

Н.Я.Чуйко

Івано-Франківський національний медичний університет, Івано-Франківськ

Ключові слова: макрофаги, лімфоцити, атеросклероз, метаболічний синдром.

Надійшла: 26.08.2013
Прийнята: 17.09.2013

УДК: 616.831 – 005.1 – 091.8:612.112.94

РОЛЬ МАКРОФАГІВ І ЛІМФОЦИТІВ У МОРФОГЕНЕЗІ ЗМІН СУДИН ГОЛОВНОГО МОЗКУ ПРИ МЕТАБОЛІЧНОМУ СИНДРОМІ, УСКЛАДНЕНОМУ ІНСУЛЬТОМ

Дослідження проведено у рамках науково-дослідної роботи “Патоморфологія серцево-судинної системи, плаценти, жирової тканини, нирок, головного мозку, регуляторних систем (APUD, імунної) при метаболічному синдромі, гострій ішемії міокарда, облітеруючих захворюваннях судин нижніх кінцівок, хворобах легень, пухлинних процесах і внутрішньоутробних інфекціях у клініці й експерименті” (номер державної реєстрації 0107U002769).

Реферат. Основним морфологічним субстратом ураження артерій при метаболічному синдромі є атеросклероз, морфогенез якого на сьогоднішній день вивчений недостатньо. Мета – вивчити роль макрофагів і лімфоцитів у морфогенезі змін артерій головного мозку у пацієнтів з метаболічним синдромом, ускладненим ішемічним і геморагічним інсультом. Досліджені судини головного мозку 30 померлих з ішемічними інсультами, 30 – з геморагічними інсультами на фоні метаболічного синдрому, і 20 померлих від причин, не пов'язаних із цереброваскулярними захворюваннями (група порівняння). Гістологічні препарати судин фарбували гематоксиліно-еозином, а також проводили імуногістохімічне дослідження з використанням маркерів CD4, CD8, CD20 і CD 68. Кількість CD68 позитивних клітин, в ділянках формування атеросклеротичних уражень становила в групі з ішемічним інсультом $16,68 \pm 1,82$, в групі з геморагічним інсультом – $14,56 \pm 1,28$. Кількість Т-лімфоцитів хелперів ($CD4^+$) у ділянках формування атеросклеротичних уражень становили $11,18 \pm 1,76$ у групі з ішемічним інсультом і $10,32 \pm 1,24$ в групі з геморагічним інсультом. Т-лімфоцити супресори ($CD8^+$) становили відповідно $8,56 \pm 1,16$ і $9,12 \pm 1,64$. В-лімфоцити ($CD20^+$) були представлені в меншій кількості – $5,34 \pm 0,86$ при ішемічному інсульті і $6,04 \pm 1,14$ при геморагічному інсульті. Наявність макрофагів, лімфоцитів хелперів і супресорів в стінці артерій у вогнищах атеросклеротичного ураження у групах з ішемічним і геморагічним інсультом як ускладнення метаболічного синдрому свідчить про участь цих клітин в морфогенезі змін артерій при метаболічному синдромі.

Morphologia. – 2013. – Т. VII, № 3. – С. 112-116.

© Н.Я.Чуйко, 2013

Chuiko N.Ya. Role of macrophages and lymphocytes in morphogenesis of features of blood vessel in patients with metabolic syndrome complicated by stroke.

ABSTRACT. Background. The main morphological substrate of arterial disease in the metabolic syndrome is atherosclerosis, which morphogenesis is studied insufficiently. **Objective.** To estimate the role of macrophages and lymphocytes in the morphogenesis of changes of cerebral arteries in patients with metabolic syndrome complicated by ischemic and hemorrhagic stroke. **Methods.** We investigated brain vessels of 30 deaths from ischemic stroke, 30 - with hemorrhagic stroke on the background of metabolic syndrome and 20 died of causes unrelated to cerebrovascular disease (control group). Samples were investigated with histological and immunocytochemical methods; in particular the expression of CD4, CD8, CD20 and CD68 markers was examined. **Results.** The amount of CD68 positive cells in the area of formation of atherosclerosis lesions was $16,68 \pm 1,82$ in group with ischemic stroke and $14,56 \pm 1,28$ in group with hemorrhagic stroke. The number of T-helpers ($CD4^+$) in the area of formation of atherosclerosis lesions was $11,18 \pm 1,76$ in group with ischemic stroke and $10,32 \pm 1,24$ in group with hemorrhagic stroke. The number of T-suppressors ($CD8^+$) was $8,56 \pm 1,16$ and $9,12 \pm 1,64$, respectively. The amount of B-lymphocytes ($CD20^+$) was - $5,34 \pm 0,86$ with ischemic stroke and $6,04 \pm 1,14$ with hemorrhagic stroke. **Conclusion.** The presence of macrophages, helper and suppressor lymphocytes in vessel wall with atherosclerosis in patients with ischemic and hemorrhagic stroke as complication of metabolic syndrome confirm the role of these cells in morphogenesis of changes in brain arteries at metabolic syndrome.

Key words: macrophages, lymphocytes, atherosclerosis, metabolic syndrome.

Citation:

Chuiko NYa. [Role of macrophages and lymphocytes in morphogenesis of features of blood vessel in patients with metabolic syndrome complicated by stroke]. *Morphologia*. 2013; 7(3):112-6. Ukrainian.

Вступ

Метаболічний синдром (МС) є надзвичайно актуальною проблемою сучасної медицини. Описаний ще у 1982 р. як поєднання гіпертензії, гіперінсулінемії, дисліпідемії та ожиріння, на сьогоднішній день він вбирає в себе все більше проявів, однак найбільш небезпечними залишаються гіпертонічний та діабетичний типи МС, які часто ускладнюються інсультами, що призводять до смерті і інвалідизації. Вважається, що МС за патогенетичним розвитком є досить складним, але зворотнім станом. Унікальність МС полягає в тому, що можна зменшувати його прояви, впливаючи на один з компонентів [1]. В зв'язку з цим, актуальним є вивчення морфогенезу змін судин головного мозку, що є основою виникнення мозкових інсультів. Основним морфологічним субстратом ураження артерій при МС є атеросклероз (АС), морфогенез якого на сьогоднішній день вивчений недостатньо. В останні роки виникнення і розвиток АС розглядають з позицій імунного запалення, де важливе значення надають ролі імунокомпетентних клітин [2]. Інфільтрацію стінки артерій моноцитами-макрофагами відмічали при експериментальних дослідженнях [3; 4; 5]. Адгезія моноцитів на люмінальній поверхні артерій, наявність великої кількості цих клітин під ендотелієм, а більш зрілих макрофагів у глибині інтими, свідчить про поступлення цих клітин з крові в стінку артерії [6]. Локальна інфільтрація макрофагами в ділянках формування атеросклеротичних уражень часто поєднується з накопиченням Т-лімфоцитів, що вказує на запальний характер процесу [7]. Макрофаги мають на поверхні рецептори до ліпопротеїнів низької щільності. Активація моноклеарів через зв'язування цих рецепторів з окисленими атерогенними ліпопротеїнами призводить до активації субінтимальних моноклеарних фагоцитів, в результаті чого вони набувають здатності до ендоцитозу ліпопротеїнів [8].

Метою дослідження стало вивчення ролі макрофагів і лімфоцитів у морфогенезі змін артерій головного мозку у пацієнтів з метаболічним синдромом, ускладненим ішемічним і геморагічним інсультом.

Матеріали та методи

Досліджені судини головного мозку 30 померлих з ішемічними інсультами, 30 – з геморагічними інсультами на фоні МС і 20 померлих від причин, не пов'язаних із цереброваскулярними захворюваннями (група порівняння). Середній вік померлих з ішемічним інсультом – $54,8 \pm 3,6$ років, групи порівняння – $50,4 \pm 4,7$ років. В досліджуваній групі брали по 2-3 сегмента внутрішньої сонної артерії з ліпідними і фіброзними бляшками, у групі порівняння – незмінені ділянки сонних артерій.

Гістологічні препарати судин фарбували ге-

матоксиліном-еозином, а також проводили імуногістохімічне дослідження з використанням маркера CD4 (CD4 Ab-8), CD8 (SP 16), CD20 (CD 20 Ab-1) і CD 68 (CD68/Macrophage Marker Ab-4).

Матеріал фіксували в 10% розчині нейтрального забуференого формаліну, проводили за загальноприйнятою методикою. Для проведення імуногістохімічних реакцій зрізи товщиною 4-5 мкм монтували на адгезивні скельця Super Frost Plus (фірми Menzel), депарафінували, гідратували і обробляли 3% розчином перекису водню для блокування ендогенної пероксидази. В якості других антитіл використовували набір Ultra Vision Detection System (фірми Thermo Scientific). Для відокремлення неспецифічних структур зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра.

Результати імуногістохімічних реакцій оцінювали шляхом підрахунку клітин з позитивним забарвленням у 10 випадково обраних полях зору мікроскопу при збільшенні 400. Гістологічне дослідження і фотозйомку мікропрепаратів проводили на мікроскопі AxioScop 40 (Zeiss). Дані морфометричних досліджень підлягали статистичній обробці за допомогою персонального комп'ютера по стандартній програмі Microsoft Excel, результати обробляли методом варіаційної статистики і вважали достовірними при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Досліджували характер інфільтрату в стінках артерій за допомогою маркерів CD4 (Т-лімфоцити хелпери), CD8 (Т-супресори), CD20 (В-лімфоцити), CD68 (макрофаги). В ділянках формування атеросклеротичних уражень була відмічена значна кількість CD68 позитивних клітин з експресією маркера в цитоплазмі (рис. 1), яка становила в групі з ішемічним інсультом $16,68 \pm 1,82$, в групі з геморагічним інсультом – $14,56 \pm 1,28$ ($p > 0,05$).

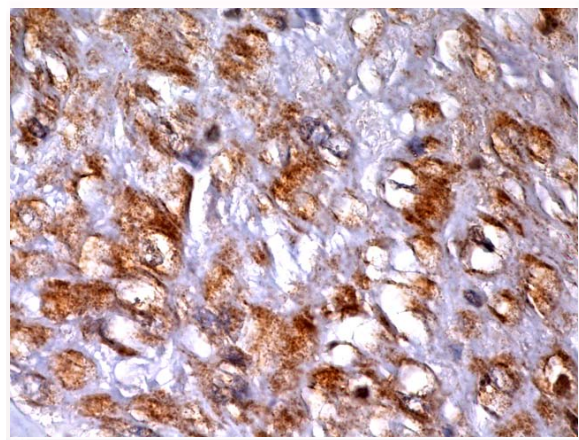


Рис. 1. Експресія маркера CD68 в стінці артерії пацієнта з ішемічним інсультом. $\times 400$.

Вважається, що під дією гемодинамічних факторів ендотеліальні клітини артерій синтезують макрофагальний хемореактивний фактор, що призводить до накопичення в інтимі моноцитів-макрофагів, які відіграють важливу роль у розвитку АС [9]. Моноцити крові прикріплюються до ендотелію, у місцях формування атероматозної бляшки відбувається експресія адгезивних молекул і виробляються речовини типу селектинів, інтегринів і інтерлейкінів [6]. Адгезивні молекули сприяють агрегації тромбоцитів, лімфоцитів та інших клітин крові, що призводить до подальшого пошкодження ендотелію [7]. В початковій стадії атерогенезу моноцити крові накопичуються у пошкоджену шарі ендотелію і субендотеліальному просторі, далі вони трансформуються у макрофаги, накопичують ліпіди, цитоплазма яких набуває пінистого вигляду, тобто утворюються пінисті клітини [8].

Моноцити-макрофаги поглинають і катаболізують білки, експресують на своїй поверхні їхні короткі пептидні фрагменти, які за участю білків активації передаються Т-лімфоцитам [10]. Імунна відповідь при АС представлена клітинними і гуморальними ланками відповіді. Клітинна відповідь при атерогенезі забезпечується Т-хелперами (CD4) і цитотоксичними Т-лімфоцитами (CD8), а гуморальна відповідь – В-клітинами (CD20), які продукують імуноглобуліни [2; 11; 12].

Т-лімфоцити хелпери (CD4, мембранна експресія) в ділянках формування атеросклеротичних уражень становили $11,18 \pm 1,76$ у групі з ішемічним інсультом (рис. 2) і $10,32 \pm 1,24$ в групі з геморагічним інсультом ($p > 0,05$). Т-лімфоцити супресори (CD8, мембранна експресія) становили відповідно $8,56 \pm 1,16$ і $9,12 \pm 1,64$ ($p > 0,05$).

У групі порівняння в стінці артерії експресія маркерів була відсутня, в окремих випадках спостерігалась у вигляді поодиноких клітин.

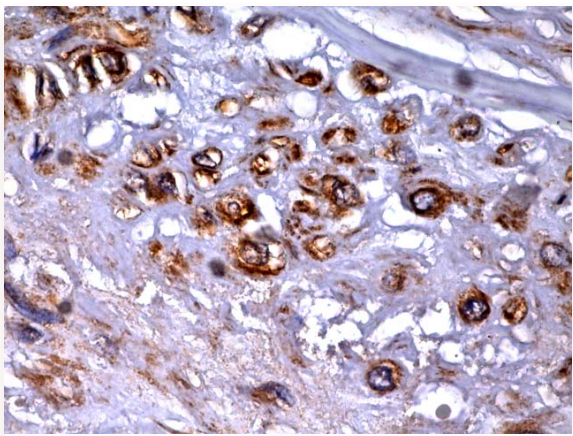


Рис. 2. Експресія маркеру CD4 в стінці артерії пацієнта з ішемічним інсультом. $\times 400$.

В-лімфоцити (експресія – оболонка, цитоплазма) були представлені в меншій кількості – $5,34 \pm 0,86$ в ділянці атеросклеротичного ураження при ішемічному інсульті і $6,04 \pm 1,14$ при геморагічному інсульті ($p > 0,05$) (рис. 3).

Отже, немає вірогідної різниці в інфільтрації судинної стінки імунокомпетентними клітинами за їхньою кількістю і характером в залежності від проявів ускладнення МС – ішемічного або геморагічного інсульту, що свідчить про те, що морфогенез змін визначається саме основним захворюванням.

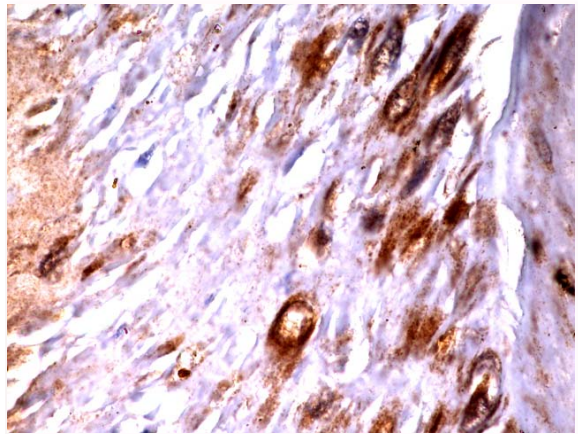


Рис. 3. Експресія маркеру CD20 в стінці артерії пацієнта з геморагічним інсультом. $\times 400$.

Лімфоцити і макрофаги в ділянках атеросклеротичних уражень артерій контактують між собою і продукують при цьому антигени активації [13]. Взаємодія в межах інтими відбувається як за рахунок безпосередніх міжклітинних контактів, так і молекулярних факторів, за участю яких вони обмінюються сигналами, що здійснюють пара- і аутокринну регуляцію, тобто складають молекулярну основу багатьох важливих процесів, включаючи запальну реакцію і імунну відповідь [14].

Підсумок

При атеросклеротичному ураженні артерій головного мозку при МС значну роль у морфогенезі змін судинної стінки з утворенням атеросклеротичної бляшки відіграють імунокомпетентні клітини – макрофаги і лімфоцити, про що свідчить їх накопичення в ділянках атеросклеротичного ураження артерій. Макрофаги у судинній стінці внаслідок накопичення ліпідів перетворюються у пінисті клітини, а лімфоцити за рахунок клітинної і гуморальної імунної відповіді потенціюють подальше формування атероматозної бляшки.

Перспективою досліджень у цьому напрямку є подальше вивчення механізмів імунних процесів у морфогенезі змін судинної стінки при МС.

Літературні джерела
References

1. Мычка В. Б. Метаболический синдром / В. Б. Мычка, И. Е. Чазова // Системные гипертензии. – 2009. – № 1. – С. 50-53.
Mychka VB, Chazova IE. [Metabolic syndrome]. *Sistemniye gipertenzii*. 2009; (1): 50-3. Russian.
2. Клеточные механизмы атеросклероза: врожденный иммунитет и воспаление / Ю. В. Бобрышев, В. Н. Карагодин, Ж. И. Ковалевская [и др.] // Фундаментальные науки и практика. – 2010. – Т. 1, № 4. – С. 140-148.
Bobryshev YuV, Karagodin VP, Kovalevskaya ZhI, Shapyrina YeV, Kargapolova YuM, Galaktionova DYu, Saliyev VI, Orekhov AN. [Cellular mechanisms of atherosclerosis: innate immunity and inflammation]. In: Ilyinskikh NN, editor. *Fundamentalniye nauki i praktika [Fundamental sciences and practice]: The proceedings of the 3rd International teleconference 'Problems and prospects of modern medicine, biology and ecology'; 2010 Oct-Nov].* Tomsk; 2010. Vol.1, No 4. p. 140-8. Russian.
3. Role of naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis / A. Mor, D. Planer, G. Luboshits [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* - 2007. - Vol. 27. - P. 893-900.
Mor A, Planer D, Luboshits G, Afek A, Metzger S, Chajek-Shaul T, Keren G, George J. Role of naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Apr;27(4):893-900. Epub 2007 Feb 1. Cited in: PubMed; PMID: 17272749.
4. Soliman A. Experimental models investigating the inflammatory basis of atherosclerosis / A. Soliman, P. Kee // *Curr. Atheroscler. Rep.* - 2008. - Vol. 10. - P. 260-271.
Soliman A, Kee P. Experimental models investigating the inflammatory basis of atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2008 Jun;10(3):260-71. Cited in: PubMed; PMID: 18489855.
5. Weber C. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: Lessons from mouse models / C. Weber, A. Zernecke, P. Libby // *Nat. Rev. Immunol.* - 2008. - Vol. 8. - P. 802-815.
Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol.* 2008 Oct;8(10):802-15. doi: 10.1038/nri2415. Cited in: PubMed; PMID: 18825131.
6. Yan Z. Q. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis / Z. Q. Yan, G. K. Hansson // *Immunol. Rev.* - 2007. Vol.219. - P. 187-203.
Yan ZQ, Hansson GK. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunol Rev.* 2007 Oct;219:187-203. Cited in: PubMed; PMID: 17850490.
7. Shibata N. Regulation of macrophage function in inflammation and atherosclerosis / N. Shibata, C.K. Glass // *J. Lipid Res.* - 2009. - Suppl. 50. - P. 277-281.
Shibata N, Glass CK. Regulation of macrophage function in inflammation and atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl:S277-81. doi: 10.1194/jlr.R800063-JLR200. Epub 2008 Nov 5. Cited in: PubMed; PMID: 18987388; PMCID: PMC2674700.
8. Gordon S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids / S. Gordon // *J. Clin. Invest.* - 2007. - Vol. 117. - P. 89-93.
Gordon S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):89-93. Cited in: PubMed; PMID: 17200712; PMCID: PMC1716225.
9. Mosser D. M. Exploring the full spectrum of macrophage activation / D. M. Mosser, J. P. Edwards // *Nat. Rev. Immunol.* - 2008. - Vol. 8. - P. 958-969.
Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008 Dec;8(12):958-69. doi: 10.1038/nri2448. Cited in: PubMed; PMID: 19029990; PMCID: PMC2724991.
10. Gotsman I. The influence of the regulatory T lymphocytes on atherosclerosis / I. Gotsman, R. Gupta, A. H. Lichtman // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* - 2007. - Vol. 27. - P. 2493-2495.
Gotsman I, Gupta R, Lichtman AH. The influence of the regulatory T lymphocytes on atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Dec;27(12):2493-5. Epub 2007 Sep 27. Cited in: PubMed; PMID: 17901372.
11. Mallat Z. Regulatory T-cell immunity in atherosclerosis / Z. Mallat, H. Ait-Oufella, A. Tedgui // *Trends Cardiovasc. Med.* - 2007. - Vol. 17. - P. 113-118.
Mallat Z, Ait-Oufella H, Tedgui A. Regulatory T-cell immunity in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2007 May;17(4):113-8. Cited in: PubMed; PMID: 17482092.
12. The complex role of T-cell-based immunity in atherosclerosis / P. Aukrust, K. Otterdal, A. Yndestad // *Curr. Atheroscler. Rep.* - 2008. - Vol. 10. - P. 236-243.
Aukrust P, Otterdal K, Yndestad A, Sandberg WJ, Smith C, Ueland T, Øie E, Damås JK, Gullestad L, Halvorsen B. The complex role of T-cell-based immunity in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2008 Jun;10(3):236-43. Cited in: PubMed; PMID: 18489852.
13. The role of adaptive T-cell immunity in atherosclerosis / Z. Mallat, S. Taleb, H. Ait-Oufella, A. Tedgui // *J. Lipid Res.* -2009. - Suppl. 50. - P. 364-369.
Mallat Z, Taleb S, Ait-Oufella H, Tedgui A. The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl:S364-9. doi: 10.1194/jlr.R800092-JLR200. Epub 2008 Dec 2. Cited in: PubMed; PMID: 19050311; PMCID: PMC2674704.
14. Hansson G. K. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword / G. K. Hansson, P. Libby // *Nat. Rev. Immunol.* - 2006. - Vol. 6. - P. 508-519.
Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2006 Jul;6(7):508-19. Epub 2006 Jun 16. Cited in: PubMed; PMID: 16778830.

Чуйко Н.Я. Роль макрофагов и лимфоцитов в морфогенезе изменений сосудов головного мозга при метаболическом синдроме, осложненном инсультом.

Реферат. Основным морфологическим субстратом поражения артерий при метаболическом синдроме является атеросклероз, морфогенез которого на сегодняшний день изучен недостаточно. Цель – изучить роль макрофагов и лимфоцитов в морфогенезе изменений артерий головного мозга у пациентов с метаболическим синдромом, осложненным ишемическим и геморрагическим инсультом. Исследованы сосуды головного мозга 30 умерших с ишемическими инсультами, 30 - с геморрагическими инсультами на фоне метаболического синдрома, и 20 умерших от причин, не связанных с цереброваскулярными заболеваниями (группа сравнения). Гистологические препараты сосудов окрашивали гематоксилином-эозином, а также проводили иммуногистохимическое исследование с использованием маркеров CD4, CD8, CD20 и CD 68. Количество CD68-позитивных клеток, в участках формирования атеросклеротических поражений составило в группе с ишемическим инсультом $16,68 \pm 1,82$, в группе с геморрагическим инсультом - $14,56 \pm 1,28$. Количество Т-лимфоцитов хелперов ($CD4^+$) в участках формирования атеросклеротических поражений составляли $11,18 \pm 1,76$ в группе с ишемическим инсультом и $10,32 \pm 1,24$ в группе с геморрагическим инсультом. Т-лимфоциты супрессоры ($CD8^+$) составили соответственно $8,56 \pm 1,16$ и $9,12 \pm 1,64$. В-лимфоциты ($CD20^+$) были представлены в меньшем количестве - $5,34 \pm 0,86$ при ишемическом инсульте и $6,04 \pm 1,14$ при геморрагическом инсульте. Наличие макрофагов, лимфоцитов хелперов и супрессоров в стенке артерий в очагах атеросклеротического поражения в группах с ишемическим и геморрагическим инсультом как осложнения метаболического синдрома свидетельствует об участии этих клеток в морфогенезе изменений артерий при метаболическом синдроме.

Ключевые слова: макрофаги, лимфоциты, атеросклероз, метаболический синдром.