламинина, как одного из основных белков экстрацеллюлярного матрикса, определяются его способностью не только связывать клетки, но и модулировать клеточное поведение, обеспечивая тканевой гомеостаз. Он может влиять на рост, морфологию, дифференцировку и подвижность клеток [4, 8]. Так, в сосудистой стенке активированные гладкомышечные клетки при смене сократительного фенотипа на синтетический теряют свои базальные мембраны. Это сопровождается снижением экспрессии ламинина [5, 9]. Возврат гладкомышечных клеток к сократительному фенотипу сопровождается восстановлением базальной мембраны. Также показана роль ламинина в процессе образования сократительных гладкомышечных клеток *in vitro* и изменение активности его экспрессии при патологических процессах в восходящей аорте [1–3, 6, 7]. Таким образом, ламинин может

расслоения при аневризмах брюшного отдела аорты. Нас заинтересовала экспрессия ламинина в стенке брюшного отдела аорты в разные возрастные периоды у мужчин и женщин в норме и при развитии такого патологического процесса, как аневризма брюшного отдела аорты (исследовалась пограничная с аневризматическим участком зона).

Цель и задачи исследования – оценить особенности и проанализировать возрастную динамику экспрессии ламинина в средней оболочке стенки аорты в норме и в пограничной аневризме зоне.

Материалы и методы

Работа выполнена на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Белорусский государственный медицинский университет». Материалом для исследования послужили гистологические препараты аутопсийного материала стенки брюшного отдела аорты 29 человек в возрасте от 1 года до 70 лет без системных заболеваний соединительной ткани, без установленной в анамнезе патологии сердечно-сосудистой системы, умершие от причин, не связанных с патологией аорты, крупных артериальных сосудов и сердца, и 5 человек с аневризмой брюшной части аорты (табл. 1).

Таблица 1. Материалы исследования

Возраст, лет	Количество случаев норма (м/ж)	Количество случаев патологии (м/ж)	Количество полей зрения на 1 случай	Количество полей зрения в возрастной группе
1–15	8 (4/4)	–	30	240
16–40	9 (5/4)	–	30	270
41–70 норма 61–91 патология	12 (6/6)	5 (4/1)	30	510
Всего	29	5	–	1020

быть использован как маркер для демонстрации морфологических изменений базальных мембран, а его динамика в средней оболочке стенки аорты – отражать смену фенотипа гладкомышечных клеток.

Прогрессирование патологического процесса при аневризме брюшного отдела аорты определяется многими факторами. До конца остается неясным, что является ключевым фактором, обеспечивающим целостность сосудистой стенки в норме и определяющим прогрессирование

Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина 1 сутки, после проводки заливали в парафин. Готовили срезы толщиной 3 мкм. Иммуногистохимический анализ проводился с использованием первичного антитела Rabbit Polyclonal Anti-Laminin, которое избирательно и специфически узнает и связывает ламинин базальных мембран. Контрастирование ядер осуществлялось гематоксилином Майера. Морфометрический анализ проводился с использованием программного

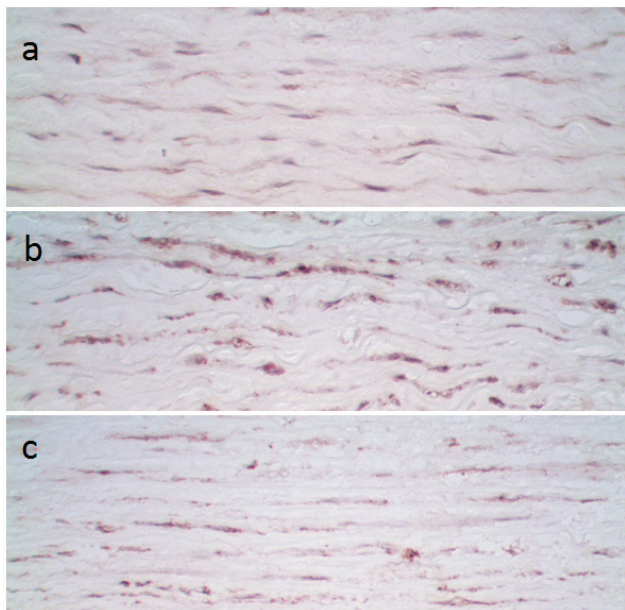


Рис. 1. Экспрессия ламинина в средней оболочке аорты: а – 7 лет, женщина, б – 29 лет, женщина, с – 64 года, женщина. Объектив 40×

морфометрического пакета ImageJ. Проводилось вычисление удельной площади окрашенных участков в средней оболочке аорты в норме. При исследовании патологического материала измерения проводились в пограничной с аневризмой зоне. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения для описательной статистики и выявления достоверности отличий использовались непараметрические методы статистической обработки данных. Значения показателей представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха между 25-й и 75-й перцентиллями. Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Данные обработаны в программе STATISTICA 10 непараметрическими методами. Для значений удельной площади ламинина в норме и в пограничной зоне проводился регрессионный анализ.

Результаты и обсуждение

Светомикроскопическое исследование гистологических препаратов стенки аорты в норме выявило неодинаковую экспрессию ламинина в разных возрастных группах. (рис.1). Связываясь с ламинином базальных мембран, формирующихся вокруг гладких миоцитов, окрашенные участки вытягивались в экстрацеллюлярном матриксе между эластическими мембранами, напоминая очертания гладкомышечных клеток. При этом большее количество и более интенсивная окраска участков отмечалось в возрасте около 40 лет.

Для объективизации данных мы определяли удельную площадь ламинина. Отмечалось постепенное увеличение значений с 1 года до 40 лет, после чего значения данного показателя стали уменьшаться (рис. 2). Максимальные значения при сохранении вариационного разброса отмечались как у мужчин, так и у женщин в возрасте около 40 лет.

Учитывая характер возрастной динамики удельной площади ламинина у мужчин и женщин (рис. 2), мы сравнили соседние возрастные группы, при этом для мужчин выбрали группы 1–15, 16–40, и 41–70 лет, для женщин – 1–25, 26–45 и 46–70 лет. Сравнение по критерию Манна-Уитни выявило достоверные отличия между младшей и средней возрастными группами у мужчин и у женщин (табл. 2). Это, вероятно, свидетельствует о том, что у мужчин процессы изменения фенотипа гладких миоцитов начинаются раньше, чем у женщин.

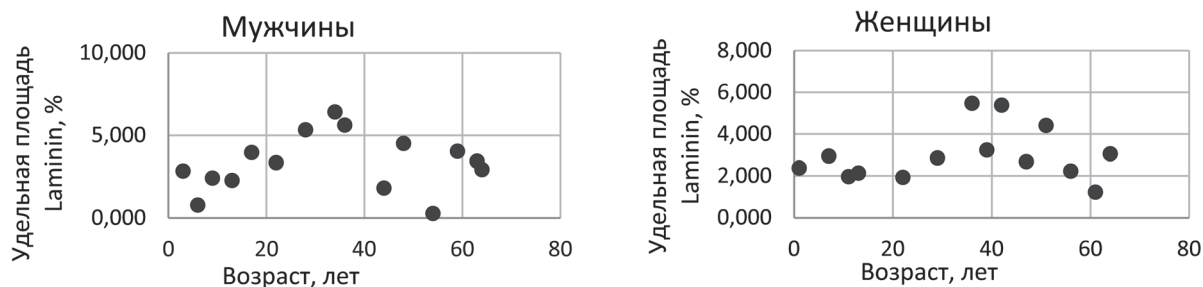


Рис. 2. Удельная площадь Laminin в средней оболочке аорты у мужчин и женщин

Таблица 2. Критерий Манна-Уитни для сравнения 3 возрастных групп по удельной площади ламинина в средней оболочке стенки аорты у мужчин и женщин

Возрастные группы, лет	Удельная площадь ламинина (%) у мужчин, Ме (25%-75%)		Уровень значимости различий (p)
	Me	25%-75%	
1-15/16-40	2,352 (1,536-2,637)	5,338 (3,967-5,622)	0,02
16-40/41-70	5,338 (3,967-5,622)	3,191 (1,82-4,042)	>0,05
	Удельная площадь ламинина (%) у женщин, Ме (25%-75%)		
1-25/26-45	2,352 (1,536-2,637)	4,312 (3,049-5,43)	0,037
26-45/46-70	4,312 (3,049-5,43)	2,682 (2,234-3,057)	>0,05

Так как временные рамки достоверных изменений удельной площади ламинина у мужчин и женщин не одинаковы, мы сравнили значения признака между мужчинами и женщинами в одинаковых возрастных группах (табл. 3). Достоверных отличий между значениями удельной площади ламинина у мужчин и женщин внутри каждой возрастной группы не обнаружилось, поэтому для проведения регрессионного анализа мы сформировали общие возрастные группы.

Регрессионный анализ выявил зависимость между возрастом и значениями удельной площади ламинина (рис. 3).

В результате построения регрессионной модели была получена формула $Lam = 1,37847 + 0,149121 \cdot A - 0,00208677 \cdot A^2$, позволяющая рассчитать удельную площадь ламинина в зависимости от возраста (где **Lam** – удельная площадь ламинина в меди аорты, **A** – возраст). Так как при проведении дисперсионного анализа значение $p < 0,01$, статистически достоверная связь между возрастом и удельной площадью ламинина в данной формуле составила 99%.

Кривая динамики удельной площади ламинина, и регрессионная кривая указывают, что в детском возрасте экспрессия ламинина имеет

Таблица 3. Значения удельной площади ламинина

Возраст, лет	Удельная площадь ламинина, %				Статистическая значимость различий
	мужчины		женщины		
	Me	25%-75% интер-квартильный размах	Me	25%-75% интер-квартильный размах	Уровень значимости (p)
1-15	2,352	1,536-2,637	2,26	2,055-2,665	>0,05
1-25	2,637	2,281-3,354	2,139	1,97-2,38	>0,05
16-40	5,338	3,967-5,622	3,239	2,859-5,385	>0,05
26-45	5,48	3,579-6,02	4,312	3,049-5,43	>0,05
41-70	3,191	1,82-4,042	2,869	2,234-4,414	>0,05
46-70	3,446	2,937-4,042	2,682	2,234-3,057	>0,05

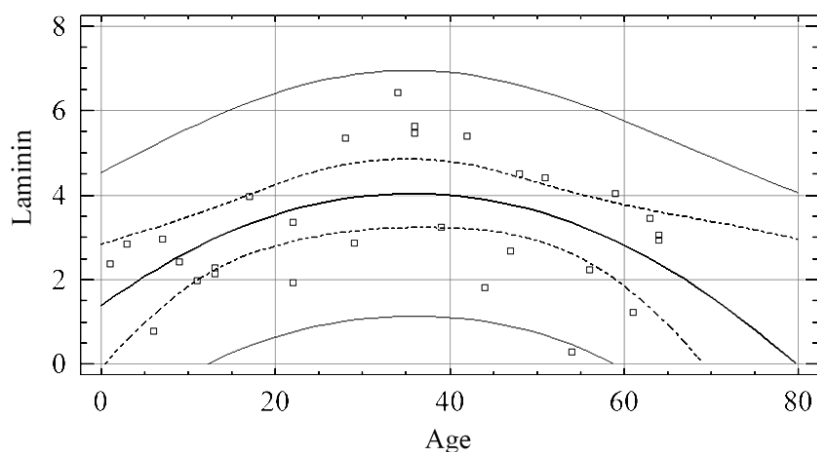


Рис. 3. Модель зависимости удельной площади ламинина от возраста

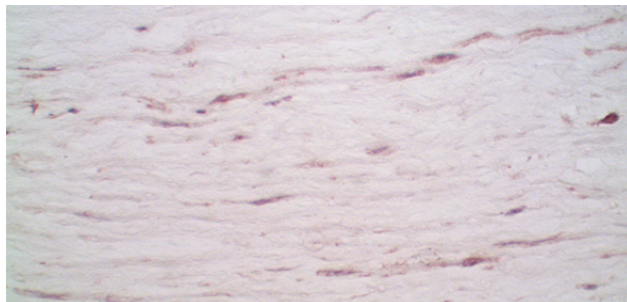


Рис. 4. Экспрессия ламинина в пограничной с аневризмой зоне средней оболочки аорты: 74 лет, мужчина. Объектив 40×

достовечно меньшие значения, чем в старшем возрасте. Следовательно, в детском возрасте количество сократительных гладких мышечных клеток ниже, что косвенно свидетельствует о превалировании секреторного фенотипа гладких миоцитов. В среднем возрасте показатели экспрессии ламинина максимальны, что говорит о максимальном количестве сократительных гладких миоцитов в этот период. Несмотря на отсутствие достоверных отличий в старшей возрастной группе от средней (что, видимо, связано с большим разбросом значений), после 40 лет отмечается явная тенденция к снижению экспрессии ламинина. Это вновь косвенно указывает на увеличение секреторного фенотипа в ходе адаптивных возрастных изменений, сопровождающих процессы физиологического старения сосудистой стенки и инициации процессов деградации компонентов экстрацеллюлярного матрикса.

Аневризма аорты характеризуется распрямлением и расщеплением эластических мембран, расширением межмембранных пространств и деградацией компонентов экстрацеллюлярно-

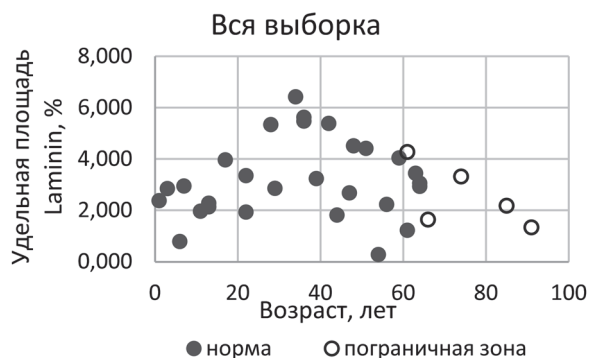


Рис. 5. Значения удельной площади Laminin в норме и патологии в средней оболочке аорты

торое отразит изменение фенотипа гладких миоцитов. Поэтому мы изучили срезы стенки аорты, расположенные рядом с аневризматически измененным участком (рис.4). На светомикроскопическом уровне гистологический препарат пограничной зоны не отличался от препарата нормальной аорты соответствующей возрастной группы по экспрессии ламинина.

В связи с этим мы проанализировали характеристики экспрессии ламинина в пограничной зоне количественными методами.

Для выявления отличий удельной площади ламинина в норме и в пограничном участке мы отобрали их на одном графике (рис. 5). Изменения значений экспрессии ламинина в обоих вариантах оказались сходными: отмечалось постепенное снижение этого показателя с возрастом.

Так как значения показателей удельной площади ламинина сохраняют тенденции распределения нормальных значений, мы сравнили старшую возрастную группу нормальной выборки и группу значений пограничной с аневризмой зоны. Статистически значимых различий признака выявлено не было (табл.4).

Таблица 4. Критерий Манна-Уитни для сравнения 2 групп (старшей возрастной группы в норме и в пограничной зоне) по удельной площади ламинина в средней оболочке стенки аорты

Удельная площадь, %	Норма	Пограничная зона	Уровень значимости различий (p)
	50–70 лет, Me (25%–75%)	61–91 лет, Me (25%–75%)	
Laminin	2,997 (1,731–3,744)	2,183 (1,644–3,319)	>0,05

го матрикса. Если одним из факторов расслоения стенки аорты при аневризме является нарушение синтеза компонентов экстрацеллюлярного матрикса, то в пограничной зоне мы должны наблюдать изменение экспрессии ламинина, ко-

Более того, если подставить значения удельной площади ламинина в регрессионную кривую, описывающую изменения этого показателя в норме, то они не выходят за границу нормальных значений (рис. 6).

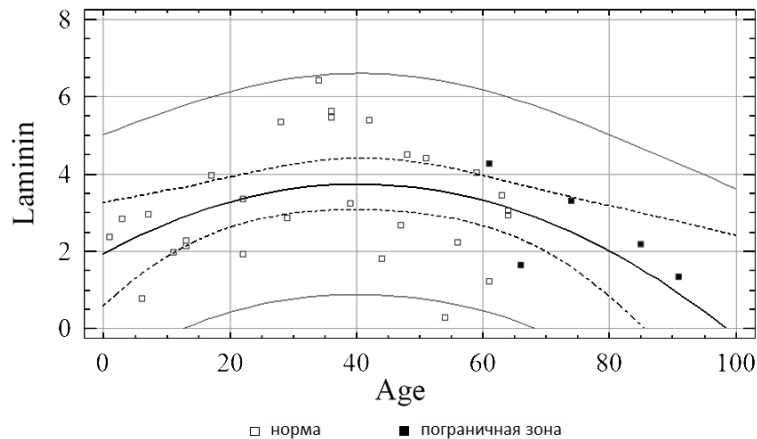


Рис. 6. Модель зависимости удельной площади ламинина в норме и пограничной с патологией зоне от возраста

Если дополнить основные данные из нормального участка аорты данными из пограничной зоны аневризмы, то получим следующую зависимость удельной площади ламинина от возраста: $Lam = 1,93116 + 0,0894737 * A - 0,00110664 * A^2$, (где **Lam** – удельная площадь ламинина (в%) в меди аорты, **A** – возраст). Заметно, во-первых, что тип модели, количество членов в уравнении и знаки коэффициентов при членах полинома после добавления новых данных не изменились. Во-вторых, константа в новом уравнении существенно увеличена (1,93116 против 1,37847) по сравнению с предыдущим. В то же время снижены значения коэффициентов при переменных **A** и **A**² (0,0894737 против 0,149121 и 0,00110664 против 0,00208677, соответственно). Это свидетельствует о лучшей согласованности новой модели с эмпирическими данными, по сравнению с предыдущей.

Таким образом, динамика показателей удельной площади ламинина в норме и в пограничной с аневризмой зоне полностью вписываются в одну регрессионную модель. Значения удельной площади ламинина не меняются и, видимо, не играют ключевой роли в патогенезе расслоения.

Выводы

1. Возрастная динамика экспрессии ламинина в средней оболочке стенки нормальной аорты отличаются у мужчин и у женщин. Значения удельной площади ламинина достоверно увеличиваются у мужчин после 15 лет; у женщин – после 25. После указанного возраста независимо от пола этот показатель не изме-

няется до 40 лет, а после 40 лет отмечается тенденция к его снижению.

2. Значения удельной площади ламинина в пограничной с аневризмой зоне схожи с таковыми в нормальной аорте в старшей возрастной группе.

3. Регрессионный анализ позволил получить следующую зависимость удельной площади ламинина в норме и в пограничной с аневризмой зоне от возраста: $Laminin = 1,93116 + 0,0894737 * Age - 0,00110664 * Age^2$, и подтвердил общие тенденции возрастных изменений данного показателя, что свидетельствует о том, что ламинин не играет ключевой роли в патогенезе развития аневризм брюшного отдела аорты.

Литература

1. Della Corte A, De Santo LS, Montagnani S et al. Spatial patterns of matrix protein expression in dilated ascending aorta with aortic regurgitation: congenital bicuspid valve versus Marfan's syndrome. 2006 Jan;15(1):20-7.
2. Cotrufo M, De Santo L, Della Corte A, et al. Basal lamina structural alterations in human asymmetric aneurismatic aorta. Eur J Histochem. 2005;49(4):363-70.
3. Hayward I. P., Bridle K. R., Campbell G. R., et al. Effect of extracellular-matrix proteins on vascular smooth-muscle cell phenotype. Cell Biol.Int.1995;19:839-846
4. Hedin U., Bottger B. A., Forsberg E., et al. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth-muscle cells. J Cell Biol 1988;107:307-319.
5. Hedin, U., Roy, J., Tran, P. K., Lundmark, K., and Rahman, A. Control of smooth muscle cell proliferation--the role of the basement membrane. Thromb Haemost 1999; 82 Suppl 1, 23-26.
6. Hedin U., Thyberg J., Roy J., et al. Role of tyrosine kinases in extracellular matrix-mediated modulation of ar-

☆ Краткие сообщения

terial smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;**17**:1977-1984.

7. Li X. M., Tsai P., Wieder E. D., et al. Vascular smooth-muscle cells grown on matrigel – a model of the contractile phenotype with decreased activation of mitogen-activated protein-kinase. *J Biol Chem* 1994;**269**:19653-19658.

8. Thyberg J., Blomgren K., Roy J., et al. Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J Histochem Cytochem* 1997;**45**:837-846.

9. Thyberg J., Hedin U., Sjolund M., et al. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth-muscle cells. *Arteriosclerosis* 1990;**10**:966-990.

Благодарность за помощь в подборе гистологического материала:

1. Юдина Ольга Анатольевна. Заведующая патологоанатомическим отделением общей патологии №1 «ГКПАБ» г. Минска, ул. Семашко 8.

2. Бойко Марьяна Юрьевна. Врач-патологоанатом «ГКПАБ г.Минска «Отделение детской патологии»», ул. Кижеватова 60, г. Минск, Беларусь.

3. Русак Николай Иосифович. Заместитель начальника «УЗ Минское областное патологоанатомическое бюро», Минский район, агрогородок «Лесной».

Поступила 23.05.2017 г.