

Н.С. Трясак

**УЧАСТЬ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН У
РОЗВИТКУ АТЕРОСКЛЕРОЗУ ВІНЦЕВИХ
СУДИН В ЕКСПЕРИМЕНТІ**

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»
кафедра патологічної фізіології
(в.о. зав. – д. мед. н., проф. В.В. Колдунов)
вул. В. Вернадського, 9, Дніпро, 49044, Україна
SE «Dnipropetrovsk medical academy of Health Ministry of Ukraine»
Department of pathophysiology
V. Vernadsky str., 9, Dnipro, 49044, Ukraine
e-mail: Nataliatryasak@gmail.com

Ключові слова: міокард, атеросклероз, дендритні клітини, S-100
Key words: myocardium, atherosclerosis, dendritic cells, S-100

Реферат. Участие дендритных клеток в развитии атеросклероза венечных сосудов в эксперименте. Трясак Н.С. Была исследована динамика количественных и качественных изменений дендритных клеток (ДК) стенки венечных сосудов на различных этапах развития атеросклероза. Животным вводили нативные липопротеины низкой плотности человека. Дендритные клетки идентифицировали с помощью поликлональных антител S-100 и моноклональных антител CD1a (клон O10). Для определения интенсивности экспрессии иммуногистохимических маркеров использовали полуколичественную шкалу от 0 до 3 баллов. Гистологическую окраску стенки венечных сосудов проводили гематоксилин-эозином, орсеином и суданом III. Впервые значительное увеличение количества дендритных клеток наблюдали на 10-й неделе эксперимента, что соответствовало долипидной стадии атеросклероза. Второй пик нарастания ДК отмечался на 13-й неделе, характеризовался умеренной экспрессией маркеров (2 балла) и морфологически отвечал стадии липоидоза. Поздние этапы эксперимента (18 - 20-я неделя) сопровождались максимальным нарастанием количества ДК и высокой степенью экспрессии (3 балла).

Abstract. The role of dendritic cells the in development of atherosclerosis of coronary vessels in the experiment. Tryasak N.S. The dynamics of quantitative and qualitative changes of the dendritic cells (DC) of coronary arteries wall at different stages of atherosclerosis development was investigated. Animals received human native low density lipoproteins. Dendritic cells were detected by using polyclonal antibodies S-100 and monoclonal antibodies CD1a (clone O10). A semiquantitative scale from 0 to 3 points was used to determine the intensity of expression of immunohistochemical markers. Histological examination of coronary arteries wall was performed by hematoxylin-eosin, orsein and sudan III. The first increase of the number of dendritic cells was observed at the 10th week after start of experiment, which corresponded to prelipid stage of atherosclerosis. The second increase of the number of dendritic cells was noted at the 13week and was characterized by moderate expression of markers (2 points) and morphologically responded to the stage of lipoidosis. The late stages of the experiment (18-20 week) were characterized by the maximal increase of DC and a high expression of immunohistochemical markers (3 points).

Атеросклероз посідає одне з перших місць серед причин летальності та інвалідізації населення як в Україні, так і у всьому світі. Незважаючи на велику кількість досліджень, до сьогодні немає єдиної концепції його розвитку. Однак останнім часом науковці сходяться в одному: атеросклероз – це хронічна запальна відповідь артеріальної стінки, ініційована пошкодженням ендотелію за участю клітин імунної системи [6].

Багаторічні дослідження продемонстрували, що в процесі атеросклеротичного ушкодження беруть участь різні за походженням клітини, серед яких: Т- і В-лімфоцити, тканинні макрофаги, дендритні клітини (ДК) та інші [16].

Наразі відомо, що ДК – особливі клітини кістково-мозкового походження, функція яких – розпізнавання та процесинг антигену з наступною активацією імунної відповіді і її інтеграція з вродженим імунітетом [10].

Встановлено, що ДК утворюються з кістково-мозкових прогеніторних клітин CD34+. Під дією різних ростових факторів CD34+ клітини перетворюються в незрілі дендритні клітини, які можна виявити в периферійній крові та багатьох тканинах. У незрілому стані вони знаходяться в тканинах до контакту з антигеном; після розпізнавання останнього дендритні клітини мігрують у лімфоїдні органи, додиференціюються та ініціюють імунну відповідь [18]

шляхом контакту з Т-лімфоцитами комплексом фрагменту антигену з молекулами МСН I-го і II-го типів.

ДК, залежно від шляху дозрівання, мають істотну різницю між собою в будові та функціях. Розрізняють 2 основні субпопуляції ДК: мієлоїдні та плазмоцитоїдні. Мієлоїдні ДК експресують на своїй поверхні CD1a, CD11c, CD13, CD16. Вони є основними продуцентами ІЛ-12, що має вирішальне значення для активації Т-хелперів 1 типу з нативних Т-лімфоцитів. Плазмоцитоїдні ДК можуть бути розпізнаними за більш високим рівнем експресії антигенів CD123, CD303 та CD304. Вони ініціюють імунну реакцію шляхом виділення інтерферонів, ІЛ-4, ІЛ-5, за допомогою яких відбувається утворення Т-хелперів 2 типу [14]. У подальшому Т-хелпери 1 типу братимуть участь у формуванні клітинного імунітету, а Т-хелпери 2 типу - у гуморальному.

Проте на сьогодні залишаються суперечливими і потребують уточнення дані щодо залучення різних типів дендритних клітин та їх морфологічна характеристика залежно від стадії атеросклеротичного пошкодження.

Метою роботи було вивчення кількісних та якісних характеристик дендритних клітин на різних стадіях атеросклерозу вінцевих артерій в експерименті.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для моделювання атеросклерозу в лабораторних щурів застосовували відпрацьовану модель введення нативних ліпопротеїнів низької щільності (нЛПНЩ) людини [3]. Дослідження проведене на 110 нелінійних білих щурах віком 8-10 тижнів із середньою вагою 180-210 г. Тварини були розподілені таким чином: Іа група – група контролю (n=10), тварини, яким вводили фізіологічний розчин, Іб група – група порівняння (n=20), тварини, яким вводили неповний ад'ювант Фрейнда; ІІ група (n=80) – тварини, імунізовані нЛПНЩ людини, розведеними неповним ад'ювантом Фрейнда з метою підсилення імунної відповіді. Щури весь період експерименту утримувались на стандартному харчовому режимі з відносно низьким вмістом жирів [2].

Нативні ЛПНЩ, отримані зі свіжої плазми людини (ProSpec, USA), вводили внутрішньошкірно одноразово в дозі 200 мкг з додаванням 0,1 мл неповного ад'юванта Фрейнда (Becton Dickinson, USA) незалежно від ваги. Ампула з нЛПНЩ розкривалася в день імунізації. Забір матеріалу починали з 2-го тижня після введення препарату шляхом декапітації тварин з використанням тіопенталу натрію в дозі 50 мг/кг маси тіла та взяття зразків вінцевих судин з прилеглим

міокардом. Тварин виводили з експерименту щотижня. Утримання тварин та експерименти проводили відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин [1] та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» [4].

Зразки тканини фіксували в 10% нейтральному забуференому формаліні й заливали в парафін. Мікропрепарати фарбували гематоксиліном і еозином, орсеїном, суданом III. Імуногістохімічне дослідження проводилось відповідно до протоколів компанії DAKO (USA), виробника первинних антитіл, які використовувались у нашому дослідженні [15]. В якості первинних антитіл застосовувались поліклональні антитіла S-100 та моноклональні CD1a (клон O10). Оцінювалось специфічне ядерне, цитоплазматичне або мембранне (залежно від маркера) забарвлення клітин [15].

Дослідження проводили за допомогою мікроскопа Zeiss за стандартною схемою. Для оцінки інтенсивності імуногістохімічної мітки використовували напівкількісну шкалу від «-» до «+++». Враховувався відсоток маркер-позитивних клітин у полі зору. 0 балів – відсутність експресії; + (1 бал) – 1-33% клітин; ++ (2 бали) – 34-66% клітин; +++ (3 бали) – 67-100% клітин.

Результати дослідження статистично обробляли з використанням пакету статистичних програм «Statistica 6.0». Результати наведено як (M±m), де M – середнє значення показника, m – стандартна похибка. Достовірними вважали результати при $p \leq 0,05$ [5].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

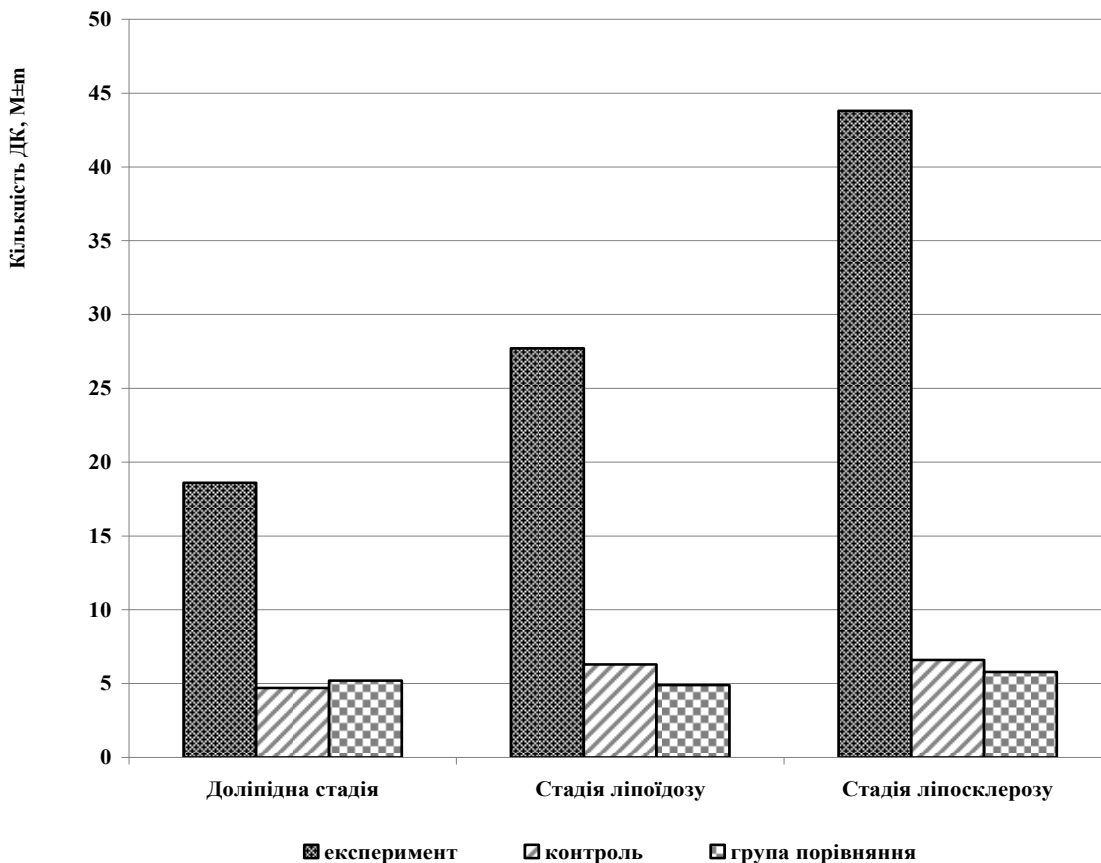
На 2-му тижні експерименту були досліджені імуногістохімічно забарвлені зрізи міокарда та стінок вінцевих артерій тварин І групи. Виявлена наявність незначної кількості дифузно розміщених S-100+ клітин у підендотеліальному шарі судин. Спираючись на дані досліджень, які встановили, що, окрім нейрональних клітин, протеїн S-100 інтенсивно експресується в клітинах сімейства спеціалізованих антигенпрезентуючих клітин, а також з урахуванням того, що інтима судин позбавлена іннервації, такі маркер-позитивні клітини можна віднести до дендритних клітин [9]. Міокард та стінка артерій ІІ групи тварин значно не відрізнялись за вмістом S-100+ клітин ($5,2 \pm 0,24$, $p \leq 0,05$) від тварин групи контролю та групи порівняння ($4,9 \pm 0,21$ і $5,05 \pm 0,23$ відповідно, $p \leq 0,05$).

На 6-му тижні після введення нЛПНЩ у групі імунізованих тварин спостерігались скупчення дендритних клітин, які щільно прилягали до ендотеліоцитів судин. Рівень їх контактів з

макрофагами та лімфоцитами був низький, що відповідало гістоморфології тварин I групи. Зразки міокарда Ia та Ib груп тварин були ідентичними та відповідали по структурі тканині, не ушкодженій атеросклеротичним процесом.

При дослідженні зразків тканини серця на 10-му тижні після імунізації, у тварин II групи відмічалось потовщення підендотеліального шару вінцевих судин, більшою мірою за рахунок зростаючої інфільтрації лімфоцитами, моноцитами і тканинними базофілами, що відповідало доліпідній морфологічній стадії атеросклерозу. Для цієї стадії характерна першочергова адгезія моноцитів до ендотеліальних клітин внаслідок високої концентрації молекул адгезії на їх поверхні з подальшою міграцією в підендотеліальний простір артерій [17]. Ймовірно, такі

зміни стають можливими завдяки підвищенню проникності судинної стінки за рахунок продукції клітинами, залученими в патологічний процес, матриксних металопротеїназ [13]. Також візуалізуються клітини, що мають радіально розташовані відростки, за допомогою яких вони утворюють міжклітинні зв'язки. Рівень клітин, які на паралельних зрізах одночасно інтенсивно експресують як S-100 ($18,6 \pm 0,82$, $p \leq 0,05$), так і CD1a ($17,3 \pm 0,61$, $p \leq 0,05$), значно зростає, що свідчить про збільшення активності дендритних клітин мієлоїдного походження. У Ia та Ib груп тварин змін, характерних для атеросклерозу, виявлено не було. Були зафіксовані лише поодинокі дендритні клітини в підендотеліальному шарі вінцевих судин ($4,7 \pm 0,16$ та $5,2 \pm 0,21$ відповідно, $p \leq 0,05$) (рис.).



Динаміка кількісних змін S-100+ ДК залежно від стадії атеросклерозу

12 - 13-й тижні експерименту характеризувалися появою інтра- та екстрацелюлярних ліпідних крапель у складі внутрішньої оболонки вінцевих артерій, що відповідало стадії ліпоїдозу. Відмічалось прогресуюче збільшення S-100+CD1a+ клітин ($27,7 \pm 1,2$, $p \leq 0,05$) у міокарді та інтенсивність накопичення маркера, що

свідчить про посилену міграцію мієлоїдних дендритних клітин з периферійної крові в місце розвитку атеросклеротичного процесу. Це збігається з результатами інших дослідників, які експериментально довели збільшення міграційної активності мієлоїдних ДК на тлі активної проліферації макрофагів [8, 10]. Слід зазначити,

що структури серця, які вивчалися, у Ia та Ib групах тварин не мали ознак зростання кількості S-100+CD1a+ клітин у цей термін ($6,3 \pm 0,29$ та $4,9 \pm 0,23$ відповідно, $p \leq 0,05$).

Починаючи з 16-го тижня експерименту, спостерігали стрімке збільшення кількості дендритних клітин, порівняно з попередніми точками дослідження, як в інтимі та медії артерій імунізованих тварин, так і в прилеглих ділянках міокарда. У цей період S-100+CD1a+ клітини ($38,3 \pm 1,6$, $p \leq 0,05$) більшою мірою оточували клітини, заповнені ліпідними краплями (так звані піністи). Отримані дані узгоджуються з результатами дослідження групи науковців, які встановили, що саме мієлоїдна субпопуляція ДК може захоплювати окиснені ЛПНЩ і презентувати їх Т-лімфоцитам у якості антигенів, чим стимулюють розмноження Т-хелперів 1 типу та ініціацію клітинної імунної відповіді, що забезпечує прогресування атеросклеротичного процесу [12].

Найбільш виразні зміни структури стінки вінець артерій спостерігали на 18 - 20 тижнях експерименту. На цьому етапі відмічалось завершення міграції гладких міоцитів, максимальне зростання кількості піністих клітин, а також руйнування еластичних мембран і розростання молодих сполучнотканинних елементів, що може бути розцінене як прояви морфологічної стадії атеросклерозу – ліпосклерозу.

На цій стадії експерименту серед S-100+CD1a+ клітин ($43,8 \pm 2,1$, $p \leq 0,05$) виявлялись клітини, які експресували S-100 (+++), але не ідентифікувались за допомогою коstimуляторних молекул CD1a ($11,1 \pm 0,34$, $p \leq 0,05$). Припускаємо, що цими клітинами є плазмоцитоїдні дендритні клітини, які не покинули місце своєї первинної локалізації – міокард – і не мігрували в периферичні лімфоїдні органи, а залишилися поряд з Т-лімфоцитами, утворивши з ними щільні зв'язки для створення місцевого лімфоїдного вогнища з метою безпосередньої антигенпрезентації в атеросклеротичній бляшці [7, 11]. У Ia та Ib групах тварин у цей період не

виявлено зростання кількості S-100+CD1a+ клітин ($6,6 \pm 0,28$ та $5,8 \pm 0,25$ відповідно, $p \leq 0,05$).

Таким чином, аналізуючи динаміку кількісних змін S-100+ клітин та інтенсивність накопичення маркера зі ступенем прогресування атеросклерозу, встановили, що доліпідна стадія характеризувалась мінорною кількістю ДК з низькою інтенсивністю (+) експресії S-100 ($p \leq 0,05$) та CD1a ($p \leq 0,05$). Стадія ліпоїдозу асоціювалась із помірним (++) прогресуванням зазначених показників ($p \leq 0,05$). Найбільш інтенсивне зростання кількості ДК, які мали високий ступінь експресії S-100 та CD1a (+++), спостерігали на стадії ліпосклерозу.

ВИСНОВКИ

1. Дендритні клітини накопичуються в основному в інтимі уражених атеросклерозом вінець артерій, у той час, як в інтактних артеріях дендритних клітин достовірно менша кількість. У той же час має місце збільшення ДК і в прилеглих ділянках міокарда.

2. Кількість дендритних клітин у стінці вінець судин та міокарді зростає пропорційно прогресуванню атеросклеротичного ушкодження.

3. Дендритні клітини в міокарді імунізованих тварин активно експресують CD1a, що дає підстави віднести їх до мієлоїдної субпопуляції. По мірі прогресування атеросклеротичних ушкоджень рівень експресії CD1a в ДК статистично значущо збільшувався.

4. У складі міокарда виявлено S-100+CD1a-ДК, які належать до плазмоцитоїдного кластеру. Їх кількість є незначною.

5. Стадія ліпосклерозу, яка спостерігалася, починаючи з 18-го тижня експерименту, характеризувалася максимальним зростанням кількості дендритних клітин та інтенсивності накопичення S-100 в усіх типах ДК.

Перспективи подальших досліджень.

Планується вивчити характер контактів між різними типами ДК і клітинами стінки вінець судин та клітинами прилеглого міокарда.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей: Рада Європи 18.03.1986. – Стразбург, 1986. – 52 с.

2. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б. В. Западнюк. – 8-е изд., перераб. и доп. — Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1983. – 383 с.

3. Меньшиков И.В. Экспериментальная модель атеросклероза у крыс, вызванного иммунизацией нативными липопroteинами человека / И.В. Меньшиков, К.В. Фомина, Л.В. Бедулаева // Вестник Удмурт. ун-та – 2012. – № 1. – С. 80-86.

4. Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України від 21.02.2006 № 3447-IV // Відомості Верховної Ради України (ВВР). – 2006 – № 27. – С. 230.

5. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных

программ Statistica / О.Ю. Реброва. – Москва: Медиа-сфера, 2006. – 312 с.

6. Роль дендритных клеток в патогенезе атеросклероза / А.М. Карпов, А.В. Рвачева, Р.А. Жетишева [и др.] // Доктор.ру. – 2015. – № 8-9 (109-110). – С. 4-8.

7. Barchet W. Plasmacytoid dendritic cells - virus experts of innate immunity / W. Barchet, M. Cella, M. Colonna // *Seminars in Immunology*.- 2005.- Vol.17, N4.- P.253-261.

8. Bobryshev Y.V. Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance / Y.V. Bobryshev // *Eur. Heart J.* – 2005. – Vol. 26, N 17. – P. 1700-1704.

9. Bobryshev Y.V. S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions / Y.V. Bobryshev, R.S. Lord // *Cardiovasc Res.* – 1995. – Vol. 29, N 5. – P. 689-696.

10. Cybulsky M.I. Macrophages and Dendritic Cells: Partners in Atherogenesis / M.I. Cybulsky, C. Cheong, C.S. Robbins // *Circ Res.*-2016.- Vol. 118, N. 4.- P. 637-652.

11. Döring Y. Plasmacytoid dendritic cells in atherosclerosis / Y. Döring, A. Zerneck // *Front Physiol.* – 2012. – Vol. 28, N 3. – P. 230-237.

12. Effects of oxidised low density lipoprotein on dendritic cells: a possible immunoregulatory component of the atherogenic micro-environment / C.J. Alderman,

P.R. Bunyard, B. M. Chain [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2002. – Vol. 55, N 4. – P. 806-819.

13. Galkina E. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis / E. Galkina, K. Ley // *Ann. Rev. Immunol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 165-197.

14. Kassiteridi C. Macrophages and dendritic cells: the usual suspects in atherogenesis / C. Kassiteridi, C. Monaco // *Curr. Drug. Targets.* – 2015. – Vol. 16, N 4. – P. 373-382.

15. Kumar G.L. Иммуногистохимические методы: Руководство ДАКО / Ed. by G.L. Kumar, L. Rudbeck [пер. с англ.]; под ред. Г.А. Франка, П.Г. Малькова. – Москва, 2011. – 224 с.

16. Myeloid dendritic cells: Development, functions, and role in atherosclerotic inflammation / D.A. Chistiakov, I.A. Sobenin, A.N. Orekhov [et al.] // *Immunobiology* – 2015. – Vol. 220, N 6. – P. 833-844.

17. Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction / J. Idoyaga, C. Fiorese, L. Zbytniuk [et al.] // *J. Clin. Investigation* – 2013. – Vol. 123, N 2. – P. 844-854.

18. Yamane H. Early signaling events that underlie fate decisions of naïve CD4+ T cells towards distinct T-helper cell subsets / H. Yamane, W. E. Paul // *Immunol. Rev.* – 2013. – Vol. 252, N 1. – P. 12-23.

REFERENCES

1. [European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986]. Strasbourg. 1986;52. Ukrainian.

2. Zapadnyuk IP. [Laboratory animals. Breeding, maintenance, use in the experiment]. Kyiv, Visha shkola. 1983;383. Russian.

3. Menshykov IV. [Experimental model of atherosclerosis in rats caused by immunization with native human lipoproteins]. *Vestnik Udmurtskogo universiteta*. 2012;1:80-86. Russian.

4. [Law of Ukraine. “On Protection of Animals from Cruel Treatment”, 21.02.2006 N 3447-IV]. *Vidomosti Verhovnoï Radi Ukraïni (VVR)*. 2006;27:230. Ukrainian.

5. Rebrova OYu. [Statistical analysis of medical data. Application of the Statistica software package]. Moskva, Mediasfera. 2006;312. Russian.

6. Karpov AM. [The role of dendritic cells in the pathogenesis of atherosclerosis]. *Doktor.ru*. 2015;8-9(109-110):4-8. Russian.

7. Barchet W, Cella M, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells - virus experts of innate immunity. *Semin Immunol*. 2005;17(4):253-61.

8. Bobryshev Y.V. Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance. *Eur. Heart J*. 2005;26(17):1700-04.

9. Bobryshev YV, Lord RS. S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions. *Cardiovasc Res*. 1995;29(5):689-96.

10. Cybulsky MI, Cheong C, Robbins CS. Macrophages and Dendritic Cells: Partners in Atherogenesis. *Circ Res*. 2016;118(4):637-52.

11. Döring Y, Zerneck A. Plasmacytoid dendritic cells in atherosclerosis. *Front Physiol*. 2012;28(3):230-37.

12. Alderman CJ, Bunyard PR, Chain BM, Foreman JC, et al. Effects of oxidised low density lipoprotein on dendritic cells: a possible immunoregulatory component of the atherogenic micro-environment. *Cardiovasc Res*. 2002;55(4):806-19.

13. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:165-97.

14. Kassiteridi C, Monaco C. Macrophages and dendritic cells: the usual suspects in atherogenesis. *Curr Drug Targets*. 2015;16(4):373-82.

15. Kumar GL, Rudbeck L. [Immunohistochemical methods:]. *DAKO Manual*, editor GA Franko, PG Malkova, Moskva. 2011;224. Russian.

16. Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN, et al. Myeloid dendritic cells: Development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Immunobiology*. 2015;220(6):833-44.

17. Idoyaga J, Fiorese C, Zbytniuk L, et al. Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *J Clin Invest*. 2013;123(2):844-54.

18. Yamane H, Paul WE. Early signaling events that underlie fate decisions of naïve CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunol Rev*. 2013;252(1):12-23.

Стаття надійшла до редакції
14.11.2017