

DOI 10.29254/2077-4214-2018-1-2-143-332-335

УДК 616.131–091.8–02–001.8–092.9

Сорокіна І. В., Калужина О. В., Плітень О. М.

**МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ МАКРОФАГІВ CD16
І ГЛАДКИХ МІОЦИТІВ ЛЕГЕНЕВОЇ АРТЕРІЇ ПЛОДІВ ТА НОВОНАРОДЖЕНИХ,
ЩО ЗАЗНАЛИ ВПЛИВУ ХРОНІЧНОЇ ВНУТРІШНЬОУТРОБНОЇ ГІПОКСІЇ**
Харківський національний медичний університет (м. Харків)

pliten@ukr.net

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дослідження є фрагментом науково-дослідницьких робіт: «Патоморфологічні особливості формування плода та новонародженого під впливом патології матері» (№ державної реєстрації 0110U001805, 2010-2014 рр.) та «Вплив материнсько-плодової інфекції на ембріогенез та фетогенез нащадків (клініко-морфологічне дослідження)» (№ державної реєстрації 0115U000987, 2015-2019 рр.) кафедри патологічної анатомії Харківського національного медичного університету.

Вступ. Гіпоксія плоду розвивається при різноманітних ускладненнях вагітності (анемія, прееклампсія), інфекційних та соматичних захворюваннях майбутньої матері, тютюнопалінні. За таких умов саме серцево-судинна система зазнає найбільших страждань [1,2,3].

У сучасній науковій літературі є відомості щодо впливу хронічної внутрішньоутробної гіпоксії (ХВГ) на морфологічний стан різних внутрішніх органів нащадків: гіпофізу [4], надниркових залоз [5], органів сечовидільної системи [6], серця [7], яєчок [8]. Марковський В.Д. та Зверева І.С. (2017) дослідили в експерименті морфологічний стан легеневої артерії (ЛА) у новонароджених, що перенесли гостру постнатальну гіпоксію [9].

Стосовно змін гладких міоцитів (ГМ) за умов впливу гіпоксії не існує єдиної точки зору. Є повідомлення про зниження їх проліферативної активності за таких умов [10,11]. Крім того, існують протилежні точки зору. Ряд авторів вважає, що в ЛА ГМ розмножуються при недостатній оксигенації [12,13,14]. Також необхідно зазначити, що тяжка киснева недостатність та аноксія є причинами зниження проліферативної активності гладком'язових клітин у вказаній судині [15]. При цьому майже відсутня інформація в доступній літературі про стан макрофагів CD16 у магистральних артеріальних судинах плодів та новонароджених за умов впливу внутрішньоутробної гіпоксії. Отже наше дослідження є актуальним.

Метою дослідження стало виявлення морфологічних особливостей макрофагів CD16 та гладких міоцитів (ГМ) легеневої артерії (ЛА) плодів та новонароджених від матерів з експериментальною хронічною

внутрішньоутробною гіпоксією (ХВГ) на підставі комплексного патоморфологічного дослідження.

Об'єкт і методи дослідження. В ході експериментального дослідження вагітних самок щурів лінії WAG піддавали висотному гіпоксичному впливу (7500 м над рівнем моря) щоденно 20 хв у один і той же час, починаючи з моменту реєстрації вагітності та до моменту розродження. Вагітних самок на 19-21-й дні вагітності та самок після розродження виводили з експерименту шляхом внутрішньовенного введення 2-2,5% розчину тіопенталу натрію (7-10 мг на 1 кг маси тіла) з подальшою декапітацією. Новонароджених щурів через одну добу після народження 2-3 хвилин піддавали інгаляції 80% концентрації CO₂ під ковпаком, далі – декапітації.

Весь матеріал було розділено на: групу контролю (К) – плоди й новонароджені від матерів з фізіологічним перебігом вагітності, та досліджувану групу (ХВГ) – плоди та новонароджені, які зазнали впливу ХВГ. Групу К склали 18 спостережень (7 плодів, 11 новонароджених), а групу ХВГ – 16 спостережень (6 плодів, 10 новонароджених).

Усі маніпуляції з тваринами, а також виведення їх з експерименту відповідали вимогам нормативних документів (Європейська конвенція по захисту хребетних тварин (Страсбург, 18.03.1986 р.), директива Ради Європейського економічного товариства по захисту хребетних тварин (Страсбург, 24.11.1986 р.), закон України «Про лікарські засоби», 1996 р., ст. 7, 8, 12, керівництво ICH GCP (2008 р.), GLP (2002 р.), відповідно до вимог та норм, типовим положенням з питань етики МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.).

Нами досліджувались макроскопічні характеристики ЛА (еластичність стінки, колір та наявність/відсутність змін інтими) за допомогою лупи (×3, 8 діоптрій). Для морфологічного дослідження з судини вирізали по одному шматочку зі стінки у надкльпанній ділянці. Далі їх фіксували в 10%-му розчині нейтрального формаліну, піддавали стандартній парафіновій проводці. З приготованих блоків робили серійні зрізи завтовшки 4-5×10⁻⁶ м на Мікротомі-кріостаті МК-25. Гістологічні й морфометричні дослідження проводили на мікроскопі Olympus BX-41 (Японія) з використанням програм Olympus DP-Soft

(Version 3:1) і Microsoft Excel 2010, а також люмінесцентному мікроскопі «Axioskop 40» (Carl Zeiss, ФРН). Застосовували гістологічні (забарвлення гематоксиліном і еозином), імуногістохімічні, морфометричні методи.

При мікроскопічному дослідженні описували будову ЛА, оцінювали такі морфометричні параметри: щільність розташування ГМ у стінці судини в полі зору ($\times 1000$), кількість клітин, що експресують рецептори CD16, у полі зору ($\times 600$). Імуногістохімічне дослідження проводили двома способами: непрямим методом Кунса в модифікації Brosman M. (1979) – для визначення розташування макрофагів у стінці судин МКАт до CD16 (Novocastra Laboratories Ltd, UK.), та непрямим стрептавідин-пероксидазним методом з використанням МКАт до *Anti-Human Smooth Muscle Actin* («ДАКО», Данія) для типування гладком'язових клітин. Кількісні та якісні показники експресії маркерів вивчали як мінімум на 8-10 випадково обраних полях зору мікроскопа гістологічних зрізів при збільшенні $\times 600$ та $\times 1000$. Отримані дані статистично обробляли на персональному комп'ютері за допомогою ліцензійного пакету прикладних програм «IBM SPSS Statistics» («IBM Corp.») та «Portable Statistica 8.0» («Statsoft, Inc»). Застосовували методи варіаційного, альтернативного і кореляційного аналізу. Статистичну значущість відмінностей порівнюваних ознак оцінювали шляхом обчислення t-критерію Стьюдента для груп з нормальним розподілом ознаки. Для малих вибірок застосовували непараметричний U-тест Манна-Уїтні. Відмінності вважалися статистично достовірними при рівні значущості $p < 0,05$, що відповідає 95% вірогідності безпомилкового прогнозу [16].

Результати досліджень та їх обговорення. При макроскопічному дослідженні за допомогою лупи ($\times 3$, 8 діоптрій) стінка ЛА в групі контролю була еластичною, мала гладеньку інтиму білувато-сіруватого кольору. Мікроскопічно при забарвленні гематоксиліном і еозином визначено всі три оболонки судини: внутрішню (*tunica intima*), середню (*tunica media*) та зовнішню (*tunica adventitia*). ГМ виявлялись дифузно рівномірно при забарвленні МКАт до *Monoclonal Anti-Human Smooth Muscle Actin* в підендотеліальному шарі, середній оболонці. Вони мали продовгувату форму, з помірною інтенсивністю експресували маркер у цитоплазмі. Щільність їх розташування в товщі стінки ЛА була $28,20 \pm 0,63$ клітини у полі зору ($\times 1000$). Окрім інтими та медії, ГМ ще розташовувалися в стінках судин адвентиції.

За допомогою маркера CD16 визначали кількість макрофагів у стінці судини, щільність їх розташування була $26,35 \pm 1,42$ клітин у полі зору ($\times 600$).

У групі ХВГ ЛА при макроскопічному дослідженні також була еластичною з гладенькою інтимою, білувато-сіруватого кольору. Виявлялись *tunica intima*, *tunica media* та *tunica adventitia* при забарвленні гематоксиліном і еозином. Виявлені при забарвленні МКАт до *Monoclonal Anti-Human Smooth Muscle Actin* гладком'язові клітини формували підендотеліальний шар, також знаходились у медіальній оболонці.

Щільність їх розташування в ЛА нащадків групи під впливом ХВГ склала $20,00 \pm 0,35$ клітини в полі зору ($\times 1000$). Хоча й вони рівномірно розподілялись у товщі стінки, але це було нижче від контрольних значень. ГМ мали продовгувату форму, з помірною експресією маркеру у цитоплазмі. Також досліджувані клітини визначались у стінках *vasa vasorum*. При дослідженні кількості макрофагів у стінці судини за допомогою маркера CD16 знайдено $29,45 \pm 0,84$ клітини в полі зору ($\times 600$).

Порівнюючи результати дослідження ЛА контрольної і групи плодів та новонароджених, які перенесли ХВГ, знайдено певні патоморфологічні відмінності.

Дослідження морфологічних особливостей гладком'язових клітин у стінці судин у лабораторних тварин виявило, що кількість ГМ в ЛА при впливі ХВГ достовірно зменшувалась ($p < 0,05$).

З нечисленних даних літератури відомо, що тяжка киснева недостатність, аноксія є причинами зниження проліферації ГМ у ЛА [15]. Гостра гіпоксія за даними різних авторів може мати різний вплив: як стимулювати проліферативну активність глаком'язових клітин, у тому числі й в ЛА [10,12], так і пригнічувати їх розмноження [11].

Вивчення кількості макрофагів у стінці судини за умов впливу хронічної кисневої недостатності встановило, що щільність розташування клітин CD16 у стінці судини мала тенденцію до збільшення в групі ХВГ порівняно з контролем ($p \geq 0,05$). Це на нашу думку може бути пов'язано з активацією їх проліферації за умов тривалої гіпоксії. В літературі є повідомлення щодо підвищення активності макрофагів за різних патологічних станів, наприклад, за умов гіпоксії, запаленні в тканинах [17,18]. Отже, отримані нами дані не суперечать існуючим та вказують на універсальність макрофагальної відповіді на гіпоксичне ураження.

Висновки. В результаті морфологічного дослідження ЛА у плодів і новонароджених за умов впливу експериментальної ХВГ встановлено достовірне зменшення щільності розташування гладком'язових клітин у полі зору, що неодмінно впливає на еластичні властивості судини. Кількість клітин CD16 у стінці ЛА за умов впливу тривалої кисневої недостатності має тенденцію до підвищення, що може вказувати на активацію макрофагальної системи за даного патологічного стану.

Перспективи подальших досліджень. Планується провести морфологічне дослідження гладких міоцитів та макрофагів CD16 в аорті у плодів та новонароджених з хронічною внутрішньоутробної гіпоксією, порівняти виявлені зміни між легеневою артерією та аортою.

Література

1. Galyant OI, Senkevich OA, Satsko LV, Kirsheva TYu. Poliorgannyye narusheniya u novorozhdennykh detey s gipoksicheski-ishemicheskimi porazheniyami mozga. Dalnevostochnyy meditsinskiy zhurnal. 2013;3:58-60. [in Russian].
2. Vinogradova IV, Krasnov MV. Postnatalnaya adaptatsiya serdechno-sosudistoy sistemy u novorozhdennykh s ekstremalno nizkoy massoy tela. Vestnik Chuvashskogo universiteta. 2010;3:63-9. [in Russian].
3. Mach M, Dubovický M, Navarová J, Brucknerová I, Ujházy E. Experimental modeling of hypoxia in pregnancy and early postnatal life. Interdiscip Toxicol. 2009 Mar;2(1):28-32. DOI: 10.2478/v10102-009-0005-3
4. Kihatenko EV. Osobennosti embriogeneza adrenokortikotropitsitov adenogipofiza ploda v usloviyah hronicheskoy vnutriutrobnoy gipoksii. Ukrayinskiy medichniy almanah. 2009;1(1):34-6. [in Russian].
5. Andreev AV, Gubina-Vakulik GI. Perinatalnaya gipoksiya kak prichina patologicheskikh izmeneniy nadpochechnikov plodov i novorozhdennykh. Mezhdunarodniy meditsinskiy zhurnal. 2013;3:65-9. [in Russian].
6. Miroshnichenko MS, Markovskiy VD, Sorokina IV. Vliyaniye hronicheskoy vnutriutrobnoy gipoksii na morfofunktsionalnyie osobennosti organov mochevyidelitel'noy sistemyi plodov i novorozhdennykh. Morfolohiia. 2013;VII(2):57-60. [in Russian].
7. Mekenbaeva RT. Klinicheskie i morfologicheskie izmeneniya v miokarde u umershih novorozhdennykh, perenesshih perinatalnuyu gipoksiyu. Clinical medicine of Kazakhstan. 2013;3(29):11-5. [in Russian].
8. Palatova TV, Medvedeva AV, Voronina ES, Tsmokalyuk EN, Vorontsova SA, Pahomiy SS, i dr. Morfologicheskie osobennosti yaichek ploda pri hronicheskoy vnutriutrobnoy gipoksii na raznykh srokah gestatsii. Byulleten meditsinskih Internet-konferentsiy. 2017;7(2):560-2. [in Russian].
9. Markovskiy VD, Zvereva IS. Morfologicheskie osobennosti aortyi i legochnoy arterii u novorozhdennykh, perenesshih ostruyu postnatalnuyu gipoksiyu v eksperimente. Morfolohiia. 2017;11(1):33-6. [in Russian].
10. Lanner MC, Raper M, Pratt WM, Rhoades RA. Heterogenic G proteins and platelet-derived growth factor receptor – contribute to hypoxic proliferation of smooth muscle cells. AJRCMB. 2005 Jan 05;33:412-9.
11. Stiebellehner L, Frid M, Reeves J, Low RB, Gnanasekharan M, Stenmark KR. Bovine distal pulmonary arterial media is composed of a uniform population of well-differentiated smooth muscle cells with low proliferative capabilities. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003 Oct;285(4):L819-28. Epub 2003 Jul 11.
12. Preston IR, Hill NS, Warburton RR, Fanburg BL. The role of 12-lipoxygenase in hypoxia-induced rat pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2006 Feb;290(2):L367-74. Epub 2005 Sep 30.
13. Yun X, Jiang H, Shimoda LA. Hypoxia-induced proliferation and migration in pulmonary arterial smooth muscle cells requires β -catenin. The FASEB Journal. 2017;31;1. Available from: http://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.31.1_supplement.1016.16
14. Kim D, Park C-S. Effects of Hypoxia on Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation via Muscular Nitric Oxide Synthases and Neucleophosmin1. Free Radical Biology and Medicine. 2016 Nov;100:144. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.379>
15. Eddahibi S, Fabre V, Boni C, Martres MP, Raffestin B, Hamon M, et al. Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle cells relationship with the mitogenic action of serotonin. Circ Res. 1999 Feb 19;84(3):329-36.
16. Voronenko YuV, Moskalenko VF, redaktery. Sotsialna medytsyna ta orhanizatsiia okhorony zdorovia: pidruchnyk dlia studentiv vyshchychk navchalnykh zakladiv. Ternopil: Ukrmedknyha; 2000. 680 s. [in Ukrainian].
17. Egners A, Erdem M, Cramer T. The Response of Macrophages and Neutrophils to Hypoxia in the Context of Cancer and Other Inflammatory Diseases. Mediators of Inflammation. 2016. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2053646>
18. Riboldi E, Porta C, Morlacchi S, Viola A, Mantovani A, Sica A. Hypoxia-mediated regulation of macrophage functions in pathophysiology. Int Immunol. 2013 Feb;25(2):67-75. DOI: 10.1093/intimm/dxs110. Epub 2012 Nov 24.

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ МАКРОФАГІВ CD16 І ГЛАДКИХ МІОЦИТІВ ЛЕГЕНЕВОЇ АРТЕРІЇ ПЛОДІВ ТА НОВОНАРОДЖЕНИХ, ЩО ЗАЗНАЛИ ВПЛИВУ ХРОНІЧНОЇ ВНУТРІШНЬОУТРОБНОЇ ГІПОКСІЇ

Сорокіна І. В., Калужина О. В., Плітень О. М.

Резюме. У статті наведені дані щодо особливостей морфології макрофагів CD16 і гладких міоцитів (ГМ) у легеневій артерії (ЛА) плодів та новонароджених під впливом експериментальної хронічної внутрішньоутробної гіпоксії (ХВГ). Дослідження проводили на лабораторних щурах лінії WAG. Весь матеріал був розділений на групу контролю (18 випадків) та групу нащадків, що зазнали впливу хронічної кисневої недостатності (16 випадків). Морфологічна обробка включала макроскопічні, гістологічні (забарвлення гематоксиліном і еозином), імуногістохімічні (дослідження макрофагів CD16 та гладких міоцитів) методи, з подальшою статистичною обробкою отриманих даних. У результаті проведеного дослідження встановлено, що в ЛА у плодів та новонароджених за умов впливу експериментальної ХВГ спостерігається достовірне зменшення щільності розташування гладком'язових клітин у полі зору, що неодмінно впливає на еластичні властивості судини. Кількість клітин CD16 у стінці ЛА за умов впливу тривалої кисневої недостатності має тенденцію до підвищення, що може вказувати на активацію макрофагальної системи за даного патологічного стану.

Ключові слова: хронічна внутрішньоутробна гіпоксія, легенева артерія, макрофаги CD16, гладкі міоцити, експеримент.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МАКРОФАГОВ CD16 И ГЛАДКИХ МИОЦИТОВ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ ПЛОДОВ И НОВОРОЖДЕННЫХ, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ХРОНИЧЕСКОЙ ВНУТРИУТРОБНОЙ ГИПОКСИИ

Сорокина И. В., Калужина О. В., Плитень О. Н.

Резюме. В статье приведены данные об особенностях морфологии макрофагов CD16 и гладких миоцитов (ГМ) в легочной артерии (ЛА) плодов и новорожденных под влиянием экспериментальной хронической внутриутробной гипоксии (ХВГ). Исследование проводили на лабораторных крысах линии WAG. Весь материал был разделен на группу контроля (18 случаев) и группу потомков, подвергшихся воздействию хронической кислородной недостаточности (16 случаев). Морфологическая обработка включала макроскопические,

гистологические (окраска гематоксилином и эозином), иммуногистохимические (исследование макрофагов CD16 и гладких миоцитов) методы, с последующей статистической обработкой полученных данных. В результате проведенного исследования установлено, что в ЛА у плодов и новорожденных в условиях воздействия экспериментальной ХВГ наблюдается достоверное уменьшение плотности расположения гладкомышечных клеток в поле зрения, что непременно влияет на эластические свойства сосуда. Количество клеток CD16 в стенке ЛА в условиях воздействия длительной кислородной недостаточности имеет тенденцию к повышению, что может указывать на активацию макрофагальной системы при данном патологическом состоянии.

Ключевые слова: хроническая внутриутробная гипоксия, легочная артерия, макрофаги CD16, гладкие миоциты, эксперимент.

MORPHOLOGICAL FEATURES OF MACROFAGES CD16 AND SMOOTH MYOCYTES OF PULMONARY ARTERY OF FETUSES AND NEWBORNS UNDER THE CHRONIC INTRAUTERINE HYPOXIA INFLUENCE

Sorokina I. V., Kaluzhyna O. V., Pliten O. M.

Abstract. Hypoxia complicates various complications of pregnancy, somatic and infectious diseases of the mother, her harmful habits. The cardiovascular system is one of the most vulnerable under such conditions.

The aim of the study was to detect morphological features of CD16 macrophages and smooth myocytes (SMC) of the pulmonary artery (PA) of fetuses and newborns from mothers with experimental chronic intrauterine hypoxia (CIH) on the basis of a complex pathomorphological study.

The study was conducted on laboratory WAG line rats. All material was divided into a control group (18 cases), and a group of offspring who suffered from chronic oxygen deficiency (16 cases). Morphological investigation included macroscopic, histologic (hematoxylin and eosin staining), immunohistochemical (study of macrophages CD16 and smooth myocytes) methods, followed by statistical processing of the received data.

Macroscopic study using a magnifier ($\times 3$, 8 diopters) of both groups PA demonstrated its wall elasticity, smooth intima with whitish-grayish color. Microscopically, with hematoxylin and eosin staining all three layers of the vessel are determined: the inner (tunica intima), medium (tunica media) and external (tunica adventitia). The smooth muscle cells were observed diffuse evenly with MCA to Monoclonal Anti-Human Smooth Muscle Actin in the sub-endothelial layer, the medium layer. They had oblong shape, with moderate intensity expressed cytoplasm marker. The density of their location in wall thickness of the control group PA was 28.20 ± 0.63 cells in the field of view ($\times 1000$). The density of SMC location in wall thickness of the CIH group PA was 20.00 ± 0.35 cells in the field of view ($\times 1000$). In addition to intima and medium layers, SMC were still located in the adventitious vessels walls. The number of macrophages CD16 in the investigated vessel wall of control group was determined; their placement density was 26.35 ± 1.42 cells in the field of view ($\times 600$). The placement density of macrophages CD16 in the investigated vessel wall of group with prolonged oxygen deficiency was 29.45 ± 0.84 cells in the field of view ($\times 600$).

Morphological features investigation of SMC in the vascular wall of laboratory animals revealed that the number of PA smooth myocytes under the CIH influence significantly decreased ($p < 0.05$). From a few literature data, it is known that severe oxygen deficiency, anoxia are the causes of proliferation reduction of PA SMC. Acute hypoxia according to various authors view may have different effects: SMC proliferative activity stimulation including PA, and their reproduction inhibition.

The study of the number of macrophages in the vessel wall under the influence of chronic oxygen deficiency found that the density of CD16 cells location in the vessel wall tended to increase in the CIH group compared with the control one ($p \geq 0.05$). This fact, in our opinion, may be due to their proliferation activation in conditions with prolonged hypoxia. In the literature, there are reports about increased macrophages activity in various pathological conditions, for example, under hypoxia, inflammation in tissues. Therefore, our data do not contradict the existing ones and indicate the universality of the macrophage response to the hypoxic influence.

As a result of the study, it was found that in the PA wall of the fetuses and newborns, under the influence of experimental CIH, there is a significant density decrease of the smooth muscle cells placement in the field of view, which definitely affects the vessel elastic properties. The number of CD16 cells in the investigated vessel wall under the prolonged oxygen deficiency influence tends to increase, which may indicate the activation of the macrophage system for this pathological condition.

Key words: chronic intrauterine hypoxia, pulmonary artery, CD16 macrophages, smooth myocytes, experiment.

Рецензент — проф. Старченко І. І.

Стаття надійшла 30.03.2018 року