

## АНАЛИЗ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ДИФфуЗНОМ УТОЛЩЕНИИ ИНТИМЫ АОРТЫ ЧЕЛОВЕКА

© Ю. В. Бобрышев,<sup>1, 2, 3</sup> В. П. Карагодин,<sup>1</sup> М. М. Мойсенович,<sup>1</sup>  
А. А. Мельниченко,<sup>1</sup> А. Н. Орехов<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт атеросклероза (Сколково);

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва;

и <sup>3</sup> Медицинский факультет Университета Нового Южного Уэльса, Австралия

<sup>1</sup> электронный адрес: [vpka@mail.ru](mailto:vpka@mail.ru)

Общепризнано, что накопление липидов и иммуновоспалительных клеток являются ранними проявлениями атеросклероза. В настоящей работе изучена взаимосвязь между отложением липидов, количеством иммуновоспалительных клеток и экспрессией молекул класса II главного комплекса гистосовместимости (HLA-DR) (маркера иммунной активации) в диффузном утолщении интимы (ДУИ). Липиды, включая триглицериды, эфиры холестерина, свободный холестерин и фосфолипиды, были исследованы методами хроматографии, гистохимии с окрашиванием срезов масляным красным О (Oil red O), а также посредством электронно-микроскопического анализа. Иммуновоспалительные клетки и экспрессию HLA-DR исследовали иммуногистохимически в последовательных срезах одних и тех же образцов ткани. Показано, что липиды неравномерно распределены в ДУИ. В прилюминальном субслое липиды были обнаружены как в цитоплазме интимоцитов, так и внеклеточно. В примедиальном субслое интимы липиды присутствовали в основном вдоль эластических волокон. Отмечена положительная корреляция между присутствием липидов и экспрессией HLA-DR ( $r = 0.79$ ;  $P < 0.001$ ). Кроме того, положительную корреляцию выявили между отложением липидов и количеством иммуновоспалительных клеток, хотя коэффициенты корреляции были различны для разных субслоев интимы. В частности, корреляция между отложением липидов и количеством иммуно-воспалительных клеток в прилюминальном субслое интимы была выше ( $r = 0.69$ ;  $P < 0.001$ ), чем в примедиальном субслое ( $r = 0.28$ ;  $P < 0.001$ ). Полученные данные подтверждают гипотезу, постулирующую, что накопление липидов в интима является фактором инициации воспалительных реакций. На претатеросклеротической стадии атеросклероза ассоциированная с липидами активация иммунных клеток наблюдается главным образом в прилюминальном слое интимы.

Ключевые слова: аорта, интима, липиды, HLA-DR, воспаление.

Принятые сокращения: ДУИ — диффузное утолщение интимы, HLA-DR — молекулы класса II главного комплекса гистосовместимости (human leucocyte antigen).

В проведенных ранее исследованиях показано, что наряду с гладкомышечными клетками, которые представляют собой основной тип клеток нормальной интимы артерий, в ней находятся также иммуновоспалительные клетки, включая лимфоциты, макрофаги и дендритные клетки (Bobryshev, 2005; Vanderlaan, Reardon, 2005; Hansson, 2009; Hansson, Hermansson, 2011). Иммуновоспалительные клетки образуют так называемую сосудоассоциированную лимфоидную ткань, которая сканирует «сосудистую ткань» на присутствие потенциально вредных факторов (Wick et al., 1997). Как полагают, активация сосудо-ассоциированной лимфоидной ткани отвечает за инициацию иммунных реакций в интима (Wick et al., 1997, 2004).

В ряде работ на аутопсийном материале было показано, что присутствие липидов в интима артерий часто обнаруживается в местах, которые не проявляют макроскопических признаков атеросклеротического поражения (Jores et al., 1924; Anichkow, 1947; Geer et al., 1960). В этой связи предполагается, что фокальное накопление

липидов в интима может служить микроцентрами, в которых иницируется каскад реакций, приводящих к образованию атеросклеротического поражения (Geer et al., 1960; Schwartz et al., 1995; Hansson, 2009; Hansson, Hermansson, 2011). Общепризнано, что накопление иммуновоспалительных клеток и отложение липидов могут быть взаимосвязаны начиная с самых ранних стадий атерогенеза (Schwartz et al., 1995; Ross, 1999; Vanderlaan, Reardon, 2005; Hansson, 2009; Hansson, Hermansson, 2011), однако отсутствуют сведения о количественной связи этих событий в артериях человека.

В более ранних публикациях мы и другие авторы оценивали структурную и биохимическую сложность интимы артерий человека и описывали ее характеристики в макроскопически неизмененных участках артерий (Jores et al., 1924; Anichkow, 1947; Geer et al., 1960; Velican, Velican, 1977, 1978; Orekhov et al., 1984, 1985, 1986, 1987; Tertov et al., 1985; Mukhin et al., 1991; Rekhter et al., 1991; Bobryshev, Lord, 1995, 1996; Andreeva et al., 1998). Было показано также, что на ранних стадиях атеросклероза в

интиме наблюдаются избыточное отложение липидов, клеточная пролиферация и накопление коллагена, но изменения интимы происходят неравномерно по ее толщине (Orekhov et al., 1984, 1985, 1986, 1987, 2010; Guyton et al., 1985; Velican et al., 1988; Sary, 1989; Andreeva et al., 1991, 1997; Mukhin et al., 1991).

Два основных субслоя интимы были названы прилюминальным и примедиальным (Velican, Velican, 1978; Orekhov et al., 1987; Mukhin et al., 1991). Было показано, что прилюминальный субслой обогащен протеогликаном и распространяется от люминальной поверхности артерий на две трети толщины интимы, тогда как оставшаяся треть ее толщины соответствует примедиальному субслою, являющемуся мышечно-эластическим (Velican, Velican, 1977; Orekhov et al., 1987; Velican et al., 1988; Mukhin et al., 1991).

Показано, что примедиальный мышечно-эластический слой в отличие от прилюминального вовлечен в атерогенез в значительно меньшей степени (Orekhov et al., 1987, 2010; Andreeva et al., 1991, 1997; Mukhin et al., 1991). Хотя отложения липидов главных классов были обнаружены в обоих субслоях, увеличение содержания липидов в прилюминальном субслое было более выраженным и обусловлено в основном свободным и этерифицированным холестерином (Mukhin et al., 1991). Сообщалось, что в нормальной интиме количество иммуновоспалительных клеток различается в субслоях, а лимфоциты, дендритные клетки и макрофаги более часто встречаются во внешней части интимы (Bobryshev, Lord, 1995, 1996).

В настоящей работе мы изучали степень корреляции между отложением липидов, содержанием иммуновоспалительных клеток и экспрессией молекул HLA-DR главного комплекса гистосовместимости класса II в диффузном утолщении интимы (ДУИ). Последнее, как считают, представляет собой самое раннее проявление патологических изменений интимы, предшествующих развитию атеросклеротических поражений сосудов (Willens, 1951; Movat et al., 1958; Sary et al., 1994; Bobryshev et al., 1995; Virmani et al., 2000). В соответствии с существующим определением ДУИ характеризуется утолщением интимы, которое диффузно распределено в артериальной стенке больших артерий (Anichkow, 1947; Geer et al., 1960; Sary et al., 1994). ДУИ встречается у всех взрослых людей (Anichkow, 1947; Geer et al., 1960) и с клинической точки зрения является для них нормой.

Предполагается, что в патогенезе атеросклероза ДУИ представляет собой стадию, непосредственно предшествующую заболеванию (Anichkow, 1947; Geer et al., 1960). Наряду с анализом корреляции между отложением липидов, содержанием иммуновоспалительных клеток и экспрессией HLA-DR в ДУИ мы также изучили корреляцию между отложением липидов и содержанием иммуновоспалительных клеток при сравнении прилюминальных и примедиальных субслоев интимы. В экспериментах с использованием первичной культуры клеток интимы мы указали на возможное влияние модифицированных липопротеидов низкой плотности (мЛНП) на экспрессию HLA-DR и цитокинов.

## Материал и методика

Аутопсийный материал. Грудную аорту человека извлекали через 1.5—3 ч после внезапной смерти у 7 мужчин в возрасте 30—60 лет. Сосуды вскрывали про-

должно и промывали изотоническим фосфатным буферным раствором (ИФБ), pH 7.6. Внешне непораженные участки и участки с атеросклеротическими изменениями, а также ДУИ обнаруживали макроскопически согласно классификации Совета по атеросклерозу Американской ассоциации сердца (Velican, Velican, 1978). Макроскопически непораженные участки имели гладкую поверхность просвета. Микроскопически они классифицировались как интимное утолщение с двумя структурированными субслоями — протеогликановым слоем и мышечно-эластическим слоем. После макроскопической идентификации участки образцов размером 5×10 мм вырезали перпендикулярно длинной оси сосуда. Нефиксированные образцы погружали в OCT compound (Miles Inc., Elkhart, IN, США), замораживали в жидком азоте и готовили криостатные срезы толщиной 5 мкм. От каждого образца с ДУИ получали несколько последовательных наборов срезов.

Один срез каждого образца окрашивали гематоксилин-эозином по стандартной процедуре для микроскопической идентификации. Другие последовательные срезы из каждого набора использовали для: 1) хроматографического определения липидов после экстрагирования их смесью растворителей; 2) морфометрического анализа после окрашивания масляным красным O (Oil Red O); 3) морфометрического анализа экспрессии HLA-DR после иммуногистохимического окрашивания; 4) морфометрического определения содержания иммуновоспалительных клеток, идентифицированных иммуногистохимическим окрашиванием при использовании смеси антител против антигенов CD14 и CD45.

Определение содержания иммуновоспалительных клеток основывалось на предположении о том, что использование смеси антител против CD14 и CD45 дает представление об основной части или даже обо всей популяции этих клеток (Poston, Hussain, 1993; Vanderlaan, Reardon, 2005; Galkina, Ley, 2007; Weber et al., 2008; Orekhov et al., 2010). Остальные последовательные криостатные срезы из каждого набора использовали для контроля. Кроме того, срезы ДУИ применяли для иммуногистохимического анализа клеточного состава интимы после соответствующего окрашивания с участием антител, специфичных к выбранному типу клеток. Часть образцов с ДУИ использовали для приготовления пленочных (Hautchen) гистопрепаратов с последующим окрашиванием и иммуногистохимическим или иммунофлуоресцентным анализом (Andreeva et al., 1998; Bobryshev, Lord, 2002). Образцы тканей аорты применяли также для получения культуры клеток интимы. Эксперименты *in vitro* проводили для изучения влияния ЛНП на экспрессию HLA-DR и образование цитокинов.

Для хроматографического определения липидов на криостатном срезе интимный слой отделяли от медиа под бинокулярным контролем с помощью микродиссекционного пинцета. Фосфолипиды, триглицериды, холестерин и эфиры холестерина разделяли тонкослойной хроматографией на силикагеле с последующим количественным измерением (Mukhin et al., 1991).

Для гистохимического выявления липидов в масляным красным O срезы фиксировали 4%-ным формальдегидом в течение 4 мин, а затем окрашивали (Pearse, 1969). Иногда визуализацию липидов комбинировали с иммуногистохимической идентификацией HLA-DR.

Иммуногистохимические процедуры осуществляли, как было описано ранее (Bobryshev, Lord,

1998, 1999). Срезы обрабатывали смесью антител против антигенов CD14 и CD45, которая позволяет идентифицировать одновременно Т- и В-лимфоциты, моноциты и макрофаги. Для отрицательного контроля антитела были заменены либо неиммунной фракцией иммуноглобулина мыши, либо иррелевантными моноклональными антителами.

**Морфометрический анализ.** Окрашенные масляным красным О липиды, CD14/CD45-клетки и HLA-DR были подсчитаны в каждом микроучастке интимы, включающем в себя эндотелий и внутреннюю эластическую мембрану, с помощью программы NIH Image PC для морфометрии (Orekhov et al., 2010). Данные, полученные по каждому срезу, были объединены и выражены как число клеток на 1 мм эндотелиальной выстилки.

Двойное окрашивание CD3/HLA-DR использовали для тканевых пленочных образцов «Hautchen» с целью проанализировать возможность совмещенной локализации Т-клеток и клеток, экспрессирующих HLA-DR (Bobryshev, Lord, 1998, 2002).

Экспрессию HLA-DR и ассоциацию HLA-DR с апоВ в ДУИ анализировали с помощью иммунофлуоресцентного анализа. Использовали моноклональные антитела к HLA-DR, меченные ФИТЦ (Сорбент, Москва), и биотинилированные моноклональные антитела к апоВ (Имтек, Москва, Россия). Иммунофлуоресцентный анализ выполняли, как описано ранее (Bobryshev et al., 2011). Количественное определение общего числа клеток и клеток, экспрессирующих конкретный антиген в разных слоях интимы, проводили, как описано ранее (Bobryshev et al., 2011).

**Измерение экспрессии молекул HLA-DR.** Клетки отмывали 5 раз 200 мкл 0.2%-ного раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ИФБ. Для подавления эндогенной пероксидозной активности в лунки добавляли по 200 мкл 3%-ного  $H_2O_2$  на 10 мин при комнатной температуре. Клетки промывали 5 раз в 200 мкл 0.2%-ного БСА. В лунки вносили 200 мкл 2%-ного БСА и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Лунки промывали 5 раз 200 мкл 0.2%-ного БСА. К клеткам добавляли 200 мкл 2%-ного БСА, содержащего мышинные моноклональные антитела против молекулы гистосовместимости II типа человека из расчета 1 мкг антител на 200 мкл БСА (в ИФБ). Клетки инкубировали 1 ч при 37 °С. Лунки промывали 0.2%-ным БСА. В лунки вносили по 200 мкл козьих поликлональных антител против иммуноглобулинов мыши, меченных пероксидазой, и инкубировали 1 ч при 37 °С. Клетки промывали 5 раз 200 мкл 0.2%-ного БСА. Добавляли 200 мкл субстратного буфера: 12 мл 0.1 М цитратного буфера, pH4.5, 5 мг о-фенилендиамина, 18 мкл 3%-ного  $H_2O_2$ , инкубировали 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 40 мкл 50 %  $H_2SO_4$ . Оптическую плотность измеряли при длине волны 492 нм на спектрофотометре Multiskan Bichromatic (Labsystems, США). В качестве контроля использовали лунки, в которых не было клеток.

Обычную электронную микроскопию и идентификацию типов клеток проводили, как описано ранее (Bobryshev, Lord, 1995, 1996).

**Электронно-микроскопический гистохимический анализ.** Визуализацию нейтральных липидов выполняли, используя  $OsO_4$  (Guyton, Klemp, 1988), как описано ранее (Bobryshev, Lord, 1999; Bobryshev et al., 1999). Идентификацию незтерифицированного холестерина проводили с использованием филипина по

описанному протоколу (Kruth, 1984; Bobryshev, Lord, 1999). В ряде опытов окрашивание филипином комбинировали с обработкой образцов  $OsO_4$  для визуализации нейтральных липидов. Далее образцы заключали в Аралдит согласно рутинному протоколу. Ультратонкие срезы изучали с помощью электронного микроскопа Hitachi H7000.

Для *in vitro*-анализа влияния ЛНП на экспрессию антигена HLA-DR и образования цитокинов клетками интимы, выделенными из ДУИ, готовили первичную культуру клеток интимы, как описано ранее (Sobenin et al., 1994). Нативные ЛНП и естественно-модифицированные ЛНП (мЛНП) получали хроматографией с лектином (Tertov, Orekhov, 1997; Tertov et al., 1998). На 5-е сут культивирования к клеткам добавляли нативные ЛНП и мЛНП (100 мкг апоВ/мл) и инкубировали 24 ч. Затем проводили измерение холестерина, экспрессию HLA-DR и образование фактора некроза опухоли (TNF-альфа) и интерлейкина-1 (IL-1). Для этого использовали метод ELISA (Thorne et al., 1996).

Данные, подвергнутые статистической обработке с применением пакета программ SPSS (версия 14.0, США), представлены в форме средней величины и квадратического отклонения с 95%-ной оценкой значимости.

## Результаты

Распределение экспрессии HLA-DR в ДУИ. Использование иммуногистохимии в настоящем исследовании показало, что гладкомышечные клетки, экспрессирующие альфа-актин, представляют главную клеточную популяцию в ДУИ. Макрофаги (CD68(+)), Т-лимфоциты (CD3(+)) и дендритные клетки (S100(+)) были идентифицированы во всех образцах аорты, что соответствует нашим более ранним наблюдениям (Bobryshev, Lord, 1995, 1996). Отметим, что В-клетки (CD20(+)) встречались редко. Экспрессию HLA-DR отмечали в клетках, неравномерно распределенных по интиме (рис. 1). Идентификацию антигена к HLA-DR отмечали в тех же зонах тканей, в которых выявлялось присутствие липидов по окрашиванию масляным красным О (рис. 2, а), хотя липиды выявлялись не только внутриклеточно, но и в межклеточном пространстве (рис. 2, б, в).

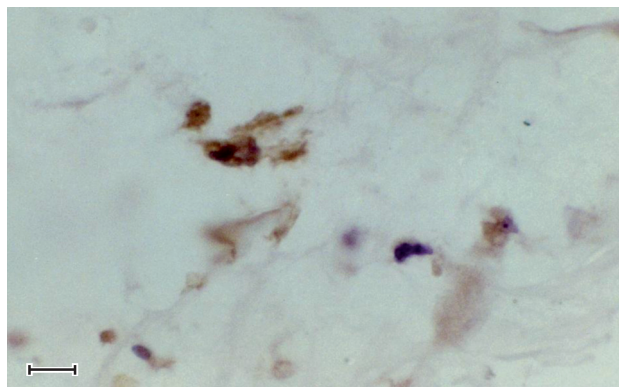


Рис. 1. HLA-DR-положительные клетки, выявленные иммунопероксидазным методом в плоскостном препарате ткани интимы аорты.

Масштабная линейка — 10 мкм.

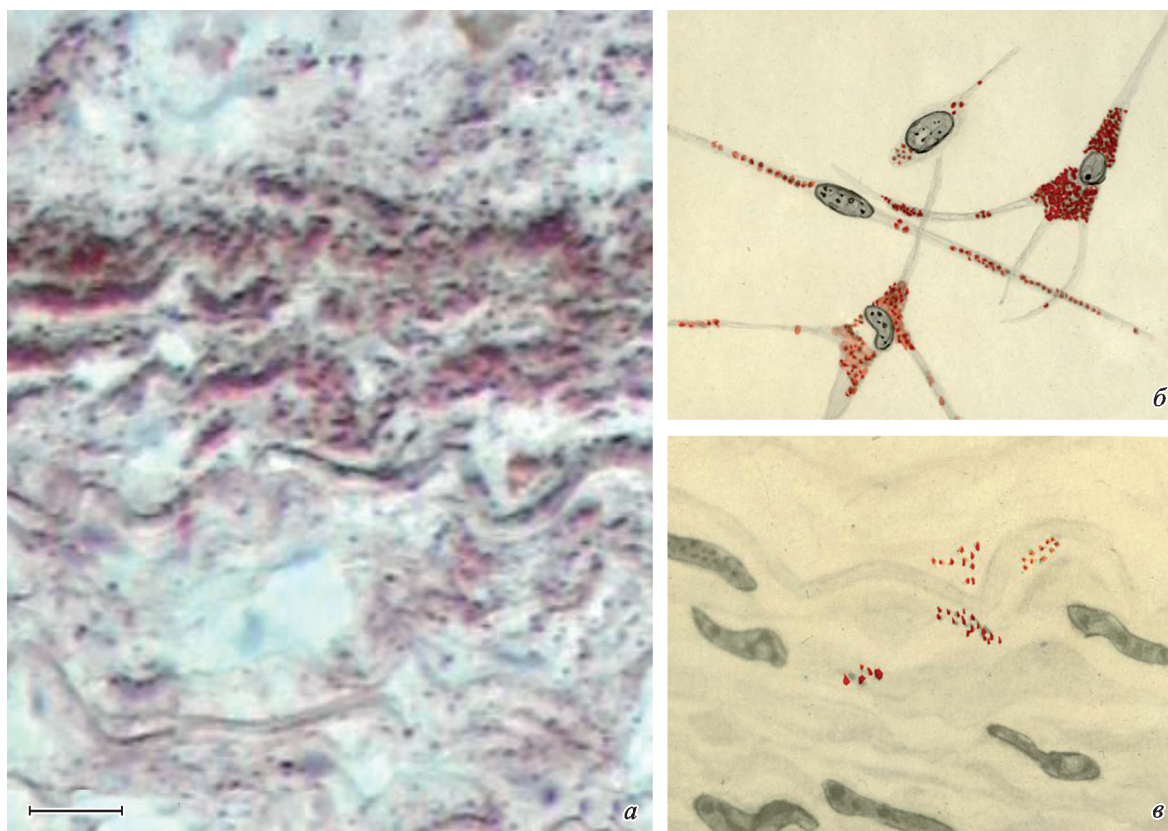


Рис. 2. Липиды в срезе интимы аорты, выявленные с помощью масляного красного О (а), и схемы, показывающие внутриклеточную локализацию липидов в интимных клетках (б) и внеклеточную локализацию липидов вдоль эластических волокон (в).

Масштабная линейка — 100 мкм (а).

Кроме выявления HLA-DR иммуногистохимическим пероксидазным методом HLA-DR анализировали с помощью иммунофлуоресцентной гистохимии (рис. 3, 4). Иммунофлуоресцентный метод в сочетании с конфокальной микроскопией позволил изучить интиму, не нарушая ее архитектоники и межклеточных связей. Это позволило произвести количественный анализ клеток HLA-DR(+), находящихся на разной «глубине» от люминальной поверхности аорты.

Данные иммунофлуоресцентного анализа подтвердили, что клетки HLA-DR(+) в интиме распределены неравномерно. Для определения числа клеток HLA-DR(+), локализованных на разной глубине от люминальной поверхности интимы, толщину каждого образца ДУИ делили на 3 равные части. При этом предполагали, что 2/3 внутренней части интимы соответствуют прилюминальному субслою криостатной зоны ткани, а внешняя треть, примыкающая к внутренней эластической оболочке, — примедиальному субслою. Количественное сравнение числа клеток, экспрессирующих HLA-DR (процентную долю от общего числа клеток в каждом субслое), позволило обнаружить, что доля клеток-HLA-DR(+) была значительно выше в прилюминальном субслое, чем в примедиальном (рис. 5).

Для выяснения того, содержат ли клетки HLA-DR(+) интимы апоВ, мы использовали конфокальную микроскопию и показали, что существует небольшое количество клеток, цитоплазма которых содержит апоВ. Однако этого нельзя сказать о большинстве клеток интимы, экспрессирующих HLA-DR. В клетках, содержащих апоВ,

этот белок выявлялся в перинуклеарной цитоплазме и участвовал в клеточных процессах. АпоВ был также обнаружен во внеклеточном матриксе интимы. Внеклеточный апоВ распределялся по всей толщине интимы, тогда как внутриклеточный присутствовал только в прилюминальном субслое интимы.

Ультраструктурный анализ распределения липидов в ДУИ. Электронно-микроскопический анализ ДУИ обнаружил присутствие в нем иммуновоспалительных клеток, включая макрофаги, лимфоциты и дендритные клетки, наиболее часто наблюдаемые во внешней части прилюминального субслоя. Кроме того, присутствовали клетки, содержащие в цитоплазме липидные включения. В некоторых интимных клетках липидные включения были многочисленными, что позволяло классифицировать такие клетки как пенстые клетки (рис. 6).

В соответствии с данными световой микроскопии (рис. 2), ультраструктурный анализ распределения липидов в интиме показал, что в прилюминальном субслое «липидные капли» располагаются как вне, так и внутри клеток, тогда как в примедиальном субслое липиды преобладают во внеклеточном матриксе, часто располагаясь там вдоль эластических волокон (рис. 7).

Электронно-микроскопический гистохимический анализ обнаружил присутствие нейтральных липидов и неэтерифицированного холестерина как в прилюминальном, так и в примедиальном субслое интимы. В отличие от прилюминального субслоя, где присутствие нейтральных липидов и неэтерифицированного холестерина было

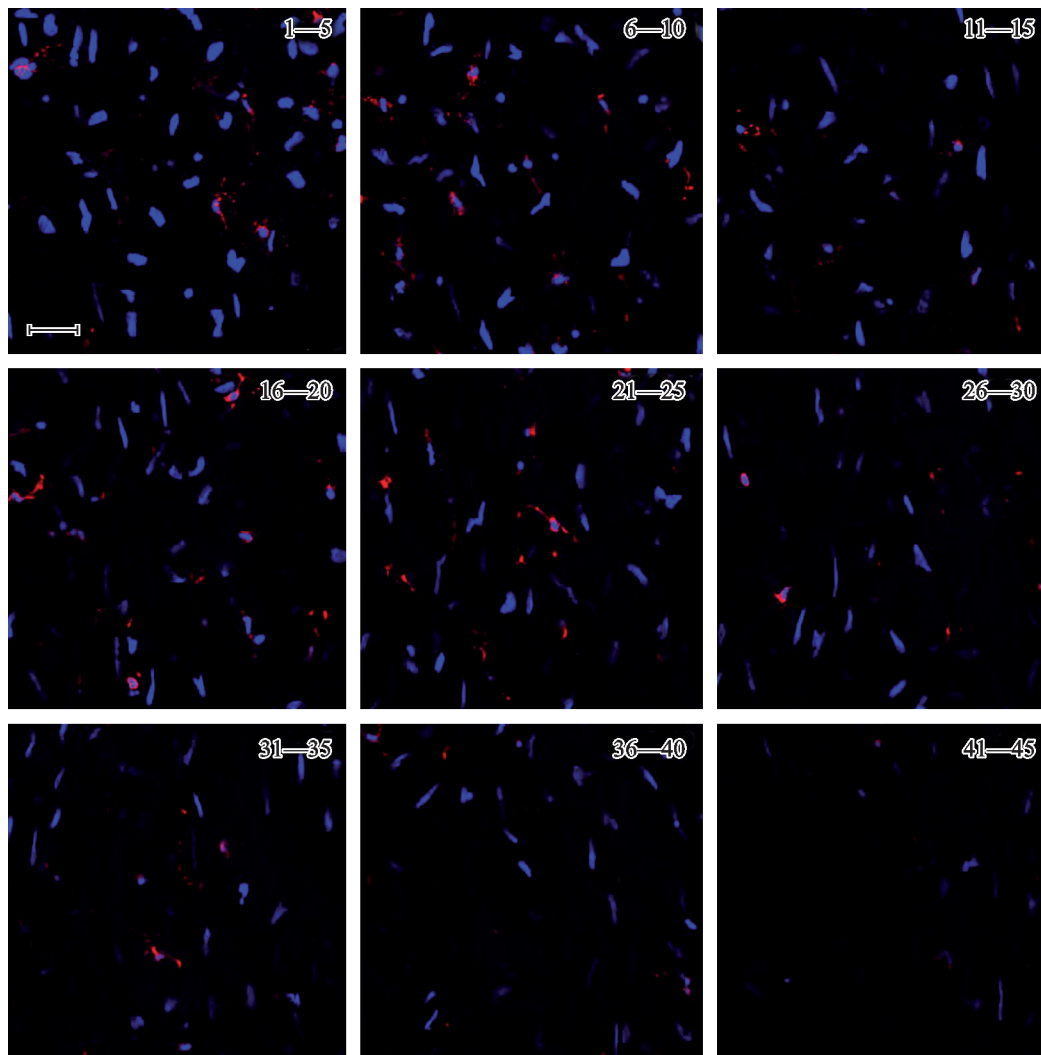


Рис. 3. HLA-DR-положительные клетки, выявленные иммунофлуоресцентным методом в плоскостном препарате ткани интимы аорты человека.

45 оптических срезов были получены с интервалом 1 мкм. Каждое изображение в галерее — проекция 5 оптических срезов. Антитела к HLA-DR конъюгированы с красителем Alexa 633, ядра окрашены бромистым этидием. Масштабная линейка — 10 мкм.

зафиксировано во внеклеточном матриксе, отложение этих компонентов в примедиальном субслое ассоциировалось в основном с измененными эластическими волокнами. В примедиальном субслое 10—15 % эластических волокон имели признаки изменений в результате вакуолизации матрикса этих волокон.

Вакуолизация эластических волокон является, видимо, результатом образования безэластиновых полостей внутри относительно гомогенного эластинового матрикса волокон. Такие полости в эластических волокнах наблюдались как в периферических, так и в центральных частях волокон. Полости в матриксе эластических волокон часто соединялись. Нейтральные липиды преимущественно были локализованы в зонах расположения таких полостей в эластических волокнах (рис. 8, а, б). При гистохимическом окрашивании с использованием филипина комплексы филипин—стерол, представляющие собой ламеллярные структуры с расстоянием между ламеллами 10—20 нм, наблюдались в ассоциации с разрушающимися эластическими волокнами (рис. 8, в). В примедиальном субслое комплексы филипин—стерол были обнаружены также во внеклеточном матриксе интимы, где они

примыкали к внешней границе эластических волокон (рис. 9). Использование комбинации действия  $\text{OsO}_4$  и гистохимического окрашивания филипином показало, что некоторые полости в эластических волокнах были заполнены нейтральными липидами и неэтерифицированным холестерином.

Количественный анализ ассоциации между накоплением липидов, числом иммунновоспалительных клеток и экспрессией HLA-DR в ДУИ. Для того чтобы оценить корреляцию между отложением липидов, содержанием иммунновоспалительных клеток и экспрессией HLA-DR, мы изучали эти параметры в последовательных криостатных срезах одних и тех же образцов интимы.

Прежде всего мы проверили, совпадают ли данные по определению количества разных классов липидов, определенных с помощью химического анализа после экстрагирования из криостатных зон интимы аорты и последующего хроматографического разделения, с содержанием липидов, определенным гистохимически в последовательных срезах тех же образцов ткани. Морфометрический метод использовали для оценки количества липи-

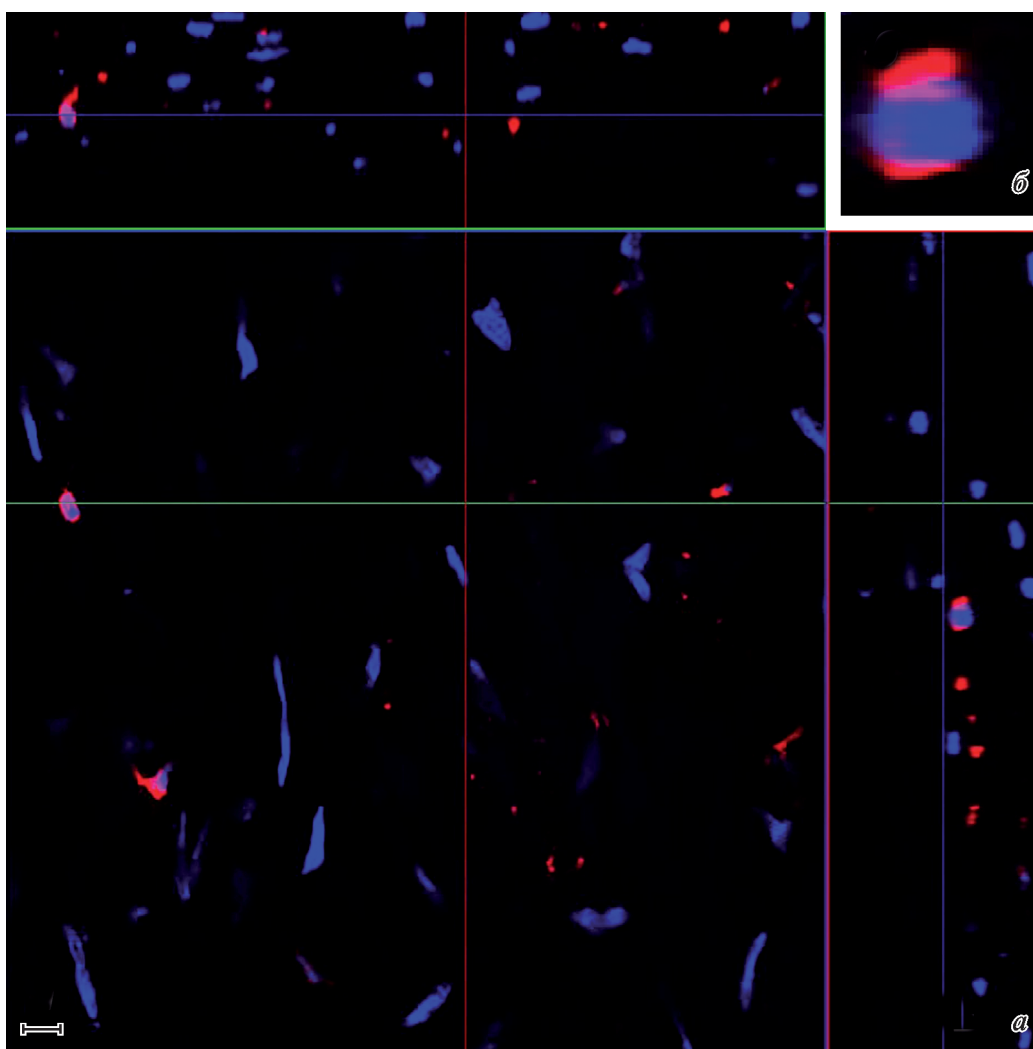


Рис. 4. HLA-DR-положительные клетки, выявленные иммунофлуоресцентным методом в плоскостном препарате ткани интимы аорты человека.

*a* — ортогональная проекция 5 оптических срезов, полученных с интервалом 1 мкм. Антитела к HLA-DR конъюгированы с красителем Alexa 633, ядра окрашены бромистым этидием; *b* — деталь рисунка, *a*; масштабная линейка — 10 мкм.

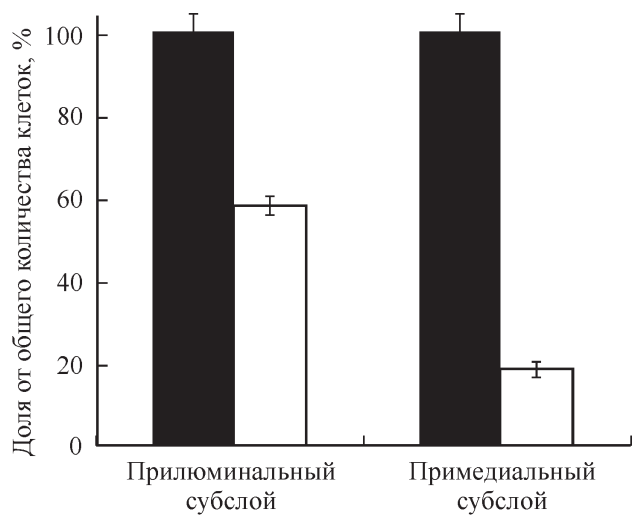


Рис. 5. Доля HLA-DR-положительных клеток (светлые столбцы) в субслоях интимы.

Темные столбцы — общее количество клеток в субслое ДУИ.

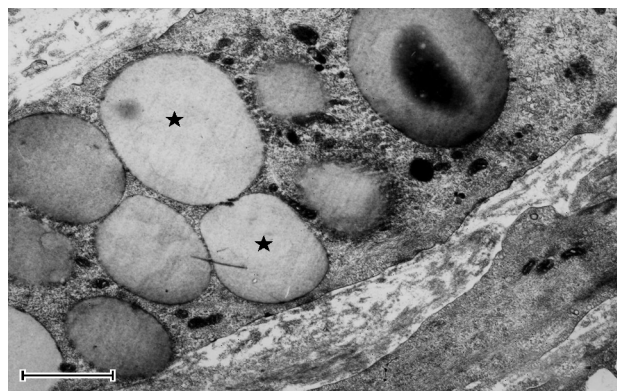


Рис. 6. Липидные включения (липидные капли, помечены звездочками) в интимной клетке аорты. Электронная микроскопия.

Масштабная линейка — 0.5 мкм.

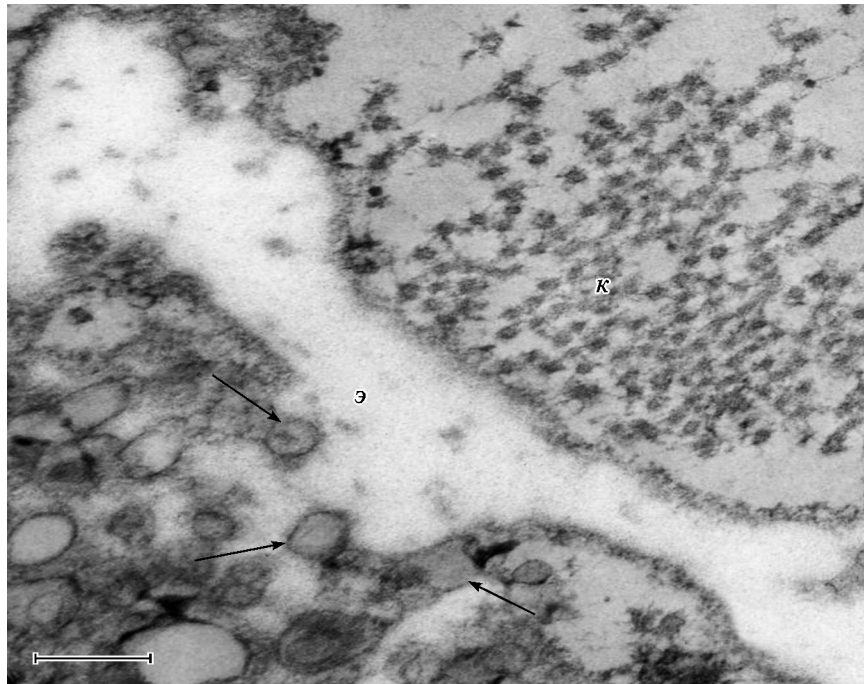


Рис. 7. Внеклеточные липиды (указаны стрелками), плотно прилежащие к эластическому волокну (Э). Электронная микроскопия.  
к — коллагеновые волокна; масштабная линейка — 0,3 мкм.

дов, наблюдаемых с помощью окрашивания масляным красным О, тогда как с помощью химического анализа идентифицировали триглицериды, холестерин, эфиры холестерина и фосфолипиды в одних и тех же локусах интимы.

Установили, что между общим количеством липидов, обнаруженных с помощью окрашивания, и количеством эфиров холестерина, свободным холестерином и фосфолипидами существует положительная корреляция ( $r = 0.72-0.95$ ). Положительная корреляция существовала и между вне- и внутриклеточными липидами (окрашивание масляным красным О) и количеством свободного холестерина, эфиров холестерина и фосфолипидами ( $r = 0.68-0.95$ ). Не обнаружили значимой корреляции между количеством триглицеридов, идентифицированных химическим способом, и количеством липидов, определенных морфометрически после окрашивания.

Последовательные криостатные срезы тканей ДУИ были подвергнуты дальнейшему анализу для поиска корреляции между липидами, окрашенными масляным красным О, и содержанием иммуновоспалительных клеток, идентифицированных иммуногистохимически с помощью смеси антител анти-CD14 и анти-CD45. Общее отложение липидов достоверно коррелирует с суммарным количеством иммуновоспалительных клеток ( $r = 0.59$ ).

Корреляция между общим отложением липидов и числом иммуновоспалительных клеток была выше в прилюминальном субслое, чем в примедиальном субслое интимы ( $r = 0.69$  и  $r = 0.28$  соответственно). Число как внеклеточных, так и внутриклеточных липидов, идентифицированных окрашиванием, положительно коррелировало с общим числом иммуновоспалительных клеток в интимае ( $r = 0.58$  и  $r = 0.51$  соответственно). Коэффициенты корреляции между количеством иммуновоспалительных клеток и вне- и внутриклеточными отложениями ли-

пидов в примедиальном субслое (0,28 и 0,18 соответственно) были заметно ниже, чем аналогичные параметры в прилюминальном субслое (0,70 и 0,48 соответственно). Не было обнаружено значимой корреляции между количеством иммуновоспалительных клеток и внутриклеточным отложением липидов в примедиальном субслое ( $r = 0.18$ ). Напротив, в прилюминальном субслое коэффициент корреляции между внутриклеточным содержанием липидов и числом иммуновоспалительных клеток был значительно выше ( $r = 0.48$ ), чем это значение для примедиального субслоя.

Корреляция между содержанием липидов разных классов и количеством иммуновоспалительных клеток в ДУИ была значимой с эфирами холестерина, свободным холестерином и фосфолипидами ( $r = 0.82-0.97$ ), но не с триглицеридами.

Было также обнаружено, что экспрессия HLA-DR положительно коррелирует в образцах ткани ДУИ как с количеством иммуновоспалительных клеток, так и с суммарными липидными отложениями ( $r = 0.66$  и  $r = 0.79$  соответственно).

Наконец, в опытах *in vitro* изучали возможность нативных ЛНП и мЛНП влиять на внеклеточную аккумуляцию липидов, экспрессию HLA-DR и образование цитокинов (TNF-альфа и IL-1). Все эти показатели существенно возрастали под действием мЛНП, но не нативных ЛНП. Коэффициенты корреляции между содержанием внеклеточных липидов и экспрессией HLA-DR, TNF-альфа и IL-1 составили 0,93, 0,99 и 0,99 соответственно.

## Обсуждение

Известно, что атеросклеротическое поражение характеризуется накоплением большого количества иммуновоспалительных клеток (Poston, Hussain, 1993; Wick

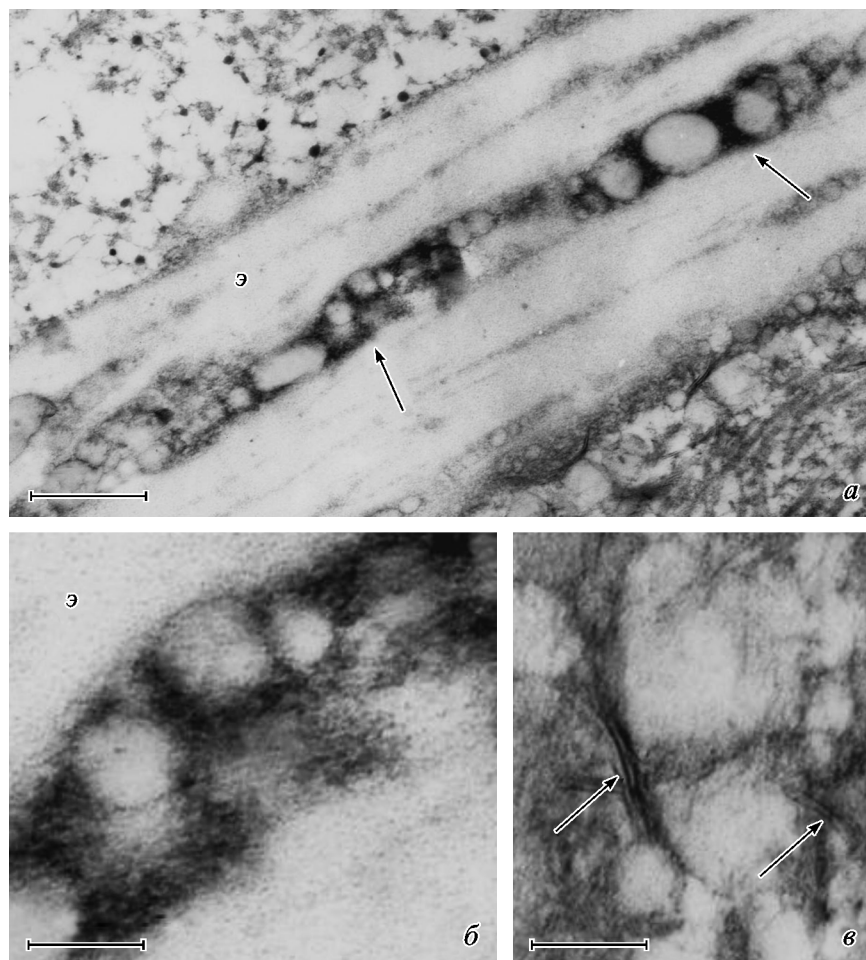


Рис. 8. Одновременная визуализация нейтральных липидов (по методу: Guyton, Klemp, 1988) и неэтерифицированного холестерина с использованием филипина (по протоколу: Kruth, 1984; Bobryshev, Lord, 1999), локализованных внутри поврежденного эластического волокна в интима аорты (а–в).

б — деталь рисунка; а; стрелки показывают зоны локализации нейтральных липидов (а) и на кристаллы неэтерифицированного холестерина (в), выявленного посредством реакции с филипином; э — эластин; масштабные линейки — 1 (а), 0,2 (б) и 0,1 (в) мкм.

et al., 1997, 2004; Bobryshev, Lord, 1998; Bobryshev, 2005; Vanderlaan, Reardon, 2005; Galkina, Ley, 2007; Weber et al., 2008; Hansson, 2009; Orekhov et al., 2010; Hansson, Hermansson, 2011). Общеизвестно, что это накопление и отложение липидов происходят на ранних стадиях развития атеросклероза (Schwartz et al., 1995; Wick et al., 1997, 2004; Ross, 1999; Bobryshev, 2005; Vanderlaan, Reardon, 2005; Hansson, 2009; Hansson, Hermansson, 2011), однако до сих пор не было количественной оценки взаимосвязи этих процессов. В настоящей работе предпринята попытка закрыть эту «брешь». Мы развиваем подход, который позволяет анализировать отложение липидов, концентрирование иммуновоспалительных клеток и экспрессию HLA-DR в одних и тех же образцах ткани при использовании ее последовательных срезов. Нами впервые показано, что существует положительная корреляция между отложением липидов и содержанием иммуновоспалительных клеток в ДУИ, что соответствует представлению об ответственности иммуновоспалительных клеток за активацию лимфоцитов начиная с самых ранних стадий развития атеросклероза (Wick et al., 1997, 2004; Bobryshev, 2005; Hansson, 2009; Hansson, Hermansson, 2011).

Вместе с тем в настоящей работе установлено, что существует положительная корреляция между отложением

липидов и экспрессией HLA-DR. Молекула HLA-DR считается маркером иммунной активации (Handunnetthi et al., 2010). Экспрессия HLA-DR отражает способность иммуновоспалительных клеток доставлять антиген к Т-клеткам (Hansson, 2009; Hermansson, 2011). Нормальная интима артерии содержит разные клетки, включая макрофаги, Т-клетки и дендритные клетки, совокупность которых контролирует микроокружение на присутствие потенциально опасных антигенов (Wick et al., 1997, 2004; Bobryshev, 2005; Vanderlaan, Reardon, 2005; Hansson, 2009; Hansson, Hermansson, 2011).

Ранее показано, что на первых стадиях атеросклероза антигенпрезентирующие клетки активируются и экспрессируют увеличенные количества молекул главного комплекса гистосовместимости класса II (Wick et al., 1997, 2004; Bobryshev, 2005; Hansson, 2009; Hansson, Hermansson, 2011). Другим маркером клеточной активации, который указывает на стресс клеток, является белок теплового шока 70 (Hsp-70). Его повышенная экспрессия обнаружена на самых ранних стадиях атеросклеротических изменений интимы (Bobryshev, Lord, 2002). Образование кластеров дендритными клетками и лимфоцитами также происходит на ранних стадиях атеросклеротического поражения (Bobryshev, Watanabe, 1997; Wick et al., 1997,



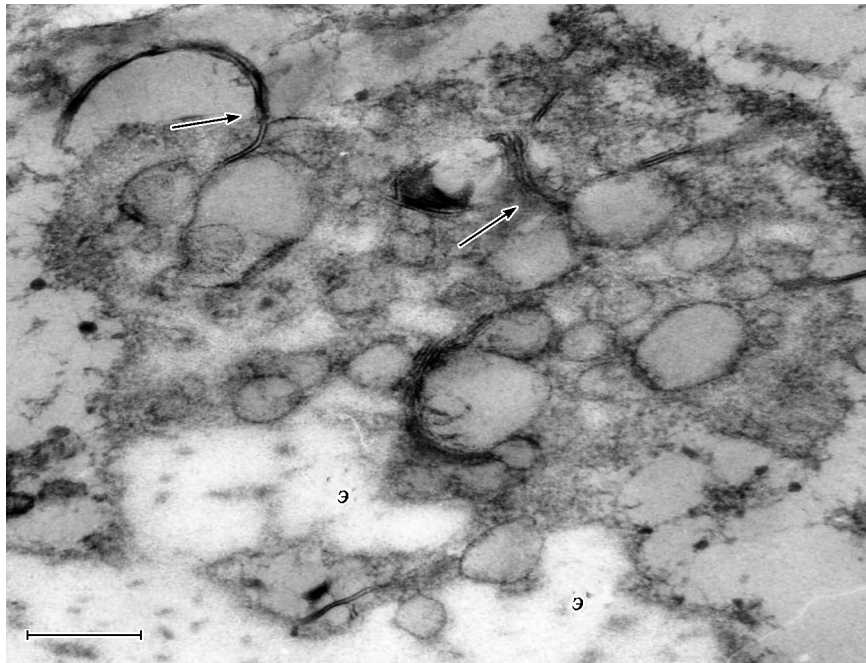


Рис. 9. Неэтерифицированный холестерин (указан стрелками), выявленный посредством использования филипина (по протоколу: Kruth, 1984), в межклеточном матриксе интимы аорты.

Масштабная линейка — 0,2 мкм.

2004; Bobryshev, 2005). В согласии с более ранними сообщениями (Bobryshev, 2005; Bobryshev, Lord, 1995, 1996) в настоящей работе показано, что в ДУИ Т-клетки вступают в прямой контакт с клетками, экспрессирующими HLA-DR.

Факторы, отвечающие за активацию клеток интимы при развитии атеросклероза, до конца не изучены. Тем не менее признано, что атерогенные ЛНП и окисленные фосфолипиды могут играть важную роль в иммунной активации (Wick et al., 1997, 2004; Berliner, Watson, 2005; Bobryshev, 2005; Vanderlaan, Reardon, 2005; Hansson, 2009; Hansson, Hermansson, 2011). В нашей предыдущей работе мы показали, используя флуоресцентную микроскопию и антитела к апоВ (единственному белковому компоненту ЛНП человека), что липопротеиды аккумулируются в интимае перед образованием жировых полос (Babaev et al., 1993). Настоящее флуоресцентное исследование позволило проанализировать возможную ассоциацию апоВ и клеток, экспрессирующих HLA-DR. Обнаружено присутствие апоВ в цитоплазме некоторых клеток, экспрессирующих HLA-DR. Этот факт указывает на наличие «микроэпицентров», в которых на ранних стадиях атеросклероза может происходить начальная активация антигенпрезентирующих клеток интимы. В пользу этого свидетельствуют результаты, полученные *in vitro*, в которых установлено, что модифицированные ЛНП влияют как на экспрессию HLA-DR, так и на образование цитокинов в клетках интимы. Отметим, что статины снижают инфильтрацию иммуновоспалительными клетками и экспрессию провоспалительных цитокинов при атеросклерозе у человека и животных (Klingenberg, Hansson, 2009; Montecusco, Mach, 2009).

В отличие от «простой» интимы экспериментальных животных, широко используемой для моделирования атеросклероза (Weber et al., 2008; Bentzon, Falk, 2010), интима больших артерий человека является более сложной си-

стемой, которую можно разделить на субслои, играющие, вероятно, разную роль на начальных этапах патологии (Velican, Velican, 1977; Orekhov et al., 1987; Velican et al., 1988; Andreeva et al., 1991; Mukhin et al., 1991; Rekhter et al., 1991). Нами продемонстрировано, что коэффициенты корреляции между количеством иммуновоспалительных клеток и экспрессией HLA-DR различны для разных субслоев. В соответствии с данными более ранних публикаций (Orekhov et al., 1987, 2010; Mukhin et al., 1991; Andreeva et al., 1997), в настоящей работе подтверждено, что на ранних стадиях атеросклероза вклад внутреннего прилюминального субслоя в иммунные процессы является более выраженным, чем вклад внешнего примедиального мышечно-эластичного субслоя.

Тем не менее и вклад примедиального субслоя в ранние стадии атеросклероза также может быть достаточно важен. В отличие от прилюминального субслоя, в котором липиды обнаруживаются внутри клеток и во внеклеточном матриксе, в примедиальном субслое липиды, включая неэтерифицированный холестерин и нейтральные липиды, обнаруживаются главным образом вдоль и внутри эластических волокон. Эластические волокна, которые содержали липидные отложения, имели признаки дегенерации, выраженные в виде вакуолизации и разрушения. Эластин — наиболее распространенный белок в стенке больших артерий, подвергаемый пульсирующему напряжению при сердечном сокращении (Brooke, Bayes-Genis, 2003). В последние годы интенсивно изучали процессы биосинтеза и функции эластина. Стало известно, в частности, что эластин — важный аутокринный фактор, обеспечивающий гомеостаз сосудов за счет биомеханической поддержки и биосигнализации (Brooke, Bayes-Genis, 2003; Katsuda, Kaji, 2003). Накапливаются данные о том, что эластин — важный регулятор активности гладкой мускулатуры в сосудистом морфогенезе и патологии (Katsuda, Kaji, 2003). С возрастом происходят

структурные изменения эластина (Brooke, Bayes-Genis, 2003; Katsuda, Kaji, 2003). Показано, что содержание эластина снижается по мере накопления липидов в процессе атеросклероза, что приводит к потере эластичности и увеличению подверженности действию ферментов, разрушающих эластин (Katsuda, Kaji, 2003).

Факт, что неэтерифицированный холестерин и нейтральные липиды захватываются деградирующими эластическими волокнами в примедиальном субслое интимы, свидетельствует о вкладе внеклеточных структур в аккумуляцию холестерина начиная с самых ранних стадий патологии. Взаимодействия между эластином и липидами, имеющие место в разрушающихся эластических волокнах, изучены недостаточно (Noma et al., 1981; Seyama, Wachi, 2004). Мы надеемся возродить интерес к анализу взаимодействия между липидами и эластином, а также вкладу этого взаимодействия в атеросклеротическое поражение.

В целом результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что процессы, имеющие место на ранних стадиях атеросклероза, различны в разных субслоях интимы. Мы склонны считать, что прилюминальный слой представляет собой «пространство», где иницируются иммунные процессы, тогда как в примедиальном субслое происходит удержание липидов внутри деградирующих эластических волокон. Разрушение эластических волокон в глубине интимы может являться весьма существенным и самым ранним событием в образовании фокальных зон, свободных от волокон, в которых формируется в конечном счете липидно-некротический локус.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ с использованием оборудования, приобретенного за счет средств программы развития Московского государственного университета.

#### Список литературы

- Andreeva E. R., Orekhov A. N., Smirnov V. N. 1991. Quantitative estimation of lipidladen cells in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Acta Anat. (Basel)*. 141 : 316—323.
- 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—142.
- Anichkow N. N. 1947. Vessels. In: *Handbook on particular human anatomy and pathology*. Part II. Heart and vessels. Moscow: Medgiz. 262—558.
- 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.
- Berliner J. A., Watson A. D. 2005. A role for oxidized phospholipids in atherosclerosis. *N. Engl. J. Med*. 353 : 9—11.
- Bobryshev Y. V. 2005. Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance. *Eur. Heart J*. 26 : 1700—1704.
- 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. 1996. 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. 1999. Accumulation of co-localized unesterified cholesterol and neutral lipids within vacuolised elastin fibres in athero-prone areas of the human aorta. *Atherosclerosis*. 142 : 121—131.
- 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. *Vasc. Surg*. 35 : 368—375.
- Bobryshev Y. V., Lord R. S., Warren B. A. 1995. Calcified deposit formation in intimal thickenings of the human aorta. *Atherosclerosis*. 118 : 9—21.
- Bobryshev Y. V., Moisenovich M. M., Pustovalova O. L., Agapov I. I., Orekhov A. N. 2012. Widespread distribution of HLA-DR-expressing cells in macroscopically undiseased intima of the human aorta: a possible role in surveillance and maintenance of vascular homeostasis. *Immunobiology*. 217 : 558—568.
- Bobryshev Y. V., Watanabe T. 1997. Ultrastructural evidence for association of vascular dendritic cells with T-lymphocytes and with B-cells in human atherosclerosis. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol*. 29 : 209—221.
- Brooke B. S., Bayes-Genis A. 2003. Li DY. New insights into elastin and vascular disease. *Trends Cardiovasc. Med*. 13 : 176—181.
- Galkina E., Ley K. 2007. Leukocyte influx in atherosclerosis. *Curr. Drug Targets*. 8 : 1239—1248.
- Geer J. C., McGill H. C., Strong J. P., Holman R. L. 1960. Electron microscopy of human atherosclerotic lesions. *Fed. Proc*. 19 : 15—18.
- Guyton J. R., Bocan T. M., Schifani T. A. 1985. Quantitative ultrastructural analysis of perifibrous lipid and its association with elastin in nonatherosclerotic human aorta. *Arteriosclerosis*. 5 : 644—652.
- Guyton J. R., Klemp K. F. 1988. Ultrastructural discrimination of lipid droplets and vesicles in atherosclerosis: value of osmium-thiocarbohydrazide-osmium and tannic acid-paraphenylenediamine techniques. *J. Histochem. Cytochem*. 36 : 1319—1328.
- 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., Hermansson A. 2011. The immune system in atherosclerosis. *Nat. Immunol*. 12 : 204—212.
- Jores L., Herz A., Gefasse B. 1924. *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*. Berlin : Springer. 629 p.
- Katsuda S., Kaji T. 2003. Atherosclerosis and extracellular matrix. *Atheroscler. Thromb*. 10 : 267—274.
- Klingenberg R., Hansson G. K. 2009. Treating inflammation in atherosclerotic cardiovascular disease: emerging therapies. *Eur. Heart J*. 30 : 2838—2844.
- Kruth H. S. 1984. Localization of unesterified cholesterol in human atherosclerotic lesions. Demonstration of filipin-positive, Oil-Red-O-negative particles. *Amer. J. Pathol*. 114 : 201—208.
- Montecucco F., Mach F. 2009. Update on statin-mediated anti-inflammatory activities in atherosclerosis. *Semin. Immunopathol*. 31 : 127—142.
- Movat H. Z., More R. H., Haust M. D. 1958. The diffuse intimal thickening of the human aorta with aging. *Amer. J. Pathol*. 34 : 1023—1031.
- Mukhin D. N., Orekhov A. N., Andreeva E. R., Schindeler E. M., Smirnov V. N. 1991. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. III. Lipid distribution in intimal sublayers. *Exp. Mol. Pathol*. 54 : 22—30.
- Noma A., Takahashi T., Wada T. 1981. Elastin-lipid interaction in the arterial wall. Part 2. *In vitro* binding of lipoprotein-lipids

to arterial elastin and the inhibitory effect of high density lipoproteins on the process. *Atherosclerosis*. 38 : 373—382.

Orekhov 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.

Orekhov A. N., Andreeva E. R., Krushinsky A. V., Novikov I. D., Tertov V. V., Nestaiko G. V., Khashimov Kh.A., Repin V. S., Smirnov V. N. 1986. Intimal cells and atherosclerosis. Relationship between the number of intimal cells and major manifestations of atherosclerosis in the human aorta. *Amer. J. Pathol.* 125 : 402—415.

Orekhov A. N., Andreeva E. R., Tertov V. 1987. The distribution of cells and chemical components in the intima of human aorta. *Soc. Med. Rev. A: Cardiol.* 1 : 75—100.

Orekhov A. N., Karpova I. I., Tertov V. V., Rudchenko S. A., Andreeva E. R., Krushinsky A. V., Smirnov V. N. 1984. Cellular composition of atherosclerotic and uninvolved human aortic subendothelial intima. Light-microscopic study of dissociated aortic cells. *Amer. J. Pathol.* 115 : 17—24.

Orekhov A. N., Tertov V. V., Novikov I. D., Krushinsky A. V., Andreeva E. R., Lankin V. Z., Smirnov V. N. 1985. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. I. Lipid composition of aortic tissue and enzyme-isolated and cultured cells. *Exp. Mol. Pathol.* 42 : 117—137.

Pearse A. G. 1969. *Histochemistry: theoretical and applied*. London: Churchill Ltd. 720 p.

Poston R. N., Hussain I. F. 1993. The immunohistochemical heterogeneity of atheroma macrophages: comparison with lymphoid tissues suggests that recently blood-derived macrophages can be distinguished from longer-resident cells. *J. Histochem. Cytochem.* 41 : 1503—1512.

Rekhter M. D., Andreeva E. R., Mironov A. A., Orekhov A. N. 1991. Three-dimensional cytoarchitecture of normal and atherosclerotic intima of human aorta. *Amer. J. Pathol.* 138 : 569—580.

Ross R. 1999. Atherosclerosis — an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340 : 115—126.

Schwartz S. M., deBlois D., O'Brien E. R. 1995. The intima: soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ. Res.* 77 : 445—465.

Seyama Y., Wachi H. 2004. Atherosclerosis and matrix dystrophy. *Atheroscler. Thromb.* 11 : 236—245.

Sobenin I. A., Maksumova M. A., Slavina E. S., Balabolkin M. I., Orekhov A. N. 1994. Sulfonyleureas induce cholesterol accumulation in cultured human intimal cells and macrophages. *Atherosclerosis*. 105 : 159—163.

Stary H. C. 1989. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Atherosclerosis*. 9 : 119—132.

Stary H. C., Chandler A. B., Glagov S., Guyton J. R., Insull W., jr., Rosenfeld M. E., Schaffer S. A., Schwartz C. J., Wagner W. D., Wissler R. W. 1994. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on vascular lesions of the Council on arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 89 : 2462—2478.

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., Orekhov A. N., Rudchenko S. A., Mukhin D. N., Smirnov V. N., Molotkovsky Yu.G., Bergelson L. D. 1985. Determination of total intracellular lipid content by flow cytofluorometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16 : 1196—1202.

Tertov V. V., Sobenin I. A., Kaplun V. V., Orekhov A. N. 1998. Antioxidant content in low density lipoprotein and lipoprotein oxidation *in vivo* and *in vitro*. *Free Radic. Res.* 29 : 165—173.

Thorne S. A., Abbot S. E., Stevens C. R., Winyard P. G., Mills P. G., Blake D. R. 1996. Modified low density lipoprotein and cytokines mediate monocyte adhesion to smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 127 : 167—176.

Vanderlaan P. A., Reardon C. A. 2005. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. The unusual suspects: an overview of the minor leukocyte populations in atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 46 : 829—838.

Velican C., Velican D. 1978. Heterogeneity in the composition and aggregation patterns of coronary intima acid mucopolysaccharides (glycosaminoglycans). *Atherosclerosis*. 29 : 141—159.

Velican C., Velican D., Tancu I. 1988. The relationship between intimal necrosis and lipid accumulation during the onset and progression of atherosclerotic lesions. *Med. Interne.* 26 : 97—107.

Velican D., Velican C. 1977. Histochemical study on the glucosaminoglycans (acid mucopolysaccharides) of the human coronary arteries. *Acta Histochem.* 59 : 190—200.

Virmani R., Kolodgie F. D., Burke A. P., Farb A., Schwartz S. M. 2000. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 : 1262—1275.

Weber C., Zernecke A., Libby P. 2008. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat. Rev. Immunol.* 8 : 802—815.

Wick G., Knoflach M., Xu Q. 2004. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Ann. 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 : 199—207.

Willens S. L. 1951. The nature of diffuse intimal thickening of arteries. *Amer. J. Pathol.* 27 : 825—833.

Поступила 14 II 2013

#### ANALYSIS OF THE INFLAMMATORY PROCESSES IN THE DIFFUSE THICKENING OF THE INTIMA OF HUMAN AORTA

Y. V. Bobryshev,<sup>1,2</sup> V. P. Karagodin,<sup>1</sup> M. M. Moisenovich,<sup>1</sup> A. A. Melnichenko,<sup>1</sup> A. N. Orekhov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Atherosclerosis Research and <sup>2</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow;  
<sup>1</sup> e-mail: vpka@mail.ru

It is generally recognized that the accumulation of lipids and immuno-inflammatory cells are early signs of atherosclerosis. In the present study, we have investigated the relationship between the deposition of lipids, of immuno-inflammatory cells and the expression of HLA-DR molecules (a marker of immune activation), the molecules of the class II of major histocompatibility complex (MHC) in diffuse thickening of the intima (DIT). Lipids, including triglycerides, cholesterol esters, free cholesterol and phospholipids were studied by chromatography, Oil Red O histochemistry, as well as by electron microscopic analysis. Immuno-inflammatory cells and the expression of HLA-DR were investigated by immunohistochemistry in consecutive section of the same tissue samples. It has been shown that the lipids were unevenly distributed in DIT. In juxtaluminar sublayer, lipids

were detected both in the cytoplasm of intimal cells and extracellularly. In the juxtamedial musculoelastic sublayer of the intima, lipids were present predominantly along elastic fibers. The positive correlation between the presence of lipids and the expression of HLA-DR was revealed ( $r = 0.79$ ;  $P < 0.001$ ). Also, a positive correlation was found between the deposition of lipids and the number of immune-inflammatory cells, although correlations were different for different sublayers of the intima. In particular, the correlation between the deposition of lipids and immune-inflammatory cells in the juxtaluminal sublayer of the intima was higher ( $r = 0.99$ ;  $P < 0.001$ ) than in the juxtamedial musculoelastic layer ( $r = 0.28$ ;  $P < 0.001$ ). These data support the hypothesis that postulates that the accumulation of lipids in the intima is a key factor in the initiation of inflammatory reactions. At the pre-atherosclerotic stage of the development of this disease, earlier pathological processes associated with lipid-dependent activation of immune cells occur mainly in the juxtaluminal portion of the intima.

Key words: aorta, intima, immune inflammation, lipids, HLA-DR.

---