

# Экспрессия LYVE-1 в эндотелии вновь образованных сосудов атеросклеротической бляшки каротидного синуса

А.Н. Евдокименко, К.Н. Куличенкова, Т.С. Гулевская

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

**Введение.** С открытием специфических маркеров лимфатического эндотелия, одним из которых является LYVE-1, значительно улучшилось представление о структуре и функции лимфатической системы. Установлено, что при атеросклерозе она регулирует иммунные ответы, обратный транспорт холестерина и воспаление. LYVE-1 играет немаловажную роль в реализации функции лимфатической системы, а также является одним из первых маркеров начала лимфангиогенеза. Морфологические исследования лимфатических сосудов в атеросклеротических бляшках (АСБ) человека немногочисленны, а полученные данные противоречивы.

**Цель** — охарактеризовать экспрессию рецептора LYVE-1 в эндотелии вновь образованных сосудов АСБ каротидного синуса (КС) и оценить ее взаимосвязь со структурой бляшки.

**Материалы и методы.** Проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование 34 АСБ КС, полученных при каротидной эндартерэктомии. Оценивали плотность расположения LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в 1 см<sup>2</sup> АСБ, сочетанную экспрессию LYVE-1 и CD34, объемную долю атероматоза и кальцификатов, а также степень выраженности пилевидного обызвествления, кровоизлияний, общей макрофагальной реакции (CD68<sup>+</sup>) и инфильтрации АСБ M2-фракцией макрофагов (CD206<sup>+</sup>).

**Результаты.** LYVE-1<sup>+</sup>-сосуды выявлены в 32 АСБ КС, их количество составило 5,7–1698 (37,4 [15,3; 76]) в 1 см<sup>2</sup> бляшки. Экспрессия маркера была неоднородна: наблюдалась во всех или только в отдельных эндотелиоцитах вновь образованного сосуда, интенсивность экспрессии варьировала от слабой до выраженной. Отмечены сосуды фенотипа как CD34<sup>+</sup>LYVE-1<sup>+</sup>, так и CD34<sup>+</sup>LYVE-1<sup>-</sup>. Взаимосвязи экспрессии LYVE-1 в эндотелии со структурой или типом бляшки не выявлено, за исключением макрофагальной реакции. Плотность расположения LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в АСБ коррелировала слабо с общей макрофагальной реакцией ( $r = 0,37$ ;  $p = 0,03$ ), более значимо — с количеством противовоспалительных M2-макрофагов ( $r = 0,47$ ;  $p = 0,005$ ), в особенности это касалось сосудов с умеренной и выраженной интенсивностью экспрессии маркера ( $r = 0,56$ ;  $p = 0,0006$ ).

**Заключение.** Впервые продемонстрирована сочетанная экспрессия LYVE-1 и CD34 в эндотелии сосудов АСБ, а также показана возможная связь экспрессии LYVE-1 в эндотелии вновь образованных сосудов с репаративными процессами в АСБ.

**Ключевые слова:** атеросклеротическая бляшка каротидного синуса; лимфангиогенез; неоваскуляризация; M2-макрофаги; LYVE-1; CD206.

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Адрес для корреспонденции:** 125367, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80. ФГБНУ НЦН. E-mail: evdokimenko@neurology.ru. Евдокименко А.Н.

**Для цитирования:** Евдокименко А.Н., Куличенкова К.Н., Гулевская Т.С. Экспрессия LYVE-1 в эндотелии вновь образованных сосудов атеросклеротической бляшки каротидного синуса. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2020; 14(3): 43–52.

DOI: 10.25692/ACEN.2020.3.6

Поступила 02.03.2020 / Принята в печать 27.04.2020

## LYVE-1 expression in the endothelium of newly formed vessels of carotid atherosclerotic plaque

Anna N. Evdokimenko, Ksenia N. Kulichenkova, Tatiana S. Gulevsaya

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

**Introduction.** The discovery of specific markers of lymphatic endothelium, including LYVE-1, has led to a much better understanding of the structure and function of the lymphatic system. It has been shown that lymphatic system regulates immune responses, reverse cholesterol transport, and inflammation in atherosclerosis. LYVE-1 plays an important role in activating the function of the lymphatic system and is also one of the first markers of lymphangiogenesis. There are few morphological studies of lymphatic vessels in atherosclerotic plaques, and the obtained data are contradictory.

The **aim** of the study was to characterize the LYVE-1 receptor expression in the endothelium of newly formed vessels in carotid atherosclerotic plaques and to evaluate its relationship with the plaque structure.

**Materials and methods.** 34 carotid atherosclerotic plaques obtained during carotid endarterectomies were investigated using histological and immunohistochemical techniques. The density of LYVE-1<sup>+</sup> vessels per 1 cm<sup>2</sup> of plaque, combined expression of LYVE-1 and CD34, proportion of atheromatosis and calcifications, as well as severity of dust-like calcification, haemorrhage, overall macrophage response (CD68<sup>+</sup>), and plaque infiltration by M2 macrophage (CD206<sup>+</sup>) were evaluated.

**Results.** LYVE-1<sup>+</sup> vessels were detected in 32 carotid atherosclerotic plaques, with a range of 5.7–1698 per 1 cm<sup>2</sup> of the plaque (37.4 [15.3; 76]). Marker expression was heterogeneous: it was observed in all or only some endothelial cells of the newly formed vessel, and the expression intensity varied from weak to strong. Both CD34<sup>+</sup>LYVE-1<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>LYVE-1<sup>-</sup> vessel phenotypes were identified. A relationship between endothelial LYVE-1 expression and the structure or type of plaque was not established, except for the macrophage response. The density of LYVE-1<sup>+</sup> vessels in atherosclerotic plaques correlated weakly with the overall macrophage response ( $r = 0.37$ ;  $p = 0.03$ ), more significantly with the number of anti-inflammatory M2 macrophages ( $r = 0.47$ ;  $p = 0.005$ ), especially for vessels with moderate and strong marker expression ( $r = 0.56$ ;  $p = 0.0006$ ).

**Conclusion.** The combined expression of LYVE-1 and CD34 in the endothelium of plaque neovessels was demonstrated for the first time, and a possible association between endothelial LYVE-1 expression in newly formed vessels and the reparative processes in atherosclerotic plaques was shown.

**Keywords:** carotid atherosclerotic plaque; lymphangiogenesis; neovascularization; M2 macrophages; LYVE-1; CD206.

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For correspondence:** 125367, Russia, Moscow, Volokolamskoye shosse, 80. Research Center of Neurology.

E-mail: evdokimenko@neurology.ru. Evdokimenko A.N.

**For citation:** Evdokimenko A.N., Kulichenkova K.N., Gulevskaya T.S. [LYVE-1 expression in the endothelium of newly formed vessels of carotid atherosclerotic plaque]. *Annals of clinical and experimental neurology* 2020; 14(3): 43–52. (In Russ.)

DOI: 10.25692/ACEN.2020.3.6

Received 02.03.2020 / Accepted 27.04.2020

## Введение

Атеросклероз является хроническим воспалительным заболеванием, история изучения которого насчитывает более 250 лет. До недавнего времени значение лимфатической системы в развитии и прогрессировании атеросклероза оставалось вне фокуса внимания исследователей, хотя еще в прошлом веке лимфатические сосуды (ЛС) были обнаружены в адвентиции артерий, на основании чего исследователи предположили, что они могут играть роль при атеросклерозе [1, 2].

Взаимосвязь между ЛС и атеросклерозом долгое время оставалась неясной из-за технических сложностей дифференцировки ЛС и кровеносных сосудов. С открытием специфических маркеров лимфатического эндотелия потенциальная функция ЛС стала прогрессивно изучаться. Было установлено, что помимо поддержания водного баланса и тканевого гомеостаза лимфатическая система принимает активное участие в большинстве процессов, которые могут привести к замедлению прогрессирования атеросклероза, стабилизации или даже регрессу атеросклеротических изменений, а именно: в стимуляции удаления холестерина из бляшки в составе липопротеинов высокой плотности (обратный транспорт холестерина) [3], эмиграции пенных клеток из интимы, а также удалении апоптотических клеток и некротических масс из АСБ [2, 4]. В этой связи изучение любых аспектов лимфангиогенеза, организации и функционирования лимфатической системы при атеросклерозе представляет особый интерес в плане поиска возможных мишеней терапевтического воздействия.

Тем не менее морфологические исследования ЛС в АСБ человека немногочисленны, а данные в отношении их присутствия в стенке артерий и значения в прогрессировании атеросклеротических изменений весьма противоречивы. ЛС выявлялись преимущественно в адвентиции артерий, при этом авторы отмечали увеличение их количества по

мере прогрессирования атеросклероза [5, 6]. В ряде исследований ЛС также были зафиксированы в АСБ [3, 7], в одном из которых авторы отмечали их присутствие только в кальцинированных и фиброзных бляшках со слабо выраженной макрофагальной реакцией [7]. В то же время имеются свидетельства отсутствия или единичных ЛС в стенке артерий при атеросклерозе [8].

Одним из специфических маркеров лимфатического эндотелия является LYVE-1 (рецептор гиалуронана лимфатического эндотелия) — интегральный мембранный гликопротеин, впервые описанный в 1999 г. [9], который в норме у взрослых людей отсутствует в кровеносных сосудах, за исключением эндотелия синусоидных капилляров печени и селезенки [10], а также высокого эндотелия посткапиллярных венул лимфатических узлов [11]. Его экспрессия также обнаружена в субпопуляции противовоспалительных M2 макрофагов [10, 12]. LYVE-1 на 41% гомологичен по структуре CD44 — широко распространенному рецептору гиалуронана [9], который экспрессируется в многочисленных типах клеток, включая эндотелий кровеносных сосудов, но отсутствует в эндотелии ЛС и играет ключевую роль в прогрессировании атеросклероза [13]. Функции LYVE-1 до конца не установлены, однако после многих лет исследований стало очевидно, что он не просто связывает гиалуронан и является пассивным маркером лимфатического эндотелия, но также принимает активное участие в иммунных и воспалительных процессах, оказывая во многом противоположное CD44 действие. Было установлено, что он обеспечивает адгезию дендритных клеток и макрофагов к лимфатическому эндотелию и их эмиграцию из тканей, а также связан с регуляцией проницаемости и пролиферации эндотелия [10]. Кроме того, экспрессия LYVE-1 является одним из первых признаков начала лимфангиогенеза [14], хотя до сих пор продолжают споры в отношении источника лимфатического эндотелия и механизмов формирования лимфатической сети, в особенности в постнатальном периоде. Большинство исследований структуры,

функции и экспрессии LYVE-1 проведены на животных и клеточных моделях заболеваний, преимущественно злокачественных опухолей, в то время как данные по экспрессии LYVE-1 в АСБ у людей единичны и в основном касаются коронарных артерий.

**Целью** исследования явилась характеристика экспрессии рецептора LYVE-1 в эндотелии вновь образованных сосудов АСБ каротидного синуса (КС) и оценка ее взаимосвязи с выраженностью структурных компонентов бляшки.

## Материалы и методы

В исследование включены 34 пациента (23 мужчины и 11 женщин; средний возраст  $65 \pm 8,6$  года) с атеросклерозом КС  $\geq 60\%$  ( $84 \pm 9\%$ ) по данным дооперационного дуплексного сканирования ветвей дуги аорты, которым выполнена операция каротидной эндартерэктомии с последующим патоморфологическим исследованием удаленных АСБ на всем их протяжении. АСБ в зависимости от длины разрезали на 4–9 поперечных блоков толщиной 0,3 см, которые заливали в парафин. С каждого парафинового блока делали серийные срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, по методу ван Гизона, а также иммуногистохимически с использованием антител к CD34 (выявление кровеносных сосудов), CD68 (оценка общей макрофагальной реакции), CD206 (выделение противовоспалительной M2-фракции макрофагов) и LYVE-1.

Для визуализации иммунопероксидазной реакции использовали систему детекции «Ultravision Quanto Detection System HRP DAB» («Thermo Fisher Scientific») в соответствии с инструкцией следующим образом. Срезы депарафинировали, дегидратировали в ряду спиртов нисходящей концентрации, промывали в дистиллированной воде, обрабатывали раствором UltraVision Peroxide Block («Thermo Fisher Scientific») для инактивации тканевых пероксидаз, после чего демаскировали антиген в цитратном буфере с pH 6 («Abcam») на водяной бане при  $80^\circ\text{C}$  в течение 20 мин. После остывания раствора (около 30 мин) препараты выдерживали в трис-буферном солевом растворе (TBS) с добавлением 0,1% раствора Triton x100 («Sigma-Aldrich») в течение 20 мин, блокировали неспецифическое связывание раствором UltraVision Protein Block («Thermo Fisher Scientific») и инкубировали срезы с раствором антител во влажной камере. Использовали кроличьи поликлональные антитела к LYVE-1 («Abcam», разведение 1:200, инкубация при  $4^\circ\text{C}$  в течение ночи) и CD206 («Abcam», разведение 1:400, инкубация при  $25^\circ\text{C}$  в течение 90 мин), а также мышинные моноклональные антитела к CD34 («Thermo Fisher Scientific», клон QBEnd/10, разведение 1:200, инкубация при  $4^\circ\text{C}$  в течение ночи) и CD68 («Cell Marque», клон Kp-1, разведение 1:200, инкубация при  $25^\circ\text{C}$  в течение 30 мин). После инкубации с антителами препараты промывали раствором TBST (трис-буфер с NaCl и Твин 20), помещали в раствор усилителя первичных антител Primary Antibody Amplifier Quanto («Thermo Fisher Scientific») на 10 мин, повторно промывали TBST, выдерживали 10 мин в конъюгированной с полимером пероксидазе хрена HRP polymer Quanto («Thermo Fisher Scientific»), промывали в дистиллированной воде, окрашивали в течение 5 мин 3–3-диаминобензидином (DAB) в составе приготовленной согласно инструкции смеси DAB Quanto Substrate и DAB Quanto Chromogen («Thermo Fisher Scientific»), после чего докрасивали гематоксилином.

Окрашенные срезы переводили в цифровую форму с помощью сканеров гистологических препаратов MEKOC Ц-2 («МЕКОС») и Panoramic MIDI II («3DHISTECH Ltd.») при 400-кратном увеличении изображения и анализировали в программах «Aperio ImageScope 12.3.3.5048» («Leica Biosystems») и «CaseViewer» («3DHISTECH Ltd.»). Оценивали плотность расположения LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в 1 см<sup>2</sup> АСБ, объемную долю атероматоза (%), объемную долю кальцификатов (%), степень выраженности в АСБ пылевидного обызвествления (включая мелкие кальцификаты), свежих и организованных кровоизлияний, а также макрофагальной реакции.

Степень выраженности пылевидного обызвествления и кровоизлияний оценивали полуколичественно по 5-балльной шкале:

- 0 — компонент отсутствует;
- 1 — компонент присутствует в следовых количествах;
- 2 — компонент занимает до 25% площади среза;
- 3 — 25–50% площади среза;
- 4 — более 50% площади среза.

Макрофагальную реакцию также оценивали полуколичественно по 5-балльной шкале:

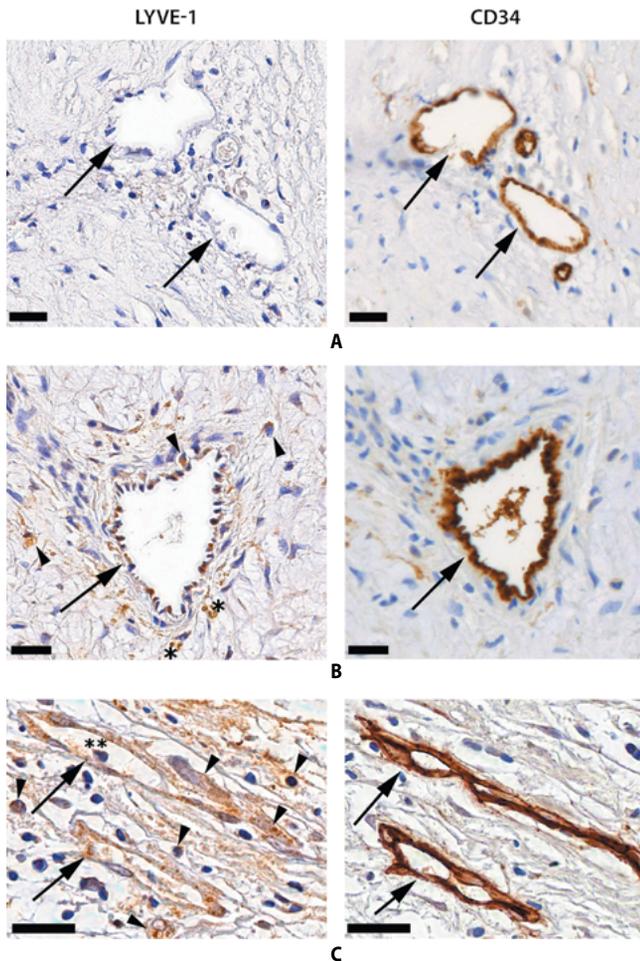
- 0 — макрофаги отсутствуют или выявляются отдельные клетки;
- 1 — отдельные небольшие скопления клеток;
- 2 — многочисленные небольшие скопления или отдельные среднего размера скопления, занимающие в совокупности до 15% площади среза;
- 3 — многочисленные среднего размера скопления или отдельные крупные скопления, занимающие в совокупности до 30% площади среза;
- 4 — многочисленные крупные скопления, занимающие более 30% площади среза.

Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр неврологии».

Статистическую обработку проводили в программе «Statistica 13.3» («StatSoft Inc.»). Для выявления различий применяли непараметрический критерий Манна–Уитни, для выявления зависимости — коэффициент корреляции Спирмена. Результаты статистического анализа считали значимыми при  $p < 0,05$ . Результаты представлены в виде: медиана [1-й квартиль; 3-й квартиль].

## Результаты

В результате гистологического исследования 34 АСБ КС выявлено значительное разнообразие степени выраженности в них структурных компонентов. Атероматоз наблюдался в 32 АСБ и составлял 1–49% объема бляшки (27 [10,5; 38]%). Крупные кальцификаты обнаружены в 30 АСБ и занимали 0,2–21% объема бляшки (5,6 [2,5; 13,6]%). В 31 АСБ отмечены мелкие кальцификаты и очаги пылевидного обызвествления, преимущественно небольшого размера. Степень выраженности макрофагальной реакции также варьировала в широких пределах от единичных макрофагов в толще АСБ до массивных скоплений, занимающих более трети площади среза (преобладали небольшие и среднего размера скопления макрофагов в پوشке и по периферии очагов атероматоза). В 12 АСБ выявлено массивное свежее или организующееся кровоизлияние в область атероматоза, причиной 7 из которых стало изъязвление پوشки бляшки. Признаки организован-



**Рис. 1.** Экспрессия CD34 и LYVE-1 в эндотелии вновь образованных сосудов АСБ КС.

А — CD34<sup>+</sup>LYVE-1<sup>-</sup> сосуды (указаны стрелками); В — CD34<sup>+</sup>LYVE-1<sup>+</sup> сосуд, вокруг которого расположены глыбки гемосидерина (отмечены звездочками) и отдельные макрофаги, также экспрессирующие LYVE-1 (отмечены треугольниками); С — CD34<sup>+</sup>LYVE-1<sup>+</sup> сосуды (указаны стрелками), расположенные в области скопления макрофагов, также экспрессирующих LYVE-1 (отмечены треугольниками). В просвете одного из сосудов находится макрофаг (отмечен двумя звездочками). Черная линия соответствует 50 мкм

**Fig. 1.** CD34 and LYVE-1 expression in the endothelium of carotid atherosclerotic plaques-neovessels.

А — CD34<sup>+</sup>LYVE-1<sup>-</sup> vessels (indicated by arrows); В — CD34<sup>+</sup>LYVE-1<sup>+</sup> vessel, surrounded by clumps of haemosiderin (marked by asterisks) and individual macrophages, also expressing LYVE-1 (marked by arrowheads); С — CD34<sup>+</sup>LYVE-1<sup>+</sup> vessels (indicated by arrows), located in an area of macrophage accumulation that also express LYVE-1 (marked by arrowheads). A macrophage (marked by twin asterisks) in one of the vessel lumens. The black line corresponds to 50 µm

ных кровоизлияний (скопления сидерофагов и гемосидерина) отмечены в 21 АСБ. В соответствии с международной классификацией [15], 12 АСБ отнесены к типу VI (осложненные поражения), 14 — к типу V (атероматозные АСБ), 7 — к типу VII (преимущественно кальцинозные АСБ) и 2 — к типу VIII (преимущественно фиброзные АСБ).

Вновь образованные сосуды, экспрессирующие LYVE-1, обнаружены в подавляющем большинстве исследованных АСБ (32 из 34), при этом они демонстрировали фенотип CD34<sup>+</sup>LYVE-1<sup>+</sup> (рис. 1). В АСБ также обнаруживались CD34<sup>+</sup>LYVE-1<sup>-</sup> сосуды.

Количество LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов варьировало в широких пределах, составляя от 5,7 до 1698 (37,4 [15,3; 76]) в 1 см<sup>2</sup> бляшки. Характер и интенсивность экспрессии LYVE-1 эндотелиоцитами также была неоднородна: экспрессия была тотальной (все эндотелиоциты вновь образованного сосуда) или частичной (отдельные эндотелиоциты вновь образованного сосуда), интенсивность окраски варьировала от слабой (в том числе следовые количества маркера) до умеренной и интенсивной. Экспрессия LYVE-1 также наблюдалась в отдельных макрофагах.

Значимых различий в плотности расположения LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в АСБ разного типа не обнаружено вне зависимости от характера и интенсивности экспрессии (табл. 1, 2). Также не отмечено значимой взаимосвязи между плотностью расположения LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в АСБ и степенью выраженности в них таких структурных компонентов, как атероматоз, обызвествление и кровоизлияния.

Корреляционный анализ плотности расположения LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов и степени выраженности общей макрофагальной реакции в АСБ продемонстрировал, что по мере повышения количества и размера скоплений макрофагов увеличивалось общее количество LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в 1 см<sup>2</sup> АСБ ( $r = 0,37$ ;  $p = 0,03$ ), причем главным образом сосудов с тотальной слабой экспрессией маркера ( $r = 0,4$ ;  $p = 0,02$ ) (табл. 3). Тотальная экспрессия LYVE-1 в эндотелиоцитах вновь образованных сосудов преобладала в 17 АСБ, тогда как в 15 АСБ чаще встречались сосуды, в которых маркер обнаруживался в отдельных эндотелиоцитах (частичная экспрессия). При этом данные группы АСБ не различались по степени выраженности общей макрофагальной реакции ( $p = 0,4$ ). В то же время в АСБ, в которых преобладали вновь образованные сосуды с тотальной экспрессией LYVE-1 в эндотелиоцитах, было значимо больше противовоспалительной M2-фракции макрофагов (CD206<sup>+</sup>) по сравнению с АСБ, в которых преобладала частичная экспрессия маркера ( $p = 0,03$ ).

LYVE-1<sup>+</sup>-сосуды, как правило, располагались группами различного размера в области скоплений M2-фракции макрофагов, экспрессирующих CD206 и LYVE-1, в особенности сосуды с умеренной и выраженностью интенсивностью экспрессии маркера (рис. 2).

Для проверки достоверности данного наблюдения было проведено сопоставление плотности расположения LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в 2 группах бляшек с различным количеством CD206<sup>+</sup>-макрофагов (1 — отдельные клетки/скопления клеток, занимающие до 15% площади среза; 2 — крупные скопления, занимающие более 15% площади среза), который продемонстрировал более высокую плотность расположения LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в АСБ с крупными скоплениями CD206<sup>+</sup>-макрофагов ( $p = 0,02$ ). Дополнительный анализ характера и интенсивности экспрессии LYVE-1 в эндотелии в данных группах АСБ выявил, что формирование больших скоплений CD206<sup>+</sup>-макрофагов сопряжено с повышением общего количества LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов с интенсивностью экспрессии выраженной и умеренной степени (вне зависимости от характера экспрессии) ( $p = 0,0016$ ), а также сосудов с тотальной экспрессией LYVE-1 эндотелиоцитами (вне зависимости от интенсивности экспрессии) ( $p = 0,005$ ) (табл. 4).

Проведенный корреляционный анализ также продемонстрировал наличие значимой прямой зависимости между количеством и размером скоплений CD206<sup>+</sup>-клеток в

Таблица 1. Количество АСБ КС разного типа, в которых выявлены вновь образованные LYVE-1<sup>+</sup>-сосуды

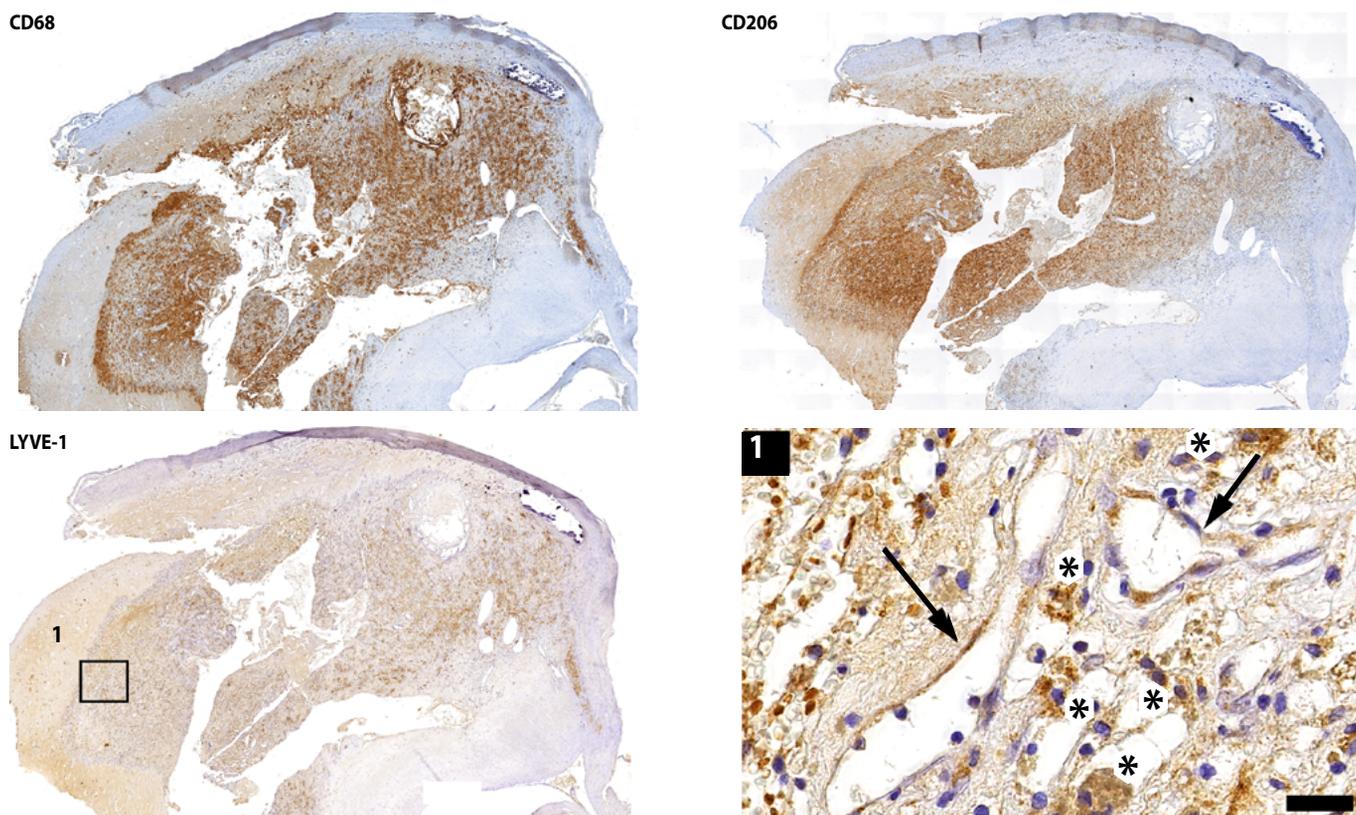
Table 1. Number of different types of carotid atherosclerotic plaques in which newly formed LYVE-1<sup>+</sup> vessels were detected

Показатель Parameter	Тип бляшки Plaque type			
	V (n = 14)	VI (n = 12)	VII (n = 6)	VIII (n = 2)
<b>Присутствие LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в АСБ, всего</b> Presence of LYVE-1 <sup>+</sup> vessels in the plaque, total				
выраженная экспрессия strong expression	7	5	2	0
умеренная экспрессия moderate expression	11	11	5	2
слабая экспрессия weak expression	12	12	6	2
<b>Присутствие LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в АСБ, тотальная экспрессия</b> Presence of LYVE-1 <sup>+</sup> vessels in the plaque, total expression				
выраженная экспрессия strong expression	6	5	2	0
умеренная экспрессия moderate expression	9	11	5	1
слабая экспрессия weak expression	12	12	5	2
<b>Присутствие LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в АСБ, частичная экспрессия</b> Presence of LYVE-1 <sup>+</sup> vessels in the plaque, partial expression				
выраженная экспрессия strong expression	2	1	2	0
умеренная экспрессия moderate expression	9	11	3	2
слабая экспрессия weak expression	12	12	6	2

Таблица 2. Количество LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в 1 см<sup>2</sup> АСБ КС разного типа (Me [Q1; Q3])

Table 2. Number of LYVE-1<sup>+</sup> vessels per 1 cm<sup>2</sup> of carotid atherosclerotic plaque of various types (Me [Q1; Q3])

Показатель Parameter	Тип бляшки Plaque type			
	V (n = 14)	VI (n = 12)	VII (n = 6)	VIII (n = 2)
<b>Общее количество LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в 1 см<sup>2</sup> АСБ</b> Total number of LYVE-1 <sup>+</sup> vessels per 1 cm <sup>2</sup> of plaque				
выраженная экспрессия strong expression	0,5 [0; 9,8]	0 [0; 2,8]	0 [0; 8,4]	0
умеренная экспрессия moderate expression	5 [1,2; 38,1]	9,1 [2,4; 19,3]	9 [3,1; 48,4]	1–8,2
слабая экспрессия weak expression	28,4 [7,1; 38,2]	29,7 [13,3; 38,7]	20,8 [7,8; 79,9]	49,2–50,7
<b>Количество LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в 1 см<sup>2</sup> АСБ, тотальная экспрессия</b> Number of LYVE-1 <sup>+</sup> vessels per 1 cm <sup>2</sup> of plaque, total expression				
выраженная экспрессия strong expression	0 [0; 8,6]	0 [0; 2,4]	0 [0; 6,3]	0
умеренная экспрессия moderate expression	4 [0; 27,9]	4,9 [1,4; 15,1]	3,5 [2; 46,3]	0–1,6
слабая экспрессия weak expression	8,2 [2,1; 23,3]	6,1 [3,8; 15,2]	9,2 [1,4; 33,7]	6,6–8,6
<b>Количество LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в 1 см<sup>2</sup> АСБ, частичная экспрессия</b> Number of LYVE-1 <sup>+</sup> vessels per 1 cm <sup>2</sup> of plaque, partial expression				
выраженная экспрессия strong expression	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0 [0; 2,1]	0
умеренная экспрессия moderate expression	1,3 [0; 2,8]	1,7 [0,9; 5,1]	1,1 [0; 12,1]	1–6,6
слабая экспрессия weak expression	12,2 [2,4; 25,5]	16,5 [10,6; 28,7]	14,5 [4,3; 25,2]	42,1–42,7



**Рис. 2.** Вновь образованные LYVE-1<sup>+</sup>-сосуды в АСБ КС, расположенные в области крупного скопления M2-фракции макрофагов (CD68<sup>+</sup>, CD206<sup>+</sup>, LYVE-1<sup>+</sup>). 1 – LYVE-1<sup>+</sup>-сосуды (указаны стрелками) располагаются в области скопления макрофагов, также экспрессирующих LYVE-1 (указаны звездочками). Линия соответствует 20 мкм

**Fig. 2.** LYVE-1<sup>+</sup> newly formed vessels in a carotid atherosclerotic plaque located in an area of significant M2 macrophages accumulation (CD68<sup>+</sup>, CD206<sup>+</sup>, LYVE-1<sup>+</sup>). 1 – LYVE-1<sup>+</sup> vessels (indicated by arrows) are located in a cluster of macrophages that also express LYVE-1 (indicated by asterisks). The line corresponds to 20 μm

**Таблица 3.** Результаты корреляционного анализа степени выраженности общей макрофагальной реакции и плотности расположения LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в 1 см<sup>2</sup> АСБ (n = 34)

**Table 3.** Results of a correlation analysis between the degree of overall macrophage response and the density of LYVE-1<sup>+</sup> vessels per 1 cm<sup>2</sup> of plaque (n = 34)

Показатель Parameter	Степень выраженности общей макрофагальной реакции Degree of overall macrophage response	
	r	p
Общее количество LYVE-1 <sup>+</sup> -сосудов в 1 см <sup>2</sup> АСБ Total number of LYVE-1 <sup>+</sup> vessels per 1 cm <sup>2</sup> of plaque	0,37	0,03
Общее количество LYVE-1 <sup>+</sup> -сосудов в 1 см <sup>2</sup> АСБ, тотальная экспрессия маркера в эндотелиоцитах Total number of LYVE-1 <sup>+</sup> vessels per 1 cm <sup>2</sup> of plaque, total expression	0,42	0,01
выраженная экспрессия strong expression	0,3	0,08
умеренная экспрессия moderate expression	0,34	0,047
слабая экспрессия weak expression	0,4	0,02
Общее количество LYVE-1 <sup>+</sup> -сосудов в 1 см <sup>2</sup> АСБ, экспрессия маркера в отдельных эндотелиоцитах Total number of LYVE-1 <sup>+</sup> vessels per 1 cm <sup>2</sup> of plaque, partial expression (individual endothelial cells)	0,31	0,07
выраженная экспрессия strong expression	0,14	0,44
умеренная экспрессия moderate expression	0,31	0,07
слабая экспрессия weak expression	0,26	0,14

Таблица 4. Плотность расположения LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в 1 см<sup>2</sup> АСБ в 2 группах бляшек с различным количеством CD206<sup>+</sup>-макрофагов (Ме [Q1; Q3])  
 Table 4. The density of LYVE-1<sup>+</sup> vessels per 1 cm<sup>2</sup> of plaque in 2 groups of plaques with different amounts of CD206<sup>+</sup> macrophages (Me [Q1; Q3])

Показатель Parameter	Небольшие скопления CD206 <sup>+</sup> -макрофагов (n = 16) Small clusters of CD206 <sup>+</sup> macrophages (n = 16)	Крупные скопления CD206 <sup>+</sup> -макрофагов (n = 18) Large clusters of CD206 <sup>+</sup> macrophages (n = 18)	p
<b>Общее количество LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в 1 см<sup>2</sup> АСБ</b> Total number of LYVE-1 <sup>+</sup> vessels per 1 cm <sup>2</sup> of plaque			
умеренная и выраженная экспрессия moderate and strong expression	2,9 [0,5; 10,8]	27,2 [3,8; 64,8]	<b>0,0016</b>
выраженная экспрессия significant expression	0 [0; 0,3]	4,6 [0; 14]	<b>0,03</b>
умеренная экспрессия moderate expression	2,9 [0,5; 10,2]	18,5 [3,5; 48,4]	<b>0,006</b>
слабая экспрессия weak expression	25,1 [6,7; 43,6]	31,7 [13,8; 50,4]	0,2
<b>Количество LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в 1 см<sup>2</sup> АСБ, тотальная экспрессия</b> Number of LYVE-1 <sup>+</sup> vessels per 1 cm <sup>2</sup> of plaque, total expression			
выраженная экспрессия strong expression	0 [0; 0]	4,2 [0; 14]	<b>0,02</b>
умеренная экспрессия moderate expression	1,8 [0; 4]	17,1 [1,7; 42,9]	<b>0,002</b>
слабая экспрессия weak expression	4,9 [1,4; 11,9]	13,3 [4,3; 33,7]	<b>0,03</b>
<b>Количество LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в 1 см<sup>2</sup> АСБ, частичная экспрессия</b> Number of LYVE-1 <sup>+</sup> vessels per 1 cm <sup>2</sup> of plaque, partial expression			
выраженная экспрессия strong expression	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0,77
умеренная экспрессия moderate expression	1,1 [0; 2,7]	1,7 [0,8; 7,1]	0,16
слабая экспрессия weak expression	14,1 [4,5; 30]	17,4 [5,6; 28]	0,72

АСБ и общим количеством LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в 1 см<sup>2</sup> АСБ ( $r = 0,47$ ;  $p = 0,005$ ), а также количеством сосудов с умеренной и/или выраженной экспрессией LYVE-1 в 1 см<sup>2</sup> АСБ ( $r = 0,56$ ;  $p = 0,0006$ ). Зависимость между плотностью расположения в АСБ сосудов со слабой экспрессией LYVE-1 и количеством CD206<sup>+</sup>-клеток не достигала статистической значимости ( $r = 0,3$ ;  $p = 0,08$ ).

## Обсуждение

В проведенном исследовании впервые продемонстрирована экспрессия маркера лимфатического эндотелия LYVE-1 в эндотелиальных клетках вновь образованных сосудов АСБ КС, экспрессирующих CD34 — панэндотелиальный маркер кровеносных микрососудов [16]. В литературе представлены единичные исследования экспрессии LYVE-1 как маркера ЛС в АСБ, в 2 из которых проводилось исследование бляшек КС. В одном из них авторы анализировали наличие ЛС в адвентиции и их взаимосвязь с прогрессированием атеросклероза [5], при этом данные по наличию или отсутствию ЛС в самой АСБ отсутствовали. Во втором исследовании указывалось лишь на наличие ЛС в АСБ [3], при этом данные по коэкспрессии LYVE-1 и CD34, а также по взаимосвязи количества ЛС со структурой АСБ не представлены.

Следует отметить ряд ограничений, имевшихся в проведенном нами исследовании, которые повлияли на возможности интерпретации полученных результатов. В исследовании применялись серийные (последовательные) гистологиче-

ские срезы. Данное обстоятельство позволяет говорить о сочетанной экспрессии двух маркеров в пределах эндотелия одного сосуда, т.к. сопоставлялись соседние участки вновь образованных сосудов, расположенные на расстоянии 5–20 мкм друг от друга. Тем не менее при таком подходе невозможно достоверно оценить, идет ли речь о коэкспрессии маркеров или сочетании в пределах одного эндотелиального пласта фенотипических различных эндотелиоцитов, т.е. о гетерогенности эндотелиального пласта. Кроме того, нельзя говорить о наличии или отсутствии ЛС в АСБ, несмотря на наличие сосудов с тотальной выраженной экспрессией LYVE-1, поскольку анализ экспрессии других маркеров лимфатического эндотелия не проводился, и эндотелиоциты в основном также экспрессировали CD34. При этом данные по коэкспрессии маркеров ограничены, и однозначного объяснения этого явления пока нет.

CD34 преимущественно рассматривается как маркер гемопоэтических стволовых клеток и гемопоэтических клеток-предшественников, однако в последние годы установлено, что он также является общим маркером клеток-предшественников множества типов клеток, включая клетки-предшественники сосудистого эндотелия [17, 18]. CD34 в норме экспрессируется с некоторой гетерогенностью эндотелиальными клетками кровеносных сосудов в большинстве сосудистых бассейнов и широко применяется в качестве панэндотелиального маркера микрососудистого русла, поскольку отсутствует в эндотелии ЛС и большинства крупных кровеносных сосудов [19]. Поэтому сочетан-

ная экспрессия CD34 и LYVE-1 является, скорее, исключением, чем правилом, у взрослых людей. Хотя структура рецептора хорошо охарактеризована, о его функциях относительно мало что известно. На данный момент установлено, что CD34 участвует в межклеточной адгезии, посредством которой может регулировать пролиферацию и дифференцировку клеток [17, 18]. В этой связи сочетанная экспрессия CD34 и LYVE-1 может быть связана с активацией лимфангиогенеза в АСБ.

С появлением специфических маркеров лимфатического эндотелия понимание механизмов лимфангиогенеза значительно улучшилось, хотя на текущий момент сильно уступает накопленным данным по ангиогенезу. Большинство проведенных исследований в основном касаются формирования лимфатической системы во время эмбрионального развития, тогда как механизмы формирования и источники новых ЛС в постнатальном периоде остаются во многом слабо изученными и основанными в большей степени на экстраполяции результатов исследований эмбрионального развития. На текущий момент считается, что формирование новых ЛС в постнатальном периоде может происходить путем лимфангиогенеза (формирование новых ЛС из предсуществующих лимфатических или кровеносных сосудов путем ремоделирования и пролиферации клеток), а также лимфоваскулогенеза (формирование *de novo* посредством стволовых клеток-предшественников лимфатического эндотелия), при этом лимфангиогенез считается основным путем формирования новых ЛС как в эмбриональном, так и в постнатальном периодах [14]. Общеизвестным основным источником лимфатического эндотелия и ЛС в эмбриональном периоде является эндотелий вен [14]. Возможность формирования новых ЛС в постнатальном периоде из эндотелия кровеносных сосудов также не исключается. В подтверждение этому в исследованиях *in vitro* продемонстрирована возможность трансдифференцировки эндотелия кровеносных сосудов в лимфатические эндотелиальные клетки (ЛЭК), а также восстановление исходного фенотипа после прекращения воздействия стимула [20].

В последние годы появляется все больше доказательств того, что коэкспрессия CD34 и LYVE-1 в эндотелии может быть связана с образованием новых ЛС или активацией лимфангиогенной программы в эндотелиоцитах кровеносных сосудов. Так, экспрессия CD34 некоторыми популяциями ЛЭК впервые была продемонстрирована в ультраструктурных иммуноморфологических исследованиях, и авторы выдвинули гипотезу, что CD34 в данном случае может играть роль в миграции и образовании трубчатых структур ЛЭК [21]. Также получены многочисленные свидетельства экспрессии CD34 в ЛЭК различных опухолей на фоне активного лимфангиогенеза [19, 22].

Другим возможным источником лимфатического эндотелия при лимфангиогенезе может быть привлечение и встраивание в стенку микрососуда клеток-предшественников, которые способны дифференцироваться в ЛЭК [23, 24], экспрессирующие как сосудистые, так и лимфатические специфические маркеры [25]. По данным литературы, коэкспрессию LYVE-1 и CD34 также можно рассматривать как маркер гемопоэтических стволовых клеток кровеносных сосудов и как маркер промежуточной стадии дифференцировки стволовых клеток в ЛЭК [24, 25].

Третьим возможным источником LYVE-1<sup>+</sup>-клеток в эндотелии вновь образованных сосудов могут быть макро-

фаги, как правило, в большом количестве присутствующие в АСБ. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* показано, что моноциты и макрофаги способны при определенных условиях трансдифференцироваться в эндотелиоциты и встраиваться в стенку формирующегося сосуда [26–28], в том числе макрофаги, экспрессирующие LYVE-1 [28]. В проведенном исследовании LYVE-1<sup>+</sup>-сосуды, как правило, были окружены макрофагами, также экспрессирующими LYVE-1 (противовоспалительная M2-фракция макрофагов [10, 12]), что свидетельствует о возможности реализации такого механизма появления LYVE-1<sup>+</sup>-эндотелиоцитов в сосудах АСБ.

Таким образом, источник LYVE-1<sup>+</sup>-эндотелиоцитов, причина активации экспрессии и функциональное значение рецептора во вновь образованных сосудах АСБ КС остаются не вполне понятными. Появление «гибридных» сосудов в АСБ, имеющих смешанный ангио/лимфангиогенный фенотип, может свидетельствовать об активации лимфангиогенной программы в эндотелиоцитах и начале лимфангиогенеза, источником которого являются вновь образованные сосуды, но в то же время может представлять собой характерный признак сосудистого русла АСБ в областях активного репаративного процесса, где LYVE-1, который может располагаться на аблюминальной поверхности эндотелиоцитов, может опосредовать попадание воспалительных клеток в просвет сосуда и удаление их из ткани, связывать провоспалительные интерлейкины и факторы роста, а также регулировать воспалительную реакцию.

Как известно, подавляющее большинство вновь образованных сосудов в АСБ имеют профиль, очень сходный с таковым ЛС: они состоят из одного слоя эндотелиоцитов, как правило, не имеют базальной мембраны или она является прерывистой, межэндотелиальные контакты не плотные, между эндотелиоцитами зачастую имеются щели, отсутствует слой перicyтов [29, 30]. Все эти признаки характерны и для лимфатических капилляров [2]. Тем не менее во многих исследованиях для идентификации кровеносных сосудов в АСБ использовали антитела к CD31 — рецептору, который также может присутствовать и в ЛЭК [31], при этом оценки экспрессии специфических маркеров ЛЭК не проводилось.

Учитывая функцию ЛС, логично было бы ожидать большего количества лимфатических или LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в более стабильных АСБ, однако нами не обнаружено различий в плотности расположения LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в бляшках различных типов, а также в зависимости от выраженности в них различных структурных компонентов, за исключением макрофагальной реакции. Это может быть связано с небольшим объемом выборки (34 бляшки, 2–14 бляшек в каждой группе), а также с подавлением экспрессии LYVE-1 или редукцией лимфатической сети после реализации своей функции, что было продемонстрировано на мышинной модели повреждения роговицы [32]. Редукция лимфатической сети АСБ также может объясниться ранее полученные столь неоднозначные результаты исследований ЛС в АСБ.

Выявленная нами слабая корреляция между общей макрофагальной реакцией и плотностью расположения в бляшке LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов может быть связана с гетерогенной популяцией макрофагов в АСБ и различным соотношением в них про- и противовоспалительных фракций. С учетом предполагаемого активного участия ЛС в репаративных

процессах при атеросклерозе вполне закономерно ожидать наличие взаимосвязи экспрессии LYVE-1 в эндотелии вновь образованных сосудов АСБ с выраженностью в ней инфильтрации именно противовоспалительной фракцией макрофагов, так называемыми «репаративными» макрофагами, что подтвердилось в проведенном исследовании. Нами была обнаружена прямая зависимость между плотностью расположения в АСБ LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов, в особенности сосудов с выраженной и умеренной интенсивностью экспрессии маркера, и количеством и размером скоплений противовоспалительной M2-фракции макрофагов (CD206<sup>+</sup>), которые, согласно литературным данным [33, 34], способствуют репарации ткани и замедляют прогрессирование атеросклероза. Влияние различных фракций макрофагов на неоваскуляризацию исследовано главным образом в аспекте онкологических заболеваний, где продемонстрировано, что противовоспалительные M2-макрофаги усиливают лимфангиогенез различными путями, в том числе посредством продукции соответствующих факторов роста и ремоделирования матрикса [35]. Кроме того, на модели повреждения роговицы показано, что инфильтрация ткани макрофагами, в особенности

M2-фракцией, является обязательным условием активации лимфангиогенеза, поддержания эффективного лимфангиогенного ответа и функционирования ЛС [32].

## Заключение

Впервые в эндотелии вновь образованных сосудов АСБ КС продемонстрирована сочетанная экспрессия маркера лимфатического эндотелия LYVE-1 и панэндотелиального маркера кровеносных микрососудов CD34. Плотность расположения LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов в бляшках не зависела от объемной доли атероматоза, степени выраженности обызвествления или кровоизлияний и не различалась в разных типах бляшек. Тем не менее отмеченная преимущественная локализация сосудов с умеренной и выраженной экспрессией LYVE-1 в областях скопления противовоспалительной M2-фракции макрофагов (CD206<sup>+</sup>), а также прямая зависимость между плотностью расположения LYVE-1<sup>+</sup>-сосудов и количеством CD206<sup>+</sup>-клеток в бляшках может указывать на связь экспрессии LYVE-1 в эндотелии вновь образованных сосудов с репаративными процессами в бляшке, что требует дополнительного изучения.

## Список литературы

- Lemole G.M.Sr. The role of lymphostasis in atherogenesis revisited. *Ann Thorac Surg* 2016; 101: 2029. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2015.09.093. PMID: 27106458.
- Zheng Z., Ren K., Peng X. et al. Lymphatic vessels: a potential approach to the treatment of atherosclerosis? *Lymphat Res Biol* 2018; 16: 498–506. DOI: 10.1089/lrb.2018.0015. PMID: 30272526.
- Kutkut I., Meens M.J., Mckee T.A. et al. Lymphatic vessels: an emerging actor in atherosclerotic plaque development. *Eur J Clin Invest* 2015; 45: 100–108. DOI: 10.1111/eci.12372. PMID: 25388153.
- Csányi G., Singla B. Arterial lymphatics in atherosclerosis: old questions, new insights, and remaining challenges. *J Clin Med* 2019; 8: 495. DOI: 10.3390/jcm8040495. PMID: 30979062.
- Drozd K., Janczak D., Dziegiel P. et al. Adventitial lymphatics of internal carotid artery in healthy and atherosclerotic vessels. *Folia Histochem Cytobiol* 2008; 46: 433–436. DOI: 10.2478/v10042-008-0083-7. PMID: 19141394.
- Drozd K., Janczak D., Dziegiel P. et al. Adventitial lymphatics and atherosclerosis. *Lymphology* 2012; 45: 26–33. PMID: 22768470.
- Kholová I., Dragneva G., Čermáková P. et al. Lymphatic vasculature is increased in heart valves, ischaemic and inflamed hearts and in cholesterol-rich and calcified atherosclerotic lesions. *Eur J Clin Invest* 2011; 41: 487–497. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2010.02431.x. PMID: 21128936.
- Eliska O., Eliskova M., Miller A.J. The absence of lymphatics in normal and atherosclerotic coronary arteries in man: a morphologic study. *Lymphology* 2006; 39: 76–83. PMID: 16910098.
- Banerji S., Ni J., Wang S.X. et al. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 1999; 144: 789–801. DOI: 10.1083/jcb.144.4.789. PMID: 10037799.
- Jackson D.G. Hyaluronan in the lymphatics: the key role of the hyaluronan receptor LYVE-1 in leucocyte trafficking. *Matrix Biol* 2019; 78–79: 219–235. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.02.001. PMID: 29425695.
- Wróbel T., Dziegiel P., Mazur G. et al. LYVE-1 expression on high endothelial venules (HEVs) of lymph nodes. *Lymphology* 2005; 38: 107–110. PMID: 16353487.
- Schledzewski K., Falkowski M., Moldenhauer G. et al. Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1+, F4/80+, CD11b<sup>+</sup> macrophages in malignant tumours and wound healing tissue in vivo and in bone marrow cultures in vitro: Implications for the assessment of lymphangiogen. *J Pathol* 2006; 209: 67–77. DOI: 10.1002/path.1942. PMID: 16482496.
- Krolikoski M., Monslow J., Puré E. The CD44-HA axis and inflammation in atherosclerosis: a temporal perspective. *Matrix Biol* 2019; 78–79: 201–218. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.05.007. PMID: 29792915.
- Escobedo N., Oliver G. Lymphangiogenesis: origin, specification, and cell fate determination. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2016; 32: 677–691. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-111315-124944. PMID: 27298093.
- Stary H.C. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1177–1178. DOI: 10.1161/01.ATV.20.5.1177. PMID: 10807728.
- Baumhueter S., Dybdal N., Kyle C., Lasky L.A. Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 1994;

## References

- Lemole G.M.Sr. The role of lymphostasis in atherogenesis revisited. *Ann Thorac Surg* 2016; 101: 2029. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2015.09.093. PMID: 27106458.
- Zheng Z., Ren K., Peng X. et al. Lymphatic vessels: a potential approach to the treatment of atherosclerosis? *Lymphat Res Biol* 2018; 16: 498–506. DOI: 10.1089/lrb.2018.0015. PMID: 30272526.
- Kutkut I., Meens M.J., Mckee T.A. et al. Lymphatic vessels: an emerging actor in atherosclerotic plaque development. *Eur J Clin Invest* 2015; 45: 100–108. DOI: 10.1111/eci.12372. PMID: 25388153.
- Csányi G., Singla B. Arterial lymphatics in atherosclerosis: old questions, new insights, and remaining challenges. *J Clin Med* 2019; 8: 495. DOI: 10.3390/jcm8040495. PMID: 30979062.
- Drozd K., Janczak D., Dziegiel P. et al. Adventitial lymphatics of internal carotid artery in healthy and atherosclerotic vessels. *Folia Histochem Cytobiol* 2008; 46: 433–436. DOI: 10.2478/v10042-008-0083-7. PMID: 19141394.
- Drozd K., Janczak D., Dziegiel P. et al. Adventitial lymphatics and atherosclerosis. *Lymphology* 2012; 45: 26–33. PMID: 22768470.
- Kholová I., Dragneva G., Čermáková P. et al. Lymphatic vasculature is increased in heart valves, ischaemic and inflamed hearts and in cholesterol-rich and calcified atherosclerotic lesions. *Eur J Clin Invest* 2011; 41: 487–497. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2010.02431.x. PMID: 21128936.
- Eliska O., Eliskova M., Miller A.J. The absence of lymphatics in normal and atherosclerotic coronary arteries in man: a morphologic study. *Lymphology* 2006; 39: 76–83. PMID: 16910098.
- Banerji S., Ni J., Wang S.X. et al. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 1999; 144: 789–801. DOI: 10.1083/jcb.144.4.789. PMID: 10037799.
- Jackson D.G. Hyaluronan in the lymphatics: the key role of the hyaluronan receptor LYVE-1 in leucocyte trafficking. *Matrix Biol* 2019; 78–79: 219–235. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.02.001. PMID: 29425695.
- Wróbel T., Dziegiel P., Mazur G. et al. LYVE-1 expression on high endothelial venules (HEVs) of lymph nodes. *Lymphology* 2005; 38: 107–110. PMID: 16353487.
- Schledzewski K., Falkowski M., Moldenhauer G. et al. Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1+, F4/80+, CD11b<sup>+</sup> macrophages in malignant tumours and wound healing tissue in vivo and in bone marrow cultures in vitro: Implications for the assessment of lymphangiogen. *J Pathol* 2006; 209: 67–77. DOI: 10.1002/path.1942. PMID: 16482496.
- Krolikoski M., Monslow J., Puré E. The CD44-HA axis and inflammation in atherosclerosis: a temporal perspective. *Matrix Biol* 2019; 78–79: 201–218. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.05.007. PMID: 29792915.
- Escobedo N., Oliver G. Lymphangiogenesis: origin, specification, and cell fate determination. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2016; 32: 677–691. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-111315-124944. PMID: 27298093.
- Stary H.C. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1177–1178. DOI: 10.1161/01.ATV.20.5.1177. PMID: 10807728.
- Baumhueter S., Dybdal N., Kyle C., Lasky L.A. Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 1994;

84: 2554–2565. DOI: 10.1182/blood.v84.8.2554.bloodjournal8482554. PMID: 7522633.

17. Shi Q., VandeBerg J.L. Experimental approaches to derive CD34+ progenitors from human and nonhuman primate embryonic stem cells. *Am J Stem Cells* 2015; 4: 32–37. PMID: 25973329.

18. Sidney L.E., Branch M.J., Dunphy S.E. et al. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells* 2014; 32: 1380–1389. DOI: 10.1002/stem.1661. PMID: 24497003.

19. Fiedler U., Christian S., Koidl S. et al. The sialomucin CD34 is a marker of lymphatic endothelial cells in human tumors. *Am J Pathol* 2006; 168: 1045–1053. DOI: 10.2353/ajpath.2006.050554. PMID: 16507917.

20. Hong Y.-K., Harvey N., Noh Y.-H. et al. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn* 2002; 225: 351–357. DOI: 10.1002/dvdy.10163. PMID: 12412020.

21. Sauter B., Foedinger D., Sterniczky B. et al. Immunoelectron microscopic characterization of human dermal lymphatic microvascular endothelial cells. Differential expression of CD31, CD34, and type IV collagen with lymphatic endothelial cells vs blood capillary endothelial cells in normal human skin, lymphangioma, and hemangioma in situ. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 165–176. DOI: 10.1177/002215549804600205. PMID: 9446823.

22. Meng F.-W., Liu F.-S., Liu W.-H. et al. Formation of new lymphatic vessels in glioma: an immunohistochemical analysis. *Neuropathology* 2020; 40: 215–223. DOI: 10.1111/neup.12625. PMID: 31960509.

23. Zhang H.-F., Wang Y.-L., Tan Y.-Z. et al. Enhancement of cardiac lymphangiogenesis by transplantation of CD34+VEGFR-3+ endothelial progenitor cells and sustained release of VEGF-C. *Basic Res Cardiol* 2019; 114: 43. DOI: 10.1007/s00395-019-0752-z. PMID: 31587086.

24. Meng F.-W., Gao Z.-L., Li L. et al. Reconstruction of lymphatic vessels in the mouse tail after cupping therapy. *Folia Morphol (Warsz)* 2020; 79: 98–104. DOI: 10.5603/FM.a2019.0044. PMID: 30993665.

25. Salven P., Mustjoki S., Alitalo R. et al. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood* 2003; 101: 168–172. DOI: 10.1182/blood-2002-03-0755. PMID: 12393704.

26. Schmeisser A., Garlich C.D., Zhang H. et al. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 671–680. DOI: 10.1016/S0008-6363(00)00270-4. PMID: 11166280.

27. Cursiefen C., Chen L., Borges L.P. et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest* 2004; 113: 1040–1050. DOI: 10.1172/JCI20465. PMID: 15057311.

28. Attout T., Hoerauf A., Dénécé G. et al. Lymphatic vascularisation and involvement of Lyve-1+ macrophages in the human Onchocerca nodule. *PLoS One* 2009; 4: e8234. DOI: 10.1371/journal.pone.0008234. PMID: 20011036.

29. Dunmore B.J., McCarthy M.J., Naylor A.R., Brindle N.P.J. Carotid plaque instability and ischemic symptoms are linked to immaturity of microvessels within plaques. *J Vasc Surg* 2007; 45: 155–159. DOI: 10.1016/j.jvs.2006.08.072. PMID: 17210401.

30. Sluimer J.C., Kolodgie F.D., Bijnens A.P.J.J. et al. Thin-walled microvessels in human coronary atherosclerotic plaques show incomplete endothelial junctions. Relevance of compromised structural integrity for intraplaque microvascular leakage. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 1517–1527. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.12.056. PMID: 19389562.

31. Torzicky M., Viznerova P., Richter S. et al. Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1/CD31) and CD99 are critical in lymphatic transmigration of human dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 1149–1157. DOI: 10.1038/jid.2011.420. PMID: 22189791.

32. Kiesewetter A., Cursiefen C., Eming S.A., Hos D. Phase-specific functions of macrophages determine injury-mediated corneal hem- and lymphangiogenesis. *Sci Rep* 2019; 9: 308. DOI: 10.1038/s41598-018-36526-6. PMID: 30670724.

33. Сарбаева Н.Н., Пономарева Ю.В., Милякова М.Н. Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами. *Гены и клетки* 2016; 11(1): 9–17.

34. de Gaetano M., Crean D., Barry M., Belton O. M1- and M2-Type macrophage responses are predictive of adverse outcomes in human atherosclerosis. *Front Immunol* 2016; 7: 275. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00275. PMID: 27486460.

35. Bieniasz-Krzywiec P., Martín-Pérez R., Ehling M. et al. Podoplanin-expressing macrophages promote lymphangiogenesis and lymphoinvasion in breast cancer. *Cell Metab* 2019; 30: 917–936.e10. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.07.015. PMID: 31447322.

## Информация об авторах

Евдокименко Анна Николаевна — к.м.н., с.н.с. лаб. нейроморфологии отдела исследования мозга, учёный секретарь ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия  
Куличенкова Ксения Николаевна — м.н.с. лаб. клинической и функциональной нейробиологии ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия  
Гулевская Татьяна Сергеевна — д.м.н., проф., г.н.с. лаб. нейроморфологии отдела исследования мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

84: 2554–2565. DOI: 10.1182/blood.v84.8.2554.bloodjournal8482554. PMID: 7522633.

17. Shi Q., VandeBerg J.L. Experimental approaches to derive CD34+ progenitors from human and nonhuman primate embryonic stem cells. *Am J Stem Cells* 2015; 4: 32–37. PMID: 25973329.

18. Sidney L.E., Branch M.J., Dunphy S.E. et al. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells* 2014; 32: 1380–1389. DOI: 10.1002/stem.1661. PMID: 24497003.

19. Fiedler U., Christian S., Koidl S. et al. The sialomucin CD34 is a marker of lymphatic endothelial cells in human tumors. *Am J Pathol* 2006; 168: 1045–1053. DOI: 10.2353/ajpath.2006.050554. PMID: 16507917.

20. Hong Y.-K., Harvey N., Noh Y.-H. et al. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn* 2002; 225: 351–357. DOI: 10.1002/dvdy.10163. PMID: 12412020.

21. Sauter B., Foedinger D., Sterniczky B. et al. Immunoelectron microscopic characterization of human dermal lymphatic microvascular endothelial cells. Differential expression of CD31, CD34, and type IV collagen with lymphatic endothelial cells vs blood capillary endothelial cells in normal human skin, lymphangioma, and hemangioma in situ. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 165–176. DOI: 10.1177/002215549804600205. PMID: 9446823.

22. Meng F.-W., Liu F.-S., Liu W.-H. et al. Formation of new lymphatic vessels in glioma: an immunohistochemical analysis. *Neuropathology* 2020; 40: 215–223. DOI: 10.1111/neup.12625. PMID: 31960509.

23. Zhang H.-F., Wang Y.-L., Tan Y.-Z. et al. Enhancement of cardiac lymphangiogenesis by transplantation of CD34+VEGFR-3+ endothelial progenitor cells and sustained release of VEGF-C. *Basic Res Cardiol* 2019; 114: 43. DOI: 10.1007/s00395-019-0752-z. PMID: 31587086.

24. Meng F.-W., Gao Z.-L., Li L. et al. Reconstruction of lymphatic vessels in the mouse tail after cupping therapy. *Folia Morphol (Warsz)* 2020; 79: 98–104. DOI: 10.5603/FM.a2019.0044. PMID: 30993665.

25. Salven P., Mustjoki S., Alitalo R. et al. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood* 2003; 101: 168–172. DOI: 10.1182/blood-2002-03-0755. PMID: 12393704.

26. Schmeisser A., Garlich C.D., Zhang H. et al. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 671–680. DOI: 10.1016/S0008-6363(00)00270-4. PMID: 11166280.

27. Cursiefen C., Chen L., Borges L.P. et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest* 2004; 113: 1040–1050. DOI: 10.1172/JCI20465. PMID: 15057311.

28. Attout T., Hoerauf A., Dénécé G. et al. Lymphatic vascularisation and involvement of Lyve-1+ macrophages in the human Onchocerca nodule. *PLoS One* 2009; 4: e8234. DOI: 10.1371/journal.pone.0008234. PMID: 20011036.

29. Dunmore B.J., McCarthy M.J., Naylor A.R., Brindle N.P.J. Carotid plaque instability and ischemic symptoms are linked to immaturity of microvessels within plaques. *J Vasc Surg* 2007; 45: 155–159. DOI: 10.1016/j.jvs.2006.08.072. PMID: 17210401.

30. Sluimer J.C., Kolodgie F.D., Bijnens A.P.J.J. et al. Thin-walled microvessels in human coronary atherosclerotic plaques show incomplete endothelial junctions. Relevance of compromised structural integrity for intraplaque microvascular leakage. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 1517–1527. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.12.056. PMID: 19389562.

31. Torzicky M., Viznerova P., Richter S. et al. Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1/CD31) and CD99 are critical in lymphatic transmigration of human dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 1149–1157. DOI: 10.1038/jid.2011.420. PMID: 22189791.

32. Kiesewetter A., Cursiefen C., Eming S.A., Hos D. Phase-specific functions of macrophages determine injury-mediated corneal hem- and lymphangiogenesis. *Sci Rep* 2019; 9: 308. DOI: 10.1038/s41598-018-36526-6. PMID: 30670724.

33. Sarbaeva N.N., Ponomareva Yu.V., Milyakova M.N. [Macrophages: diversity of phenotypes and functions, interaction with foreign materials]. *Geny i клетки* 2016; 11(1): 9–17. (In Russ.)

34. de Gaetano M., Crean D., Barry M., Belton O. M1- and M2-Type macrophage responses are predictive of adverse outcomes in human atherosclerosis. *Front Immunol* 2016; 7: 275. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00275. PMID: 27486460.

35. Bieniasz-Krzywiec P., Martín-Pérez R., Ehling M. et al. Podoplanin-expressing macrophages promote lymphangiogenesis and lymphoinvasion in breast cancer. *Cell Metab* 2019; 30: 917–936.e10. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.07.015. PMID: 31447322.

## Information about the authors

Anna N. Evdokimenko — PhD (Med.), senior researcher, Laboratory of neuromorphology, Department of brain research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia  
Ksenia N. Kulichenkova — junior researcher, Laboratory of neuromorphology, Department of brain research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia  
Tatiana S. Gulevskaya — D. Sci. (Med.), Professor, chief researcher, Laboratory of neuromorphology, Department of brain research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia