

Клеточные сети интимы аорты и гомеостаз кровеносных сосудов

Ю. В. Бобрышев¹, В.П. Карагодин¹, М. М. Мойсенович¹, М. А. Гаврилин¹, А.А. Мельниченко¹, В.А.Орехова¹, Е. Н. Бородачев¹, И.А.Собенин², А.Н. Орехов^{1,2}

¹НИИ атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Россия, 143025, Москва, ул. Новая, д.100; тел. +7 (495)4120113, +7(495)4121557, office@inat.ru,

²Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8, тел. +7(499)6012181, niiopp@mail.ru

Резюме

Архитектоника и клеточный состав больших артерий человека изучены недостаточно. В настоящей работе впервые предпринята попытка анализа дистрибьюции и количества клеток, экспрессирующих HLA-DR в визуально непораженной интиме человека с использованием методов иммуногистохимии и иммунофлуоресценции, дополненных конфокальной микроскопией. Обнаружено широкое распространение клеток, экспрессирующих HLA-DR, на протяжении зон интимы, содержащих клеточные сети с длинными отростками. Количество HLA-DR+ клеток было значительно выше в срединной трети интимы по сравнению с поверхностной и глубинной частями. Предполагается, что широкое распространение клеток, экспрессирующих HLA-DR, в интиме нормальной аорты человека может играть роль в контроле и поддержании гомеостаза сосудов.

Ключевые слова: аорта, HLA-DR, атеросклероз

The human aorta cellular network and maintenance of vascular homeostasis

Y.V.Bobryshev, V.P.Karagodin, M.M. Moysenovich, M.A.Gavrilin, A.A. Melnichenko, V.A. Orekhova, E.N. Borodachev, I.A. Sobenin, A.N.Orekhov

¹Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center, 143025, 100 Novaya Str., Moscow, Russia

²Institute of General Pathology and Pathophysiology: 8 Baltiyskaya Str., 125315, Moscow, Russia.

Abstract

The architectonics and cell composition of the human large arteries are not sufficiently understood. The present study is the first to undertake an analysis of the distribution and quantities of HLA-DR-expressing cells in grossly undiseased human intima using immunohistochemical and immunofluorescent analysis, complemented by the advantages of confocal microscopy. The study revealed a widespread distribution of HLA-DR-expressing cells throughout the intimal space where the cells were integrated into continuous networks via long cell processes. Numbers of HLA-DR+ cells were found to be significantly larger in the middle third of the intima than in the superficial and deep intimal portions. We speculate that a widespread distribution of HLA-DR-expressing cells in the intima of normal human aorta might play a role in the surveillance and maintenance of vascular homeostasis.

Keywords: aorta; intima; HLA-DR; atherosclerosis

ВВЕДЕНИЕ

HLA-DR представляет собой молекулу главного комплекса гистосовместимости класса II (МНСII) (Handunnetthi et al., 2010; Nielsen et al., 2010). Эта молекула экспрессируется антиген-представляющими клетками (АПК) (Geissmann et al., 2010; Handunnetthi et al., 2010; Nielsen et al., 2010). HLA-DR играет решающую роль в презентации белков-антигенов CD4+ Т-лимфоцитам. Презентация антигена с помощью МНСII является ключевым событием специфического иммунного ответа, необходимого для начала продукции антиген-специфических антител, а также для активации зависимых от клеток цитотоксических механизмов (Geissmann et al., 2010; Lotze and Thomson, 2001).

Семейство АПК включает макрофаги, лимфоциты и дендритные клетки (Geissmann et al., 2010; Lotze and Thomson, 2001). Дендритные клетки являются наиболее мощными АПК, часто упоминаемыми как профессиональные АПК, в то время как макрофаги и лимфоциты характеризуются как полупрофессиональные АПК (Geissmann et al., Nielsen et al., 2010; Lotze and Thomson, 2001). Макрофаги, В-лимфоциты и дендритные клетки являются клетками гематогенного происхождения (Geissmann et al., 2010; Lotze and Thomson, 2001). Наряду с этими клетками гематогенного происхождения, эпителиальные клетки тимуса, которые не являются клетками гематогенного происхождения, также могут служить в качестве специализированных АПК (Handunnetthi et al., 2010; Nielsen et al., 2010). Прочие негематогенные клетки, такие, как фибробласты и эндотелиальные клетки, которые в стационарном состоянии не экспрессируют МНСII, могут стать способными экспрессировать МНСII при некоторых ситуациях *in vivo*, а также в ответ на ИФН- γ *in*

vitro (Handunnetthi et al., 2010; Nielsen et al., 2010; Lotze and Thomson, 2001). В то время как вторичные лимфоидные органы, такие, как лимфатические узлы и селезенка, а также органы лимфоидной ткани характеризуются высокой плотностью АПК, последние также постоянно присутствуют в нелимфоидных органах и тканях, хотя и в значительно меньшем количестве (Geissmann et al., 2010; Lotze and Thomson, 2001). Все виды АПК, а также Т-клетки были выявлены во внутреннем слое крупных артерий человека как в норме, так и при атеросклерозе, что подтверждает концепцию иммунного надзора, который является составным атрибутом артериальной стенки и, наряду с иммунными реакциями, причастен к атеросклеротическим изменениям артерий, начиная с очень ранней стадии заболевания или даже со стадии, предшествующей заболеванию (Hansson, 2009; Hansson and Jonasson, 2009; Wick et al., 2004).

Интима артерий представляет собой внутренний слой сосудистой стенки, который отделен от крови эндотелиальным монослоем, расположенным на базальной мембране, а с внешней стороны внутренней эластической мембраной, которая отделяет пространство интимы от меди. Интима крупных артерий у человека характеризуется заметно более сложной архитектурой (Kolpakov et al., 1996; Orekhov et al., 2010; Rekhter et al., 1991; Rekhter et al., 1992), чем артерии животных, таких, как крысы и мыши, которые широко используются для исследования изменений интимы артериальной стенки при атеросклерозе (Bentzon and Falk, 2010; Daugherty et al., 2009; McNeill et al., 2010; Singh et al., 2009). В отличие от крупных артерий человека, интима аорты и крупных артерий мышей и крыс состоит только из эндотелия, отделенного от внутренней эластической пластинки очень тонким слоем стромального матрикса, который практически не содержит клеточных элементов (Bobryshev et al., 1999; Bobryshev et al., 2001; Guyton et al., 1983; Ozmen et al., 2002). Интима аорты, а также интима других крупных артерий человека состоит из нескольких слоев клеток с длинными отростками, посредством которых клетки образуют непрерывную клеточную сеть в интимальном пространстве (Rekhter et al., 1991). Основные клеточные компоненты непораженной артериальной интимы включают гладкомышечные клетки (Bochaton-Piallat and Gabbiani, 2005; Hao et al., 2003) и клетки звездчатой формы с перицито-подобными свойствами, специфически выявляемые антителами против ганглиозида 3G5 (Andreeva et al., 1998). Как гладкомышечные клетки, так и перициты содержат гладкомышечный α -актин, который обычно используется как специфический маркер для идентификации гладкомышечных клеток (Andreeva et al., 1998; Bochaton-Piallat and Gabbiani, 2005; Hao et al., 2003). В то время как основной функцией гладкомышечных клеток в меди является регуляция тонуса артериальной стенки (Bochaton-Piallat and Gabbiani, 2005; Hao et al., 2003), функциональная значимость клеток

интимы, экспрессирующих гладкомышечный α -актин, намного менее понятна, хотя признается важный вклад гладкомышечных клеток интимы в продукцию и поддержание внеклеточного матрикса, в основном, коллагена и эластина (Andreeva et al., 1997; Bochaton-Piallat and Gabbiani, 2005; Hao et al., 2003; Rekhter et al., 1993). Помимо гладкомышечных клеток, экспрессирующих α -актин, большинство из которых, как было установлено, происходят в эмбриогенезе из мезодермы и мезенхимы (Bochaton-Piallat and Gabbiani, 2005; Hao et al., 2003; Kolpakov et al., 1996; Wright, 1963), артериальная интима человека содержит также клетки гематогенного происхождения, которые экспрессируют антиген CD45 (Trowbridge and Thomas, 1994; Vanderlaan and Reardon, 2005). В артериальной интиме человека CD45+ клетки представлены моноцитами/макрофагами, лимфоцитами, дендритными клетками и тучными клетками (Bobryshev, 2006; Bobryshev, 2010; Orekhov et al., 2010; Vanderlaan and Reardon, 2005). Wick с соавторами (Wick et al., 2004; Wick et al., 1997) предположили, что в нормальной артериальной интиме иммунные и иммунокомпетентные клетки, которые представляют собой относительно небольшую популяцию клеток по сравнению с резидентными гладкомышечными α -актин экспрессирующими клетками, играют важную роль, образуя сосудисто-лимфоидную ткань (VALT), которая постоянно контролирует артериальную стенку на наличие «сигналов опасности». Ключевым элементом интегративной VALT являются дендритные клетки (Millonig et al., 2001a; Millonig et al., 2001b; Millonig et al., 2001c; Wick et al., 2004; Wick et al., 1997). В нормальных артериях дендритные клетки были обнаружены в основном в поверхностном пространстве интимы, где они благодаря своим длинным клеточным отросткам формируют непрерывную клеточную сеть (Bobryshev and Lord, 1995; Millonig et al., 2001a). Сравнение между устойчивыми к атеросклерозу и предрасположенными к атеросклерозу областями нормальной аорты человека показали, что клеточные взаимодействия дендритных клеток и других клеток интимы изменяются в предрасположенных к атеросклерозу областях (Bobryshev and Lord, 1995), что подтверждает возможность того, что дендритные клетки могут принимать решающее участие в развитии атеросклероза с момента самого раннего изменения сосудов до появления поражений (Bobryshev and Lord, 1995; Bobryshev, 2010; Wick et al., 2004; Wick et al., 1997).

В дополнение к экспрессии HLA-DR, сосудистые дендритные клетки, как известно, специфически экспрессируют CD1a антиген (Bobryshev, 2010; Bobryshev and Lord, 1995; Bobryshev and Lord, 2000; Millonig et al., 2001a; Millonig et al., 2001b; Wick et al., 1997; Yilmaz et al., 2004), который представляет собой антиген-представляющую молекулу, участвующую в презентации антигена липидной природы (Porcelli, 1995). В

наших предыдущих исследованиях (Bobryshev et al., 1996a; Bobryshev et al., 1996b) мы отметили, что в нормальных артериях, кроме экспрессии HLA-DR CD1a⁺ дендритными клетками, имеется другой тип клеток, экспрессирующих HLA-DR, которые были отрицательными по отношению к CD1a.

Несмотря на накопленные знания об антиген-представляющих свойствах артерий, до сих пор не предпринято ни одного исследования для оценки распределения и количества HLA-DR-экспрессирующих клеток в нормальной интиме.

ЦЕЛЬ

Целью настоящего исследования было выявление клеточных сетей интимы аорты, их роли в гомеостазе и возможных ассоциаций HLA-DR-экспрессирующих клеток с апо-В, представляющего характерный белок липопропротеидов низкой плотности (ЛПНП), которые являются ключевыми элементами в инициации и прогрессировании атеросклероза (Kruth, 2001; Ross, 1999).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы тканей В работе использованы визуально неповрежденные аутопсийные сегменты интимы. Грудная аорта человека забиралась во время срочных вскрытий, произведенных в первые 2-5 часов после наступления смерти у лиц 5 мужчин и 3 женщин в возрасте 40-45 лет. Сосуды вскрывали продольно и промывали физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS) при pH = 7,6. Внешне неповрежденные участки идентифицировали макроскопически согласно классификации Совета по атеросклерозу Американской ассоциации сердца (Sary et al., 1992). Приготовление пленочных гистопрепаратов "Hautchen" для иммуноокрашивания проводили в соответствии с ранее представленным ранее протоколом (Andreeva et al., 1998; Bobryshev and Lord, 2002; Millionig et al., 2001b). Для дальнейших иммуногистохимических и иммунофлуоресцентных исследований образцы фиксировали в ледяном метаноле в течение 10 мин. Исследование выполнялось в соответствии с принципами хельсинской Декларации 1975 г., уточненными в 1983 г.

Антитела и реагенты

В работе были использованы следующие антитела и сопутствующие реагенты: моноклональные антитела против HLA-DR и CD1a (DAKO Corporation, США), биотинилированные моноклональные антитела против HLA-DR (Сорбент, Россия),

биотиналированные моноклональные антитела против апо-В (Имтек, Россия), комплекс стрептавидин-пероксидаза, вторичные биотиналированные антитела (Vector laboratories, США) и прочие реагенты (Sigma Chemical Co., США).

Иммуногистохимия

Образцы тканей, первоначально обработанные 3% H_2O_2 , инкубировались с первичными антителами в PBS, содержащем 1% бычий альбумин и 2% сыворотку человека при 4°C в течение 36 часов. Затем образцы инкубировались с соответствующими вторичными биотиналированными антителами и комплексом стрептавидин-пероксидаза. 3,3'-диаминобензидин (DAB) использовался как субстрат для визуализации локализации антигенов.

После инкубации образцы отмывались буфером PBS, содержащим Tween-20, в течение 30-60 мин. После визуализации изучаемого антигена образцы тканей высушивали этанолом и разделяли на небольшие стрипы "Hautchen" в соответствии с протоколом (Andreeva et al., 1998; Bobryshev and Lord, 2002). Для некоторых препаратов, до микроскопирования, ядра окрашивали гематоксилином. Кроме того, иммуногистохимическая визуализация антигенов осуществлялась с использованием конъюгированного со щелочной фосфатазой стрептавидина и субстрата хроматогена Fast blue (Bobryshev and Lord, 2002). Для отрицательного контроля отсутствовала стадия первичных антител или образцы обрабатывали иммуноглобулиновой фракцией неиммунной сыворотки как заместителем первичных антител. Ни один из отрицательных контролей не обнаружил иммунного окрашивания.

Иммунофлуоресцентный анализ

Каждый образец "Hautchen" интимы инкубировали с биотиналированными первичными антителами и/или первичными антителами, мечеными ФИТЦ, в буфере PBS, содержащем 1% БСА и 2% сыворотку человека при 4°C в течение 36 часов. Образцы тканей, предварительно инкубированные с биотиналированными первичными антителами, затем обрабатывали конъюгатом streptavidin-Alexa 633 в течение 1 часа при 20°C. Ядра наблюдали с использованием ethidium bromide (25 $\mu\text{g/ml}$). После инкубации образцы тканей отмывали в PBS, содержащем Tween-20, в течение 30-60 мин. Иммуноокрашенные образцы анализировали, используя микроскоп Zeiss Axiovert 200M LSM 510 META с лазерными сканированием. В каждом образце ткани изучали трехмерный участок, соответствующий люминальной поверхности площадью 40 mm^2 . Для количественного определения как общего числа клеток, так и числа клеток, экспрессирующих конкретный антиген в разных слоях интимы, исследовались 5 случайно выбранных участков интимы величиной 0.053 mm^3 каждого образца.

Статистический анализ проводили при использовании пакета программ SPSS (SPSS Corporation, версия 7.0, США).

Электронная микроскопия

Для исследований с помощью электронной микроскопии образцы ткани интимы аорты фиксировались 1,5% раствором глutarальдегида в буфере PBS (pH 7.2). Далее образцы были заключены в арамидитную смолу согласно рутинному протоколу (Bobryshev and Lord, 1995; Bobryshev and Lord, 1996b). Ультратонкие срезы разных слоев интимы изучали с помощью электронного микроскопа Hitachi H7000. Идентификация типов клеток интимы проводилась в соответствии с их ультраструктурными характеристиками как ранее описано (Babaev et al., 1990; Babaev et al., 1993; Bobryshev and Lord, 1995; Bobryshev and Lord, 1996b).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение клеток HLA-DR⁺ в интиме аорты

Конфокальная микроскопия показала, что на отдельных виртуальных конфокальных срезах, параллельных поверхности аорты, HLA-DR⁺ клетки были распределены неравномерно. Для оценки количества HLA-DR⁺ клеток, расположенных на различных глубинах от просвета поверхностью интимы, толщина каждой анализируемой интимы была разделена на три равные части: поверхностная треть, находящаяся под просветом поверхности аорты, треть, прилежащая к внутренней эластической пластинке, а также средняя часть, расположенная между этими двумя обозначенными частями. Результаты количественного анализа представлены на Рисунке 3А-С. Как видно из Рисунка 3А, поверхностная и средняя трети (части) в интиме характеризовались значительно более высокой плотностью клеток по сравнению с внешней третью интимы ($38,5 \pm 3,0$ против $25,3 \pm 2,0$, значение $p < 0,05$; $36,2 \pm 2,9$ и $25,3 \pm 2,0$; значение $p < 0,05$, соответственно), тогда как не было никаких существенных различий в клеточной плотности между поверхностной и средней частями ($38,5 \pm 3,0$ против $36,2 \pm 2,9$, значение $p > 0,05$). Количество HLA-DR⁺ клеток, заселяющих поверхностную, среднюю и внешнюю трети интимы, составило $13,4 \pm 1,3$, $19,1 \pm 1,7$ и $10,7 \pm 1,6$, соответственно, в указанных частях интимы (Рисунок 3 В). Количество HLA-DR⁺ клеток оказалось значительно выше в средней трети интимы, чем в поверхностных и глубоких частях ($13,4 \pm 1,3$ против $19,1 \pm 1,7$, значение $p < 0,05$; $19,1 \pm 1,7$ против $10,7 \pm 1,6$, значение $p < 0,05$; соответственно). Число клеток, экспрессирующих HLA-DR, в поверхностных, средних и внешних третях интимы, рассчитанное в процентах от общего числа HLA-DR⁺ клеток от популяции HLA-DR⁺

клеток во всей оболочке интимы, было $34,8 \pm 3,2$, $46,8 \pm 3,1$ и $18,3 \pm 1,9$; при этом в средней части содержалось наибольшее количество HLA-DR⁺ клеток ($46,8 \pm 3,1$ против $34,8 \pm 3,2$, значение $p < 0,05$; $46,8 \pm 3,1$ против $18,3 \pm 1,9$, значение $p < 0,05$) (Рисунок 3 С).

Для того, чтобы убедиться, что HLA-DR⁺ клетки интимы могут также содержать апо-В липопротеиды низкой плотности (ЛНП), мы использовали конфокальную микроскопию, которая показала, что, хотя подавляющее большинство экспрессирующих HLA-DR интимных клеток не содержало апо-В, встречались некоторые редкие клетки, содержащие апо-В. В последних клетках апо-В был локализован преимущественно в перинуклеарной цитоплазме (рис. 4).

Распределение CD1a в нормальной интиме аорты

Иммунофлуоресцентное исследование, проведенное с помощью конфокальной микроскопии, показало, что CD1a⁺ дендритные клетки часто встречаются в поверхностной трети интимы, где своими длинными отростками они образуют клеточную сеть (Рисунки 5 А-С). Были также обнаружены большие и малые кластеры CD1a⁺ экспрессирующих клеток (Рисунок 5). Наблюдения, полученные с использованием иммуногистохимического исследования на пленочных образцах "Nautchen", согласуются с данными, полученными с помощью конфокальной микроскопии. Они показали наличие клеточной сети, образованной CD1a⁺ дендритными клетками в поверхностных частях интимы (Рисунок 5). В субэндотелиальном пространстве CD1a⁺ дендритные клетки составляют до 10% клеточной популяции. В глубокой трети интимы CD1a⁺ дендритные клетки наблюдались относительно редко, составляя не более 1-2% от общей популяции клеток.

Электронно-микроскопические наблюдения

В поверхностном слое интимы часто обнаруживались дендритные клетки, в цитоплазме которых содержались цистерны тубуловезикулярной системы (Бобрышев, 2010; Бобрышев и др., 1997; Лотце и Thomson, 2001) (Рисунок 6 А-Д). В отличие от поверхностного слоя интимы, дендритные клетки редко наблюдались в глубинной части интимы. В поверхностной части интимы дендритные клетки образуют межклеточные контакты друг с другом, а также с другими типами клеток, благодаря их длинным отросткам (Рисунок 6 С, Д). Межклеточные контакты, сформированные дендритными клетками, часто имеют сложную организацию, но не являются специализированными структурами, такими, как щелевые контакты (Рисунок 6 С, Д).

В глубинной части интимы межклеточные контакты в основном формируются за счет длинных отростков звездчатых клеток, цитоплазма которых содержит пучки миофиламентов, которые видны вдоль базальной мембраны и в перинуклеарной

цитоплазме (Рисунок 7 А, В; Рисунок 8 А). На некоторых ультраструктурных срезах межклеточные контакты, образованные этими звездчатыми клетками, демонстрируют наличие щелевых контактов (Рисунок 8 В, С). Электронная микроскопия показала, что в цитоплазме некоторых клеток интимы содержатся небольшом количестве "липидные капли", которые расположены в основном в перинуклеарной зоне.

Обсуждение результатов

Проведенное исследование подтвердило и расширило наше представление о распределении дендритных клеток в стенке артерий. Установлено, что в нормальной интиме взрослых людей существуют протяженные сети, образованные длинными отростками дендритных клеток (Bobryshev and Lord, 1995; Bobryshev and Lord, 1996b; Millonig et al., 2001a, Millonig et al., 2001b, Millonig et al., 2001c, Waltner-Romen et al., 1998). Эти сети были густыми в поверхностной части интимы и наиболее концентрированными в субэндотелиальной области. Кроме этого, в настоящей работе впервые показано наличие сетей, образованных HLA-DR⁺ клетками, имеющими недендритную клеточную природу. В срединной части и глубокой трети интимы количество клеток, экспрессирующих специфический дендритный маркер CD1, не превышало 1-2% от общей клеточной популяции, тогда как число HLA-DR⁺ клеток в соответствующих частях интимы доходило до 15% этой популяции.

Иммуногистохимические и иммунофлуоресцентные данные были подтверждены электронномикроскопическими наблюдениями, показывающими, что большая часть дендритных клеток была действительно локализована в поверхностной части интимы, тогда как клеточные сети в более глубоких частях интимы были представлены не дендритными клетками, а клеточными структурами, цитоплазма и отростки которых содержали миофиламенты и были окружены базальной мембраной. Мы склонны считать, что эти миофиламентсодержащие клетки могут представлять собой

HLA-DR-экспрессирующие клетки, которые, как подтверждает конфокальная микроскопия, формируют протяженные сети по всей толщине интимы. Ранее изучение HLA-DR⁺ клеток было затруднено методическими трудностями, которые возникают при использовании рутинных иммуногистохимических методик и в связи с низкой разрешающей способностью «классической» иммуногистохимии. Использование иммунофлуоресцентного анализа в сопряжении с современной конфокальной микроскопией позволило нам впервые исследовать обширные зоны структурно интактной интимы с визуализацией трехмерной интеграции HLA-DR-экспрессирующих клеток в непрерывной системе.

Точные функции интимацитов дендритного происхождения, способных к экспрессии HLA-DR, пока не совсем понятны, но считается общепризнанным, что главное назначение HLA-DR – представлять пептидные антигены, потенциально чужеродные по происхождению, для иммунной системы с целью формирования таких реакций Т-хелперов, которые в конечном счете ведут к образованию антител к тому же самому пептидному антигену.

Повышенное присутствие HLA-DR на поверхности клетки означает обычно ее реакцию на стимуляцию и, таким образом, HLA-DR является также маркером иммунной стимуляции (Handunnetthi et al., 2010; Nielsen et al., 2010). Возможно, HLA-DR+ дендритные интимациты способны к презентации антигенов для Т-клеток по аналогии с дендритными клетками, хотя эффективность такой презентации гораздо ниже, чем у последних. Порог интенсивности для сигналов, способных «потревожить» и дезорганизовать сети недендритных интимацитов и, в конечном счете, инициировать атеросклеротические изменения, может быть значительно выше, чем для активации дендритных клеток, что и обеспечивает защиту интимы от непрерывных стрессов. В то время как большинство активированных дендритных клеток, как полагают, мигрируют из артериальной интимы в лимфатические узлы (Bobryshev, 2010; Lotze and Thomson, 2001), дезорганизация сетей, образованных другим типом резидентных клеток, может быть актуальной для изменения локального гомеостаза интимы. Независимо от правдивости этого предположения, данные настоящей работы отверждают идею, что интима сама по себе может функционировать как особый «орган иммунной системы» и что VALT система, постулированная Wick с сотрудниками (Wick et al., 1997), может быть более обширной и сложной, чем предполагалось ранее.

Наши результаты позволяют по-новому оценить организацию VALT. Последняя может состоять из двух субсистем. Первая из них сформирована из профессиональных АПК, локализована в поверхностной части интимы и связана со второй субсистемой, которая сформирована из непрофессиональных антиген-презентирующих клеток, которые широко разбросаны по интимае. Несмотря на то, что идентификация точной природы типов клеток, которые образуют HLA-DR+ клеточную популяцию второй субсистемы VALT, требует дальнейшего уточнения, настоящем исследовании подтверждено существование структурного интегративного механизма, не отмечавшегося ранее.

Функциональная необходимость существования системы, состоящей как из профессиональных, так и непрофессиональных антиген-презентирующих клеток, интегрированных в протяженные сети, может отражать особенность архитектоники артерий: оболочка интимы и внутренние две трети оболочки меди не иннервированы и,

таким образом, наблюдение и поддержание гомеостаза сосудов требует альтернативных компенсаторных механизмов. Мы предполагаем, что широкое распространение HLA-DR-экспрессирующих клеток в макроскопически непораженной интиме аорты человека может играть определенную роль в поддержании гомеостаза сосудов и представлять собой механизм, который компенсирует отсутствие наблюдения за целостностью интимы со стороны нервной системы. Принимая во внимание большую протяженность внутренней поверхности артерий в теле человека, дальнейший детализированный анализ антиген-презентирующих свойств резидентных клеток интимы может обеспечить новое понимание не только функциональных механизмов, вовлеченных в поддержание гомеостаза артерий, но и малоизвестных функций иммунной системы.

Как известно, развитие атеросклеротического поражения сопровождается избыточным накоплением ЛНП (Goldstein and Brown, 1977; Ross, 1999; Schwartz et al., 1995). Идентификация белка апо-В в перинуклеарной цитоплазме HLA-DR⁺ клеток может рассматриваться как еще более ранний, пре-атеросклеротический период развития патологии.

Такая возможность подтверждается тем фактом, что нами апо-В был обнаружен в перинуклеарной части только некоторых редко встречающихся клеток интимы. Таким образом, накопление апо-В в перинуклеарной цитоплазме – неслучайное событие, происходящее в интактных клетках интимы. Избыточные липиды в интиме артерий при атеросклерозе имеют своим источником циркулирующие в крови ЛНП, которые проникают в интиму (Ross, 1999; Tertov et al., 1997; Tertov et al., 1992). Также хорошо известно, что клетки интимы по-разному взаимодействуют с нормальными и модифицированными ЛНП (Goldstein and Brown, 1977; Gordon, 2007; Kruth, 2001; Tertov et al., 1992). Нормальные ЛНП захватываются посредством рецептор-зависимых механизмов и утилизируются без превращения в «липидные капли» в цитоплазме (Goldstein and Brown, 1977; Gordon, 2007; Kruth, 2001).

Модифицированные ЛНП, наоборот, захватываются скавенджер-рецепторами, что ведет к избыточной аккумуляции липидов и образованию пенистых клеток (Bobryshev, 2005; Goldstein and Brown, 1977; Gordon, 2007; Kruth, 2001). В этом случае компоненты ЛНП, включая апо-В, могут удерживаться в цитоплазме внутри эндосом и обнаруживаться с помощью морфологического анализа высокого разрешения, что и сделано нами.

Мы показали, что в большинстве HLA-DR⁺-клеток апо-В не обнаруживается, тогда как в некоторых таких клетках апо-В встречается в перинуклеарной цитоплазме, то есть именно там, где первые липидные капли трансформируются в пенистые клетки. В

соответствии с этим, электронная микроскопия продемонстрировала наличие клеток интимы, которые содержали небольшое количество липидных капель в своей цитоплазме, в основном вокруг ядра. Мы полагаем, что обнаруженные apo-B+/HLA-DR+клетки могут представлять собой микрофокус патологических изменений интимы во внешне непораженных участках аорты. Следует также указать на то, что использованные в экспериментах такие участки были получены из аорт 40-45-летних субъектов, а именно на этот возраст приходится возрастание риска развития атеросклероза. И в более ранних работах указывалось на экспрессию HLA-DR на ранних и более поздних стадиях атеросклеротического поражения (Bobryshev and Lord, 1998; Hansson, 2009; Hansson and Jonasson, 2009; Hansson et al, 1986; Jonasson et al., 1985; Katsuda et al., 1992; Stemme et al., 1990; Xu et al., 1990).

Обнаруженная нами существенная экспрессия антиген-презентирующих молекул в нормальной аорте человека указывает на осторожность в интерпретации результатов, полученных в экспериментах на мышах и крысах, интимы которых не обладают характеристиками интимы человека, особенно ее разнообразием клеточных компонентов. Со времени появления обзора Schwartz and colleagues в 1995 году (Schwartz et al., 1995) накопились данные, убедительно свидетельствующие том, что начальные процессы атеросклероза у людей связаны с изменениями оседлых клеток, находящихся в интактной интиме (Bobryshev, 2010; Hansson, 2009; Hansson and Jonasson, 2009; Wick et al., 2004; Wick et al., 1997).

Несмотря на сходство картины атеросклеротического поражения у животных и человека (Bentzon and Falk, 2010; Bobryshev et al., 1999; Daugherty et al., 2009; McNeill et al., 2010; Singh et al., 2009), начальные процессы у них могут существенно различаться. Обнаруженные нами различия в экспрессии HLA-DR на разных глубинах внешне непораженной интимы указывают на возможность различий и в тканевой микроструктуре, что еще раз подчеркивает сложную организацию внутреннего слоя артерий.

Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации и Фондом St. Vincent's Clinic, Сидней, Австралия.

Подписи к рисункам

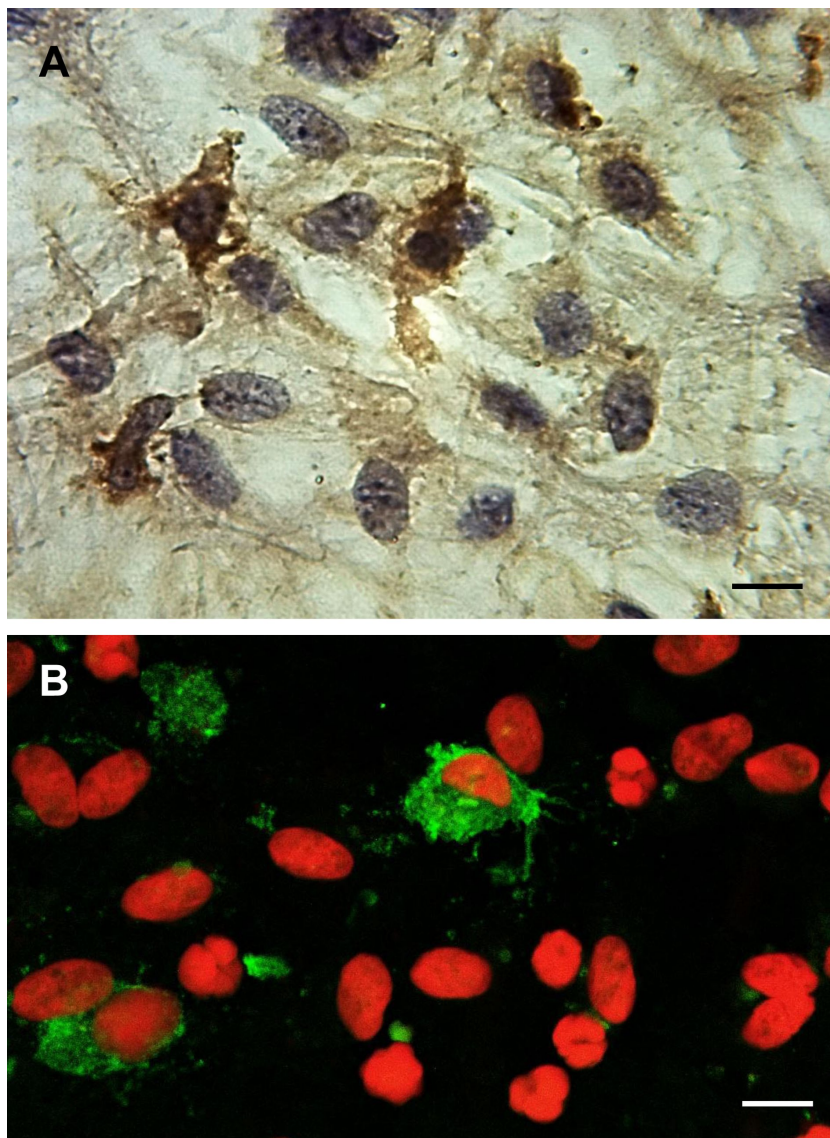


Рис. 1. HLA-DR⁺ клетки, выявленные иммуногистохимическим (А) и иммунофлуоресцентным (В) методами в интимы аорты человека. (А): "Hautchen" образец интимы. Иммунопероксидазное визуализации HLA-DR с использованием DAB в качестве хромотогена. Ядра контрастированы гематоксилином. На рисунке (И) показан отдельный виртуальный срез полученный конфокальным исследованием интимы. Масштаб = 10 мкм (А, В).

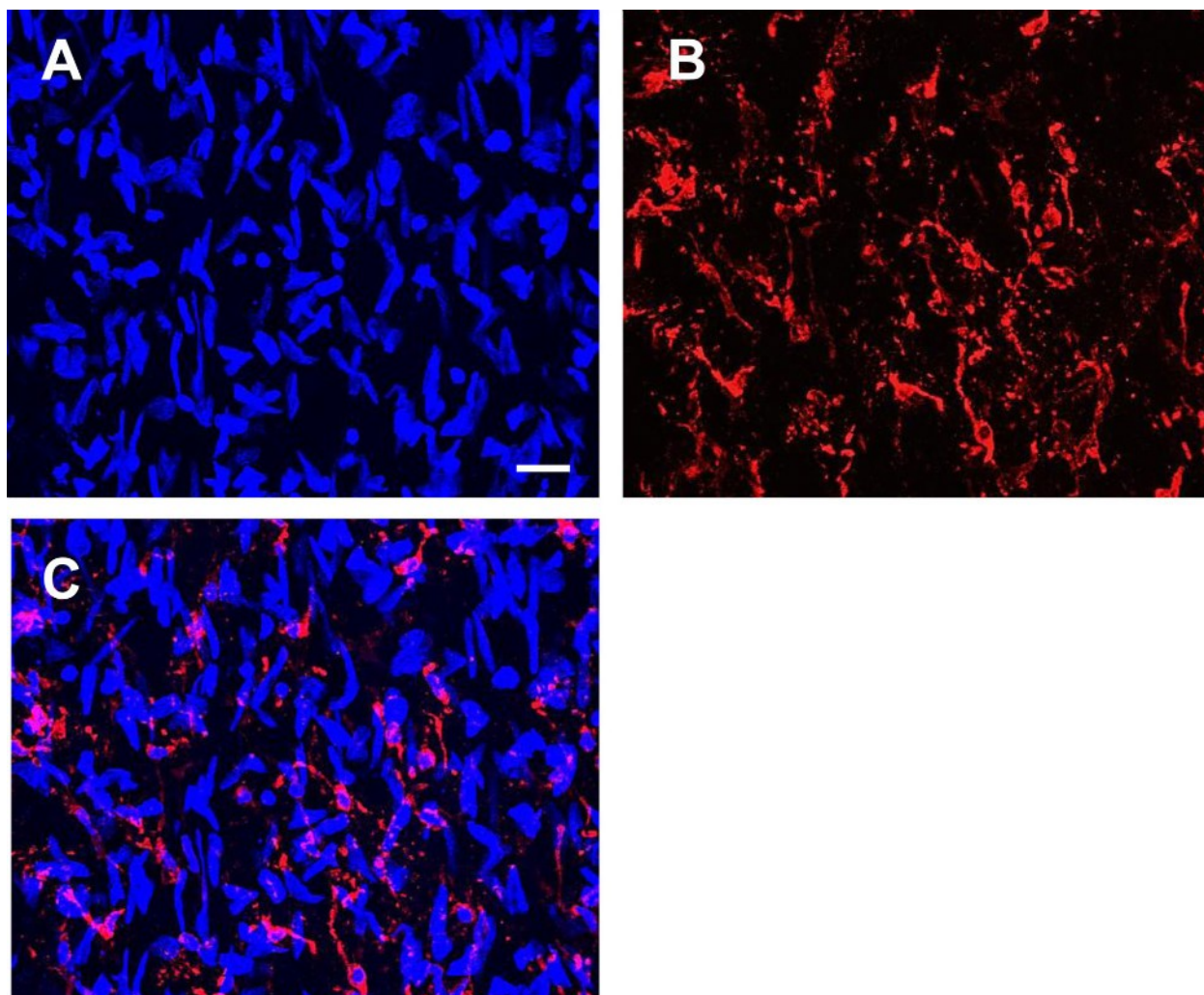


Рис. 2. Иммунофлуоресцентное изображение, представляющие объединения 45 оптических конфокальных срезов интимаы, полученные с Z-интервалом 1 мкм (А-В). (А): Ядра были визуализированы путем окрашивания бромидом этидия. (В): Распределение сети, образованной HLA-DR+ клетками, обнаруженными с применением анти-HLA-DR антител сопряженных с Alexa 633. (С): Суперпозиция изображений показанных на рисунках (А) и (В). Образец аорты человека. Масштаб = 20 мкм (А).

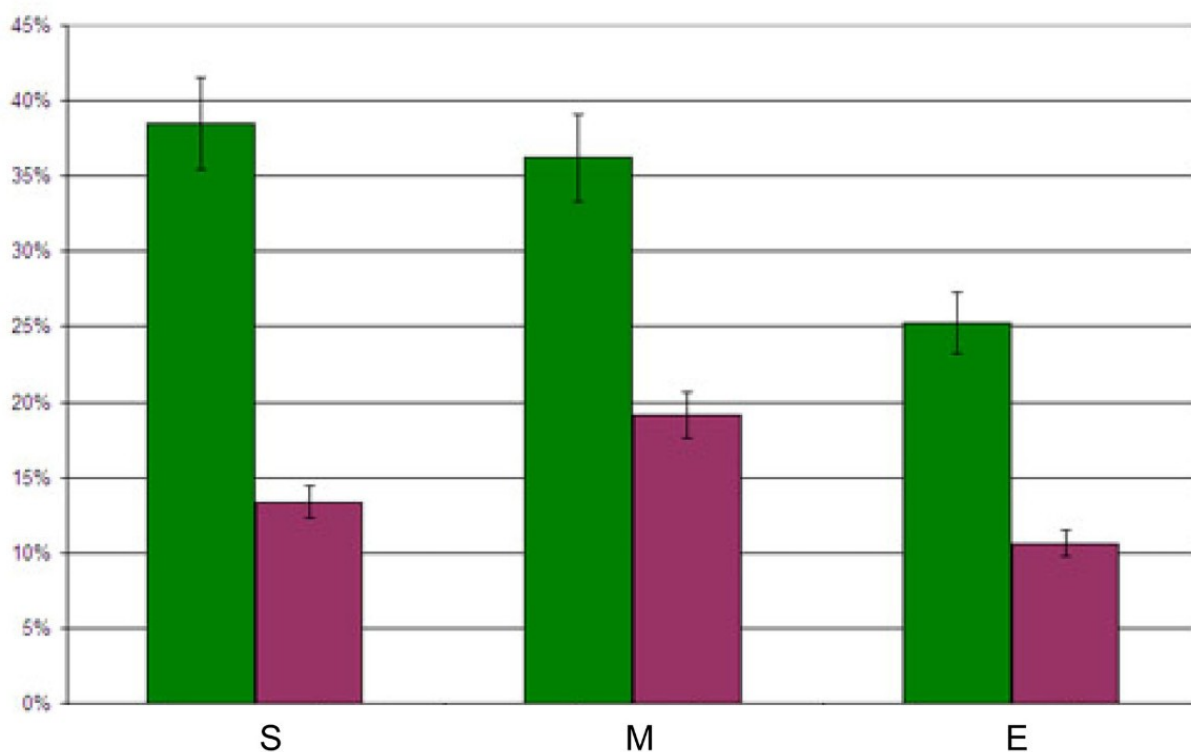


Рис. 3. Количественный анализ числа клеток и экспрессии HLA-DR в различных частях нормальной человеческой интимы (А-С). (А): Количество клеток в разных частях интимы, рассчитанное в процентах от общего числа клеток во всей интиме. (В): Процент HLA-DR+ клеток в различных частях интимы, рассчитанный в каждой соответствующей части интимы. (С): Количество HLA-DR+ клеток в разных частях интимы, рассчитанное в процентах от общего количества HLA-DR+ клеток в интиме. На рисунках (А-С), "S", "M" и "E" означает поверхностную, среднюю и внешнюю трети (часть) интимы, соответственно.

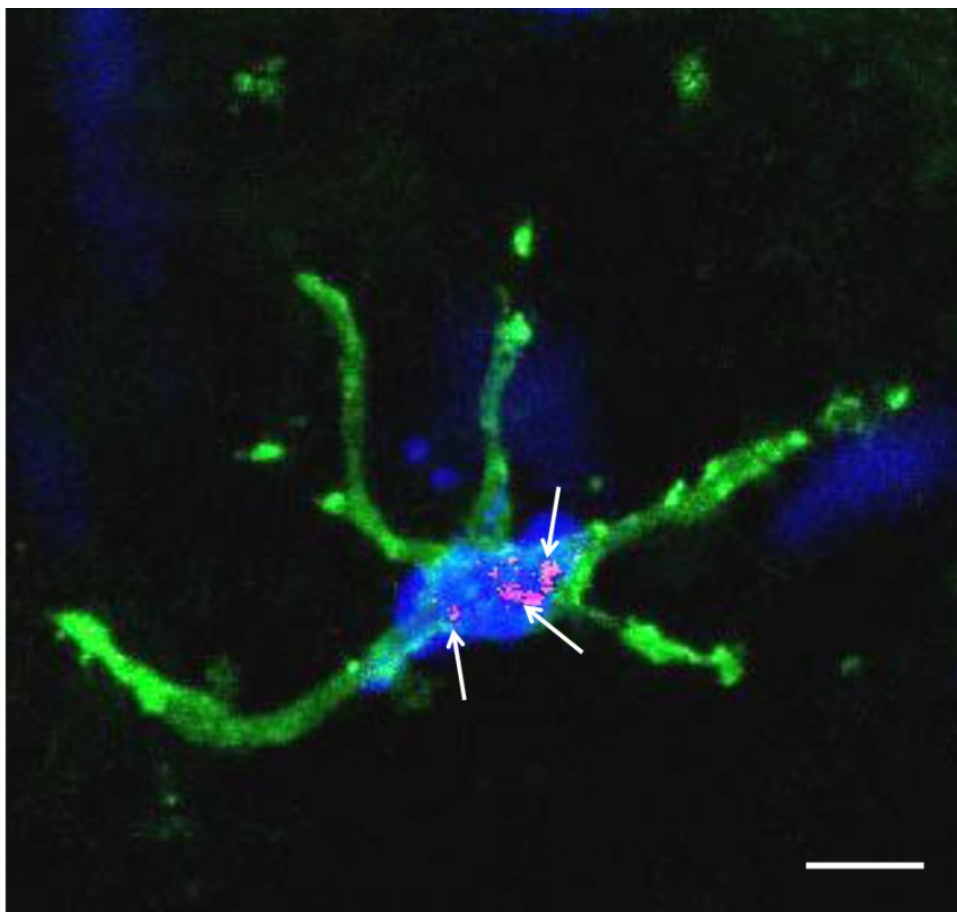


Рис.4. Апо-В (красный, показан стрелками) в перинуклеарной цитоплазме HLA-DR⁺ клеток, выявленный с помощью иммунофлуоресцентного анализа в сочетании с конфокальной микроскопией. HLA-DR был визуализирован FITC, в то время как апо-В был визуализирован с использованием анти-апо-В, конъюгированными с Alexa 633, ядро окрашивали бромидом этидия. Масштаб = 10 мкм.

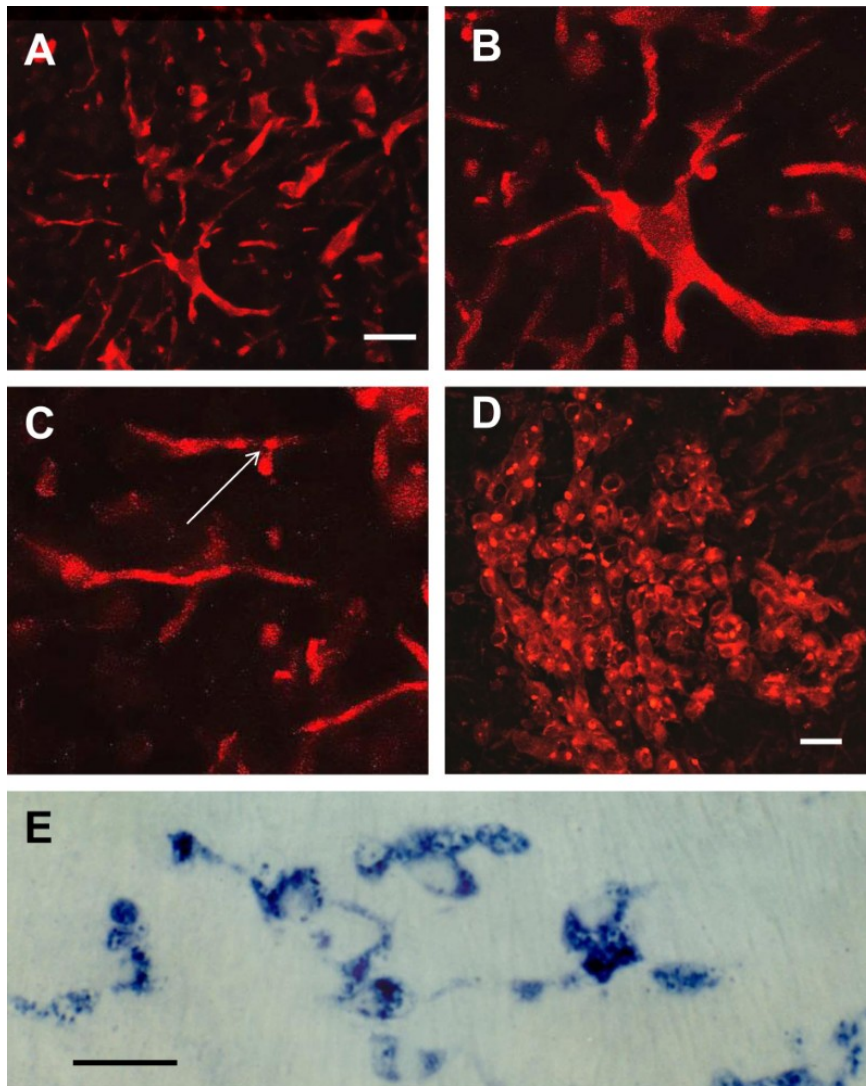


Рис. 5. Распределение CD1a⁺ дендритных клеток в интима аорты человека. (A): Клеточные сети, образованные CD1a⁺ клетками в поверхностной части интимы. (B) и (C) - детали рисунка (A). На (C) стрелка показывает зону контакта между отростками дендритных клеток. (D): большой кластер, образованный клетками CD1a⁺ в поверхностной части интимы. На (A-D), CD1a⁺ клетки были визуализированы с помощью иммунофлуоресцентного анализа в сочетании с конфокальной микроскопией. (E): Иммуногистохимическая визуализация группы CD1a-экспрессирующих клеток в субэндотелиальном пространстве интимы, "Hautchen" образец; Визуализация CD1a быстрым синим, используемым в качестве хроматогена. Масштаб = 10 мкм (A), 20 мкм (D), 30 мкм (E).

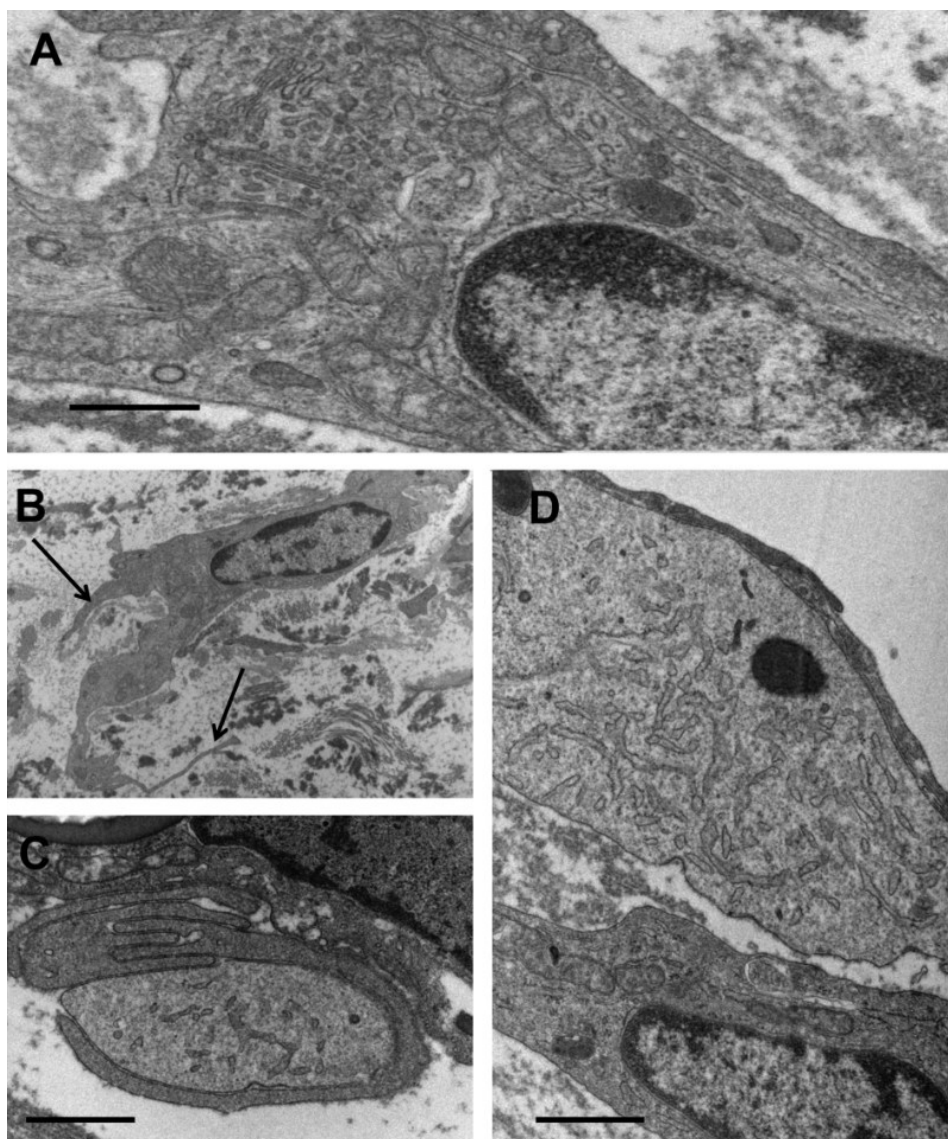


Рис. 6. Дендритные клетки, расположенные в поверхностной части интимы аорты (A-D). На (A) обращает на себя внимание хорошо развитая тубуловезикулярная система в цитоплазме дендритных клеток, в то время как на (B) обращают на себя внимание длинные отростки (показано стрелками). (A) деталь рисунка (B). (C): контакт между отростками дендритных клеток. (D): контакт отростков дендритных клеток с эндотелиальными клетками. На (C) и (D) обращает на себя внимание хорошо развитая тубуловезикулярная система. Электронная микроскопия. Масштаб = 0,5 мкм (A), 1 мкм (C, D).

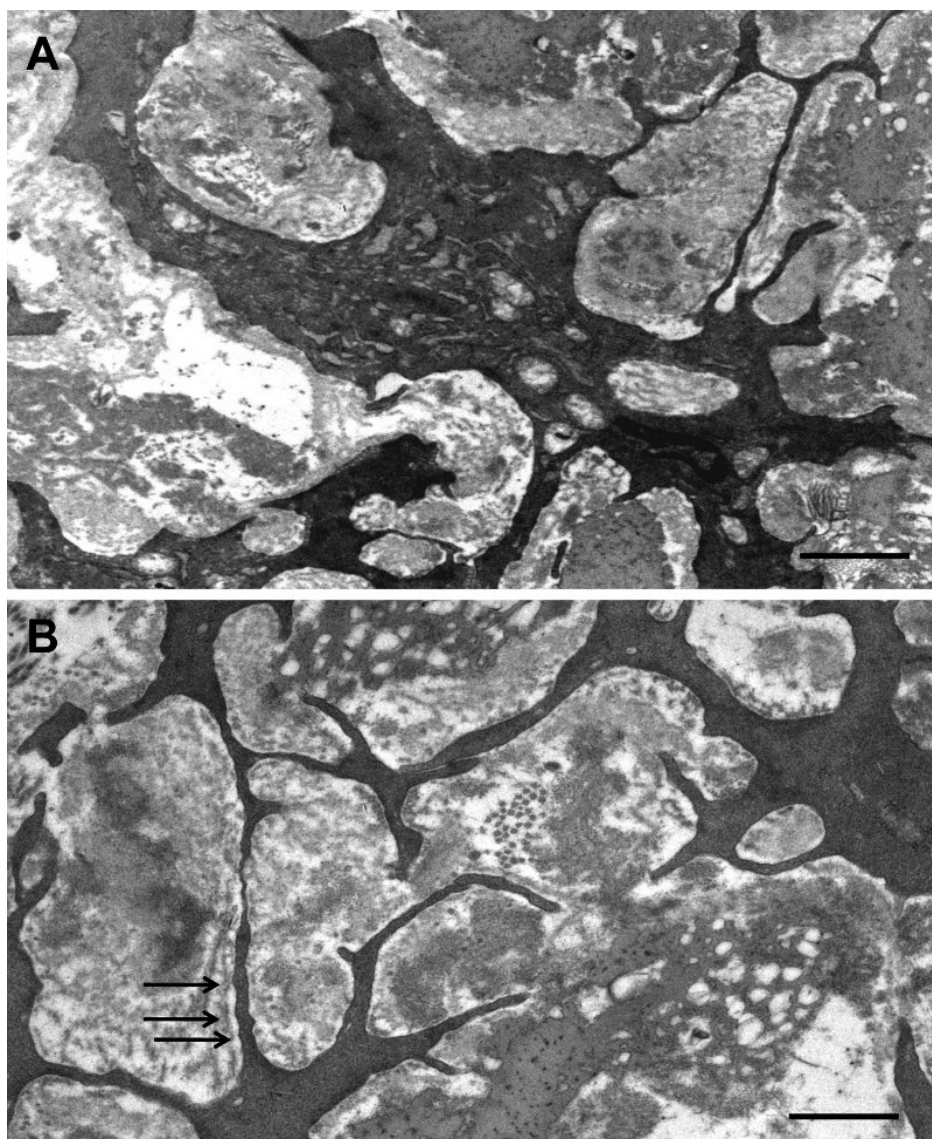


Рис. 7. Сети, образованные клетками недендритного происхождения в средней (А) и в глубокой (В) трети интимы. Стрелки указывают на базальную мембрану (В). Электронная микроскопия. Масштаб = 2 мкм (А, В).

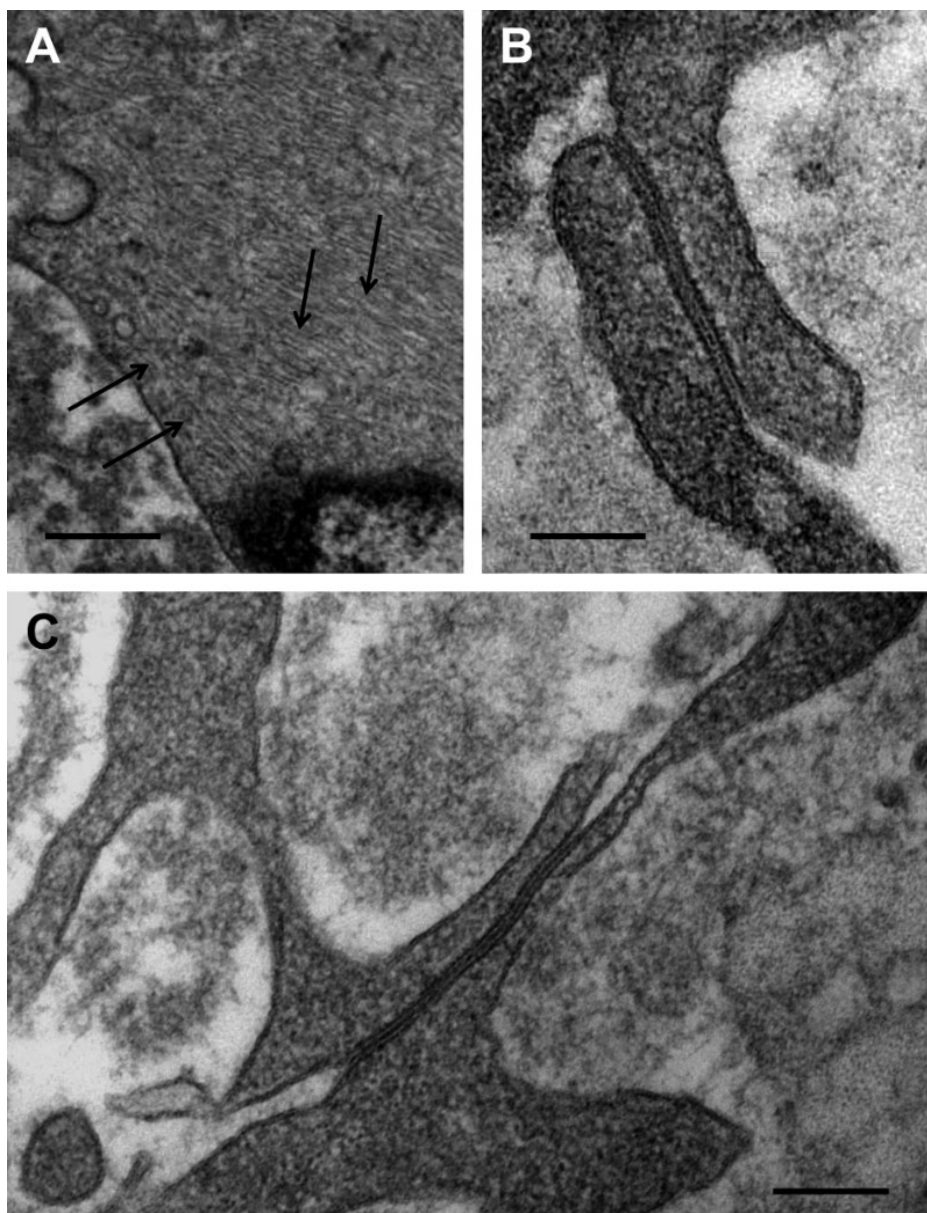


Рис. 8. Изображения высокого разрешения клеток недендритного происхождения, которые формируют сеть в интиме аорты, как показано на рисунке 7. (А): стрелки показывают миофиламенты, расположенные вдоль базальной мембраны, а также в перинуклеарной цитоплазме. (В) и (С): щелевые контакты, образующиеся между клеточными отростками. Электронная микроскопия. Масштаб = 0,5 мкм (А-С).

ЛИТЕРАТУРА

- Andreeva, E.R., Pugach, I.M., Gordon, D., Orekhov, A.N., 1998. Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. *Tissue Cell* 30, 127-135.
- Andreeva, E.R., Pugach, I.M., Orekhov, A.N., 1997. Collagen-synthesizing cells in initial and advanced atherosclerotic lesions of human aorta. *Atherosclerosis* 130, 133-42.

- Babaev, V.R., Bobryshev, Y.V., Stenina, O.V., Tararak, E.M., Gabbiani, G., 1990. Heterogeneity of smooth muscle cells in atheromatous plaque of human aorta. *Am. J. Pathol.* 136, 1031-1042.
- Babaev, V.R., Bobryshev, Y.V., Sukhova, G.K., Kasantseva, I.A., 1993. Monocyte/macrophage accumulation and smooth muscle cell phenotypes in early atherosclerotic lesions of human aorta. *Atherosclerosis* 100, 237-248.
- Bentzon, J.F., Falk, E., 2010. Atherosclerotic lesions in mouse and man: is it the same disease? *Curr. Opin. Lipidol.* 21, 434-440.
- Bobryshev, Y.V., 2005. Intracellular localization of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerotic plaque cells revealed by electron microscopy combined with laser capture microdissection. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 793-797.
- Bobryshev, Y.V., 2006. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron* 37, 208-222.
- Bobryshev, Y.V., 2010. Dendritic cells and their role in atherogenesis. *Lab. Invest.* 90, 970-984.
- Bobryshev, Y.V., Babaev, V.R., Lord, R.S., Watanabe, T., 1999. Ultrastructural identification of cells with dendritic cell appearance in atherosclerotic aorta of apolipoprotein E deficient mice. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 31, 527-531.
- Bobryshev, Y.V., Lord, R.S., 1995. Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of Vascular Dendritic Cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta. *Arch. Histol. Cytol.* 58, 307-322.
- Bobryshev, Y.V., Lord, R.S., 1996b. *Langhans cells* of human arterial intima: uniform by stellate appearance but different by nature. *Tissue Cell* 28, 177-194.
- Bobryshev, Y.V., Lord, R.S., 1998. Mapping of vascular dendritic cells in atherosclerotic arteries suggests their involvement in local immune-inflammatory reactions. *Cardiovasc. Res.* 37, 799-810.
- Bobryshev, Y.V., Lord, R.S., 2000. CD1 expression and the nature of CD1-expressing cells in human atherosclerotic plaques. *Am. J. Pathol.* 156, 1477-1478.
- Bobryshev, Y.V., Lord, R.S., 2002. Expression of heat shock protein-70 by dendritic cells in the arterial intima and its potential significance in atherogenesis. *J. Vasc. Surg.* 35, 368-375.
- Bobryshev, Y.V., Lord, R.S., Rainer, S., Jamal, O.S., Munro, V.F., 1996a. Vascular dendritic cells and atherosclerosis. *Pathol. Res. Pract.* 192, 462-467.
- Bobryshev, Y.V., Lord, R.S., Watanabe, T., 1997. Structural peculiarities of vascular dendritic cell tubulovesicular system in human atherosclerotic aorta. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 29, 553-561.

- Bobryshev, Y.V., Taksir, T., Lord, R.S., Freeman, M.W., 2001. Evidence that dendritic cells infiltrate atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Histol. Histopathol.* 16, 801-808.
- Bochaton-Piallat, M.L., Gabbiani, G., 2005. Modulation of smooth muscle cell proliferation and migration: role of smooth muscle cell heterogeneity. *Handb. Exp. Pharmacol.* 645-663.
- Daugherty, A., Lu, H., Howatt, D.A., Rateri, D.L., 2009. Modes of defining atherosclerosis in mouse models: relative merits and evolving standards. *Methods Mol. Biol.* 573, 1-15.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K., 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1977. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 897-930.
- Gordon, S., 2007. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *J. Clin. Invest.* 117, 89-93.
- Guyton, J.R., Lindsay, K.L., Dao, D.T., 1983. Comparison of aortic intima and inner media in young adult versus aging rats. *Am. J. Pathol.* 111, 234-246.
- Handunnetthi, L., Ramagopalan, S.V., Ebers, G.C., Knight, J.C., 2010. Regulation of major histocompatibility complex class II gene expression, genetic variation and disease. *Genes Immun.* 11, 99-112.
- Hansson, G.K., 2009. Atherosclerosis - an immune disease: The Anitschkov Lecture 2007. *Atherosclerosis* 202, 2-10.
- Hansson, G.K., Jonasson, L., 2009. The discovery of cellular immunity in the atherosclerotic plaque. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1714-1717.
- Hansson, G.K., Jonasson, L., Holm, J., Claesson-Welsh, L., 1986. Class II MHC antigen expression in the atherosclerotic plaque: smooth muscle cells express HLA-DR, HLA-DQ and the invariant gamma chain. *Clin. Exp. Immunol.* 64, 261-268.
- Hao, H., Gabbiani, G., Bochaton-Piallat, M.L., 2003. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1510-1520.
- Huntington, N.D., Tarlinton, D.M., 2004. CD45: direct and indirect government of immune regulation. *Immunol. Lett.* 94, 167-174.
- Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Gabbiani, G., Hansson, G.K., 1985. Expression of class II transplantation antigen on vascular smooth muscle cells in human atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 76, 125-131.
- Katsuda, S., Boyd, H.C., Fligner, C., Ross, R., Gown, A.M., 1992. Human atherosclerosis. III. Immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults. *Am. J. Pathol.* 140, 907-914.

- Kolpakov, V., Polishchuk, R., Bannykh, S., Rekhter, M., Solovjev, P., Romanov, Y., Tararak, E., Antonov, A., Mironov, A., 1996. Atherosclerosis-prone branch regions in human aorta: microarchitecture and cell composition of intima. *Atherosclerosis* 122, 173-189.
- Kruth, H.S., 2001. Macrophage foam cells and atherosclerosis. *Front. Biosci.* 6, D429-D455.
- Lotze, M.T., Thomson, A.W., eds., 2001. *Dendritic cells: biology and clinical applications*. 2nd ed., San Diego, CA, Academic Press.
- McNeill, E., Channon, K.M., Greaves, D.R., 2010. Inflammatory cell recruitment in cardiovascular disease: murine models and potential clinical applications. *Clin. Sci. (Lond.)*. 118, 641-655.
- Millonig, G., Niederegger, H., Rabl, W., Hochleitner, B.W., Hoefer, D., Romani, N., Wick, G., 2001. Network of vascular-associated dendritic cells in intima of healthy young individuals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 503-508.
- Millonig, G., Niederegger, H., Wick, G., 2001. Analysis of the cellular composition of the arterial intima with modified en face techniques. *Lab. Invest.* 81, 639-641.
- Millonig, G., Schwentner, C., Mueller, P., Mayerl, C., Wick G., 2001. The vascular-associated lymphoid tissue: a new site of local immunity. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 547-553.
- Nielsen, M., Lund, O., Buus, S., Lundegaard, C., 2010. MHC class II epitope predictive algorithms. *Immunology* 130, 319-328.
- Orehov, A.N., Andreeva, E.R., Andrianova, I.V., Bobryshev, Y.V., 2010. Peculiarities of cell composition and cell proliferation in different type atherosclerotic lesions in carotid and coronary arteries. *Atherosclerosis* 212, 436-443.
- Ozmen, J., Bobryshev, Y.V., Lord, R.S., Ashwell, K.W., 2002. Identification of dendritic cells in aortic atherosclerotic lesions in rats with diet-induced hypercholesterolaemia. *Histol. Histopathol.* 17, 223-237.
- Porcelli, S.A., 1995. The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules. *Adv. Immunol.* 59, 1-98.
- Rekhter, M.D., Andreeva, E.R., Andrianova, I.V., Mironov, A.A., Orehov, A.N., 1992. Stellate cells of aortic intima: I. Human and rabbit. *Tissue Cell* 24, 689-696.
- Rekhter, M.D., Andreeva, E.R., Mironov, A.A., Orehov, A.N., 1991. Three-dimensional cytoarchitecture of normal and atherosclerotic intima of human aorta. *Am. J. Pathol.* 138, 569-580.
- Rekhter, M.D., Zhang, K., Narayanan, A.S., Phan, S., Schork, M.A., Gordon, D., 1993. Type I collagen gene expression in human atherosclerosis. Localization to specific plaque regions. *Am. J. Pathol.* 143, 1634-1648.
- Ross, R., 1999. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 115-126.

- Schwartz, S.M., deBlois, D., O'Brien, E.R.M., 1995. The intima: soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ. Res.* 77, 445–465.
- Singh, V., Tiwari, R.L., Dikshit, M., Barthwal, M.K., 2009. Models to study atherosclerosis: a mechanistic insight. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 7, 75-109.
- Sтары, H.C., Blankenhorn, D.H., Chandler, A.B., Glagov, S., Insull, W., Richardson, M., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W., 1992. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. *Circulation* 85, 391–405.
- Stemme, S., Fager, G., Hansson, G.K., 1990. MHC class II antigen expression in human vascular smooth muscle cells is induced by interferon-gamma and modulated by tumour necrosis factor and lymphotoxin. *Immunology* 69, 243-249.
- Tertov, V.V., Orekhov, A.N., 1997. Metabolism of native and naturally occurring multiple modified low density lipoprotein in smooth muscle cells of human aortic intima. *Exp. Mol. Pathol.* 64, 127-145.
- Tertov, V.V., Sobenin, I.A., Gabbasov, Z.A., Popov, E.G., Jaakkola, O., Solakivi, T., Nikkari, T., Smirnov, V.N., Orekhov, A.N., 1992. Multiple-modified desialylated low density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation. Isolation, fractionation and characterization. *Lab Invest.* 67, 665-675.
- Trowbridge, I.S., Thomas, M.L., 1994. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 85-116.
- Vanderlaan, P.A., Reardon, C.A., 2005. The unusual suspects: an overview of the minor leukocyte populations in atherosclerosis. *J. Lipid. Res.* 46, 829-838.
- Waltner-Romen, M., Falkensammer, G., Rabl, W., Wick, G., 1998. A previously unrecognized site of local accumulation of mononuclear cells. The vascular-associated lymphoid tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 46, 1347-1350.
- Wick, G., Knoflach, M., Xu, Q., 2004. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 361-403.
- Wick, G., Romen, M., Amberger, A., Metzler, B., Mayr, M., Falkensammer, G., Xu, Q., 1997. Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue. *FASEB J.* 11, 1199-1207.
- Wright, I., 1963. The microscopical appearances of human peripheral arteries during growth and aging. *J. Clin. Pathol.* 16, 499–522.
- Xu, Q.B., Oberhuber, G., Gruschwitz, M., Wick, G., 1990. Immunology of atherosclerosis: cellular composition and major histocompatibility complex class II antigen expression in aortic intima, fatty streaks, and atherosclerotic plaques in young and aged human specimens. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 56, 344-359.

Yilmaz, A., Lochno, M., Traeg, F., Cicha, I., Reiss, C., Stumpf, C., Raaz, D., Anger, T., Amann, K., Probst, T., Ludwig, J., Daniel, W.G., Garlichs, C.D., 2004. Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques. *Atherosclerosis* 176, 101-110.