

Stroke

American Stroke
AssociationSM

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

A Division of American
Heart Association



Critical Roles of Macrophages in the Formation of Intracranial Aneurysm
Yasuhisa Kanematsu, Miyuki Kanematsu, Chie Kurihara, Yoshiteru Tada, Tsung-Ling Tsou, Nico van Rooijen, Michael T. Lawton, William L. Young, Elena I. Liang, Yoshitsugu Nuki and Tomoki Hashimoto

Stroke 2011, 42:173-178: originally published online November 24, 2010

doi: 10.1161/STROKEAHA.110.590976

Stroke is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214
Copyright © 2010 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0039-2499. Online
ISSN: 1524-4628

The online version of this article, along with updated information and services, is
located on the World Wide Web at:

<http://stroke.ahajournals.org/content/42/1/173>

Data Supplement (unedited) at:

<http://stroke.ahajournals.org/content/suppl/2010/11/30/STROKEAHA.110.590976.DC1.html>

<http://stroke.ahajournals.org/content/suppl/2012/02/26/STROKEAHA.110.590976.DC2.html>

<http://stroke.ahajournals.org/content/suppl/2012/02/26/STROKEAHA.110.590976.DC3.html>

Subscriptions: Information about subscribing to *Stroke* is online at
<http://stroke.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters
Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax:
410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

Critical Roles of Macrophages in the Formation of Intracranial Aneurysm

Yasuhisa Kanematsu, MD, PhD; Miyuki Kanematsu, MD; Chie Kurihara, BS; Yoshiteru Tada, MD, PhD; Tsung-Ling Tsou, BS; Nico van Rooijen, PhD; Michael T. Lawton, MD; William L. Young, MD; Elena I. Liang, BS; Yoshitsugu Nuki, MD, PhD; Tomoki Hashimoto, MD

Background and Purpose—Abnormal vascular remodeling triggered by hemodynamic stresses and inflammation is believed to be a key process in the pathophysiology of intracranial aneurysms. Numerous studies have shown infiltration of inflammatory cells, especially macrophages, into intracranial aneurysmal walls in humans. Using a mouse model of intracranial aneurysms, we tested whether macrophages play critical roles in the formation of intracranial aneurysms.

Methods—Intracranial aneurysms were induced in adult male mice using a combination of a single injection of elastase into the cerebrospinal fluid and angiotensin II-induced hypertension. Aneurysm formation was assessed 3 weeks later. Roles of macrophages were assessed using clodronate liposome-induced macrophage depletion. In addition, the incidence of aneurysms was assessed in mice lacking monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) and mice lacking matrix metalloproteinase-12 (macrophage elastase).

Results—Intracranial aneurysms in this model showed leukocyte infiltration into the aneurysmal wall, the majority of the leukocytes being macrophages. Mice with macrophage depletion had a significantly reduced incidence of aneurysms compared with control mice (1 of 10 versus 6 of 10; $P < 0.05$). Similarly, there was a reduced incidence of aneurysms in mice lacking monocyte chemoattractant protein-1 compared with the incidence of aneurysms in wild-type mice (2 of 10 versus 14 of 20, $P < 0.05$). There was no difference in the incidence of aneurysms between mice lacking matrix metalloproteinase-12 and wild-type mice.

Conclusions—These data suggest critical roles of macrophages and proper macrophage functions in the formation of intracranial aneurysms in this model. (*Stroke*. 2011;42:173-178.)

Key Words: animal model ■ inflammation ■ intracranial aneurysm ■ macrophage ■ stroke

Potential roles of inflammation in the pathophysiology of intracranial aneurysms—both ruptured and unruptured—have been suggested by observational and genetic studies.^{1–6} Macrophage infiltration has been well documented in both ruptured and unruptured intracranial aneurysms in humans.^{2,3,7} A higher degree of inflammation in aneurysms seems to be associated with aneurysmal wall destruction and rupture.^{3,7}

We have recently showed that macrophages and macrophage-derived cytokines are critical for hemodynamically induced outward vascular remodeling.^{8,9} Vascular remodeling coupled with inflammation is considered a key part in the pathophysiology of intracranial aneurysms.^{4,10} Sustained vascular remodeling may lead to aneurysmal growth and rupture.^{1,11} By mediating inflammation and hemodynamically induced vascular remodeling, macrophages may play critical

roles in the development, growth, and rupture of intracranial aneurysms.

In this study, we examined whether macrophages are critical for the formation of intracranial aneurysms using a mouse model of intracranial aneurysms that replicates key features of human intracranial aneurysms. First, we assessed the effects of macrophage depletion by clodronate liposome on the formation of aneurysms. Second, aneurysm formation was assessed in mice lacking monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1, CCL2). MCP-1 is a chemotactic factor that is critical for proper macrophage functions. MCP-1 knockout mice have reduced macrophage/monocyte counts and impaired macrophage functions. Therefore, they have been used as a genetic equivalent of mice with pharmacological depletion of macrophages and monocytes in various physiological and pathological settings.^{12,13}

Received May 20, 2010; final revision received August 23, 2010; accepted September 13, 2010.

From the Departments of Anesthesia and Perioperative Care (Y.K., M.K., C.K., Y.T., T.-L.T., W.L.Y., E.I.L., Y.N., T.H.), Neurology (W.L.Y.), and Neurological Surgery (M.T.L., W.L.Y.), and the Center for Cerebrovascular Research (Y.K., M.K., C.K., Y.T., T.-L.T., M.T.L., W.L.Y., E.I.L., Y.N., T.H.), University of California, San Francisco, Calif; the Departments of Neurosurgery (Y.K., Y.T.) and Thoracic, Endocrine Surgery and Oncology (M.K.), Institute of Health Biosciences, University of Tokushima, Tokushima, Japan; and the Department of Molecular Cell Biology (N.v.R.), Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands.

The online-only Data Supplement is available at <http://stroke.ahajournals.org/cgi/content/full/STROKEAHA.110.590976/DC1>.

Correspondence to Tomoki Hashimoto, MD, Department of Anesthesia and Perioperative Care, University of California, San Francisco, 1001 Potrero Avenue, No. 3C-38, San Francisco, CA 94110. E-mail hashimoto@anesthesia.ucsf.edu

© 2010 American Heart Association, Inc.

Stroke is available at <http://stroke.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.590976

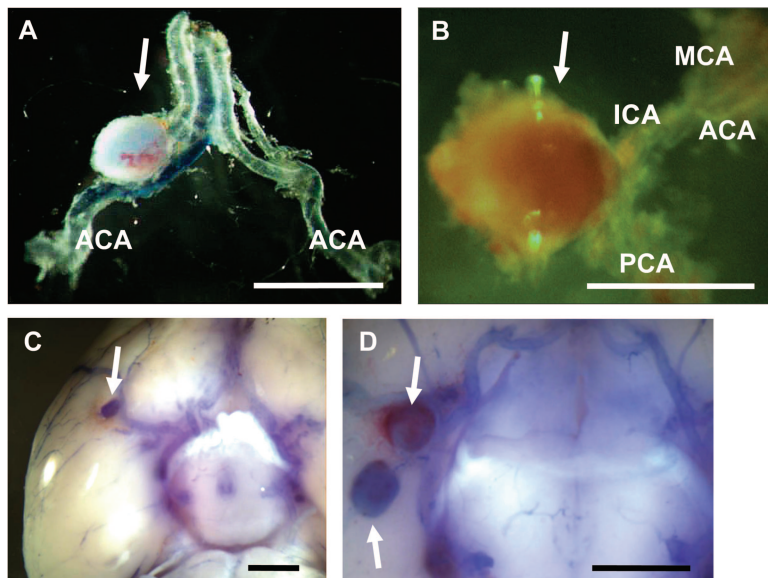


Figure 1. Representative intracranial aneurysms in hypertensive mice that received a single injection of elastase into the cerebrospinal fluid. Arrows indicate aneurysms. Large aneurysm formation was found along the circle of Willis and its major branches (A–D). Dissection of aneurysms revealed the saccular shape of the aneurysms (A–B). Some of the mice had multiple aneurysms (D). Bar=1 mm. ACA indicates anterior cerebral artery; MCA, middle cerebral artery; PCA, posterior cerebral artery; ICA, internal carotid artery.

Materials and Methods

Experiments were conducted in accordance with the guidelines approved by the University of California, San Francisco, Institutional Animal Care and Use Committee.

We used the elastase-induced intracranial aneurysms in 8- to 9-week-old hypertensive mice as previously described.¹¹ In this model, two well-known clinical factors associated with human intracranial aneurysms—hypertension and the disruption of elastic lamina—were combined to induce intracranial aneurysm formation in mice. We performed a single stereotaxic injection of elastase into the cerebrospinal fluid at the right basal cistern. A volume of 2.5 μ L elastase solution (17 mU) was injected at a rate of 0.2 μ L/min (Ultramicropump; World Precision Instruments). Hypertension was induced by a continuous subcutaneous infusion of angiotensin II at 1000 ng/kg/min for 3 weeks through an implanted osmotic pump (Alzet pump; Durect).^{11,14}

Systolic blood pressure was measured in mice before treatment, 1 week after elastase injection, and 2 weeks after elastase injection using the tail cuff method. After 3 weeks, we euthanized the mice and perfused the animals with bromophenol blue dye. Two blinded observers assessed the formation of intracranial aneurysms by examining the circle of Willis and its major branches under a dissecting microscope (10 \times). Intracranial aneurysms were operationally defined as a localized outward bulging of the vascular wall in the circle of Willis or in its major primary branches, as previously described.^{10,11} After inspecting the circle of Willis, the whole brain samples were frozen for immunohistochemical staining.

Macrophage Depletion

Macrophage depletion was achieved by an intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate (clodronate liposome).¹⁵ We used 8- to 9-week-old male C57BL/6J mice (n=10 in each group). Clodronate was a gift from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany). Animals received clodronate liposome intravenously 2 days before elastase and angiotensin II treatment. This regimen was reported to cause a reduction of macrophages to <10% of the baseline count.^{9,16} Animals in the control group received the same volume of phosphate-buffered saline-containing liposome (PBS liposome). We assessed the efficiency of macrophage depletion by examining macrophages in the spleen using immunohistochemistry, as previously described.^{9,16}

Incidence of Aneurysms in MCP-1 Knockout Mice and Matrix Metalloproteinase-12 Knockout Mice

In addition, the incidence of aneurysms was assessed in MCP-1 knockout mice and matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) knock-

out mice (n=10). Wild-type mice with the same background (both C57BL/6J) were used as control mice (n=20).

Immunohistochemical Analysis

Details of immunohistochemical analysis are described in the Supplemental Data (available at <http://stroke.ahajournals.org>).

Statistical Analysis

All results were expressed as mean \pm SD. Differences between multiple groups were analyzed by 1-way analysis of variance followed by the Tukey-Kramer post hoc test. Fisher exact test was used to analyze the incidence of aneurysms. Statistical significance was taken at $P<0.05$.

Results

Presence of Macrophages in Experimental Intracranial Aneurysm

Figure 1 shows representative intracranial aneurysms in hypertensive mice that received a single injection of elastase into the cerebrospinal fluid. Large saccular aneurysm formation was found along the circle of Willis or its major branches, which is consistent with our previous study (Figure 1A–D).¹¹ Most aneurysms were >250 μ m in diameter, approximately 2 to 5 times larger than their parent arteries, as we previously reported (Figure 1A–D). Some mice had multiple aneurysms (Figure 1D).

A cerebral artery from the sham operation group revealed an endothelial cell lining with a thin layer of smooth muscle cells, as previously described (Figure 2A).¹¹ In contrast, intracranial aneurysms had a partially thickened vascular wall with inflammatory cell infiltration (Figure 2B). Endothelial cell layers seemed to be generally intact, but smooth muscle cell layers had thickened in the area with intense inflammatory cell infiltration.

Pan-leukocyte staining using anti-CD45 antibody and macrophage staining using anti-CD68 antibody in the cerebral artery from the sham operation group showed a lack of inflammatory cells and macrophage infiltration (Figures 2C and 2E). In intracranial aneurysms, numerous leukocytes (CD45-positive cells) were detected in the adventitia and

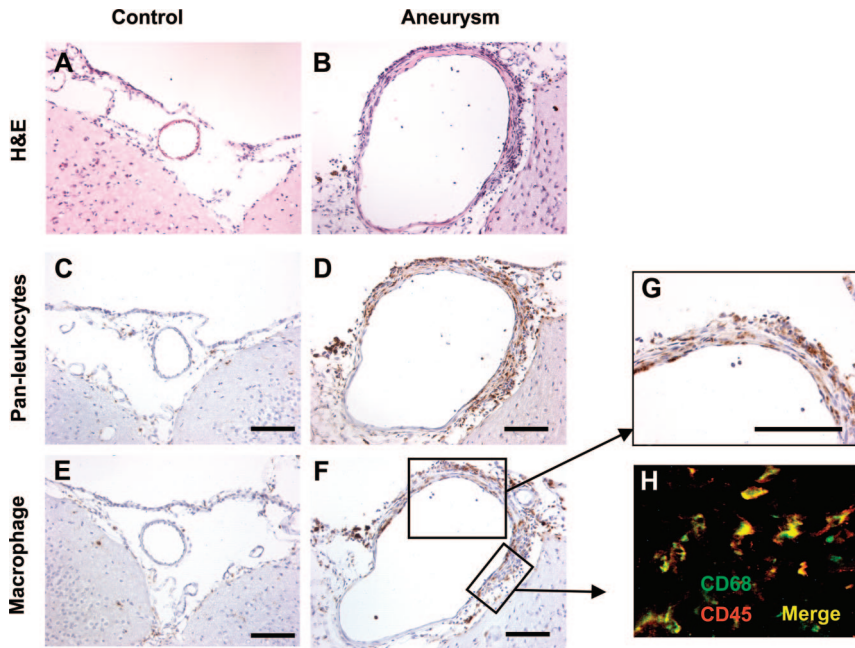


Figure 2. Hematoxylin and eosin, pan-leukocyte, and macrophage staining. A, Cerebral artery from a mouse in the sham operation group showed an endothelial cell lining with a thin layer of smooth muscle cells. B, Intracranial aneurysms had a partially thickened vascular wall with inflammatory cell infiltration. Endothelial cell layers seemed to be generally intact, but smooth muscle cell layers had thickened in the area with intense inflammatory cell infiltration. C, E, Cerebral artery from a mouse in the sham operation group showed a lack of inflammatory cells. D, G, Intracranial aneurysms had numerous leukocytes. Distribution of macrophages was similar to that of leukocytes. F, Double staining with anti-CD68 and anti-CD45 revealed that a majority of leukocytes in intracranial aneurysms in this model were macrophages.

media of the aneurysmal wall (Figure 2D), especially in the thickened part of aneurysmal wall, which is generally consistent with observations in human intracranial aneurysms.^{2,3,7} Macrophage staining showed macrophage infiltration into the aneurysmal wall with a distribution similar to that of leukocytes (Figure 2F–G). Double staining with anti-CD68 and anti-CD45 revealed that the majority of leukocytes in intracranial aneurysms in this model were macrophages (Figure 2H).

Effects of Macrophage Depletion on Intracranial Aneurysm Formation

Ten mice underwent macrophage depletion treatment with clodronate liposome 2 days before the induction of intracranial aneurysms, and another 10 mice received PBS liposome. All 20 mice received a single stereotaxic injection of elastase into the cerebrospinal fluid to disrupt the elastic lamina and a continuous infusion of angiotensin II to induce hypertension.

When we examined the mice 3 weeks after aneurysm induction, mice that received macrophage depletion treatment using clodronate liposome had a reduced incidence of intracranial aneurysms compared with mice that received PBS liposome (mice with intact macrophages; 1 of 10 versus 6 of 10; 10% versus 60%, $P < 0.05$; Figure 3A), indicating a critical role of macrophages in the formation of intracranial aneurysms in this model.

Although there were abundant macrophages in the intracranial aneurysms from a PBS liposome-treated mouse (Figure 3D–E), middle cerebral arteries from mice in either the sham operation group (Figure 3B–C) or the macrophage depletion group (Figure 3F–G) did not show macrophage infiltration into the vascular wall.

Quantification of macrophages ($n = 5$ in each group) showed that the number of macrophages was higher in the

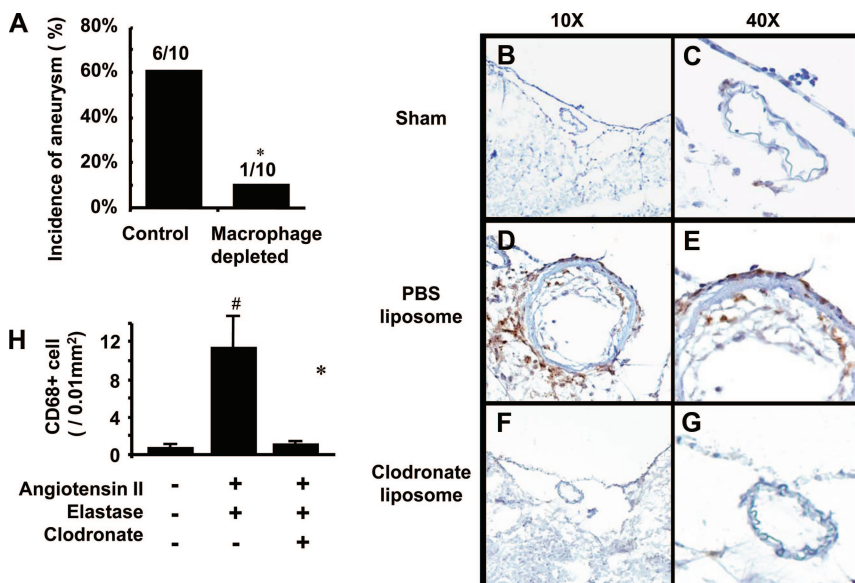


Figure 3. Macrophage depletion and intracranial aneurysm formation. A, Mice with macrophage depletion treatment using clodronate liposome had a reduced incidence of intracranial aneurysms compared with mice that received PBS liposome ($P < 0.05$). B–G, Whereas there was an abundant number of macrophages in the intracranial aneurysms from PBS liposome-treated mice, middle cerebral arteries from mice in either the sham operation group or the macrophage depletion group did not show macrophage infiltration into the vascular wall. H, The number of macrophages was higher in mice treated with elastase, angiotensin II, and PBS liposome compared with mice in the sham group or macrophage depletion group ($n = 5$ in each group, $P < 0.05$).

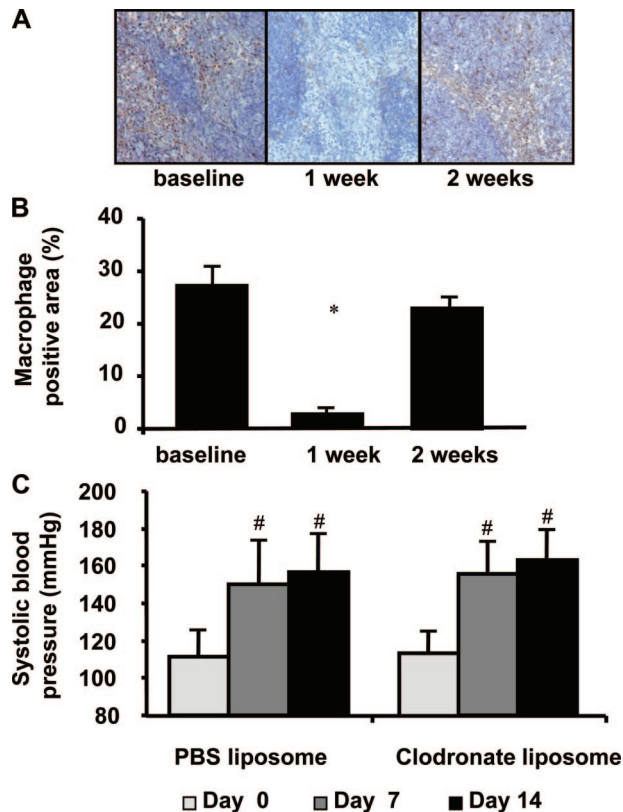


Figure 4. A, Macrophage staining of the spleen from mice that received clodronate liposome. Brown area indicates the macrophage-positive area. B, Clodronate liposome treatment decreased the CD68-positive area in the spleen by 88% from baseline ($P < 0.05$), showing effective macrophage/monocyte reduction by the clodronate treatment. At 2 weeks, the CD68-positive area returned to baseline. C, Successful induction of hypertension by angiotensin II.

mice treated with elastase, angiotensin II, and PBS liposome compared with mice in the sham group or macrophage depletion group (0.5 ± 0.3 versus 11.1 ± 3.3 , $P < 0.05$; 0.5 ± 0.3 versus 1.0 ± 0.3 , $P < 0.05$; Figure 3H).

Immunohistochemical staining for CD68-positive cells (monocyte/macrophage) in the spleen ($n = 5$ at each time point) was used to assess the efficiency and time course of

clodronate liposome treatment as previously described (Figure 4A–B).^{9,16} Treatment with clodronate liposome decreased the CD68-positive area in the spleen by 88% from the baseline (28.8 ± 4.1 versus $3.2 \pm 1.0\%$, $P < 0.05$), showing an effective macrophage/monocyte reduction by the clodronate treatment. At 2 weeks, the CD68-positive area returned to baseline (28.8 ± 4.1 versus $23.1 \pm 2.6\%$).

Angiotensin II treatment caused hypertension in both groups. After 1 week and 2 weeks, systolic blood pressure was higher than the baseline. Macrophage depletion treatment did not affect systolic blood pressure (Figure 4C).

Reduced Incidence of Intracranial Aneurysm in MCP-1 Knockout Mice

Because MCP-1 knockout mice have reduced monocyte/macrophage counts and impaired macrophage functions,¹⁷ we used MCP-1 knockout mice to further test the critical role of macrophages in the formation of intracranial aneurysms. Twenty wild-type mice and ten MCP-1 knockout mice underwent intracranial aneurysm induction.

MCP-1 knockout mice had a lower incidence of aneurysms compared with wild-type mice (2 of 10 versus 14 of 20; 20% versus 70%, $P < 0.05$; Figure 5A). Immunohistochemical staining of cerebral arteries for macrophages showed a lack of macrophage infiltration in MCP-1 knockout mice (Figure 5B). Quantification of macrophages in the middle cerebral artery ($n = 5$ in each group) showed reduced macrophage infiltration to the middle cerebral artery in MCP-1 knockout mice compared with macrophage infiltration in wild-type mice (2.8 ± 1.4 versus 10.9 ± 0.8 , $P < 0.05$; Figure 5E).

Macrophages produce MMPs that are critical for vascular remodeling.^{8,9} Previously, we have shown there is high activity of MMPs in intracranial aneurysms using this model.¹¹ The MMP inhibitor, doxycycline, significantly reduced the incidence of intracranial aneurysms.¹¹ MMP-9 knockout mice, but not MMP-2 knockout mice, had a reduced incidence of intracranial aneurysms.¹¹ Whereas MMP-9 is the main gelatinase produced by macrophages, MMP-12 represents the major elastase from macrophages. MMP-12 could be the proteinase responsible for facilitating structural changes of elastic lamina, resulting in physiological and

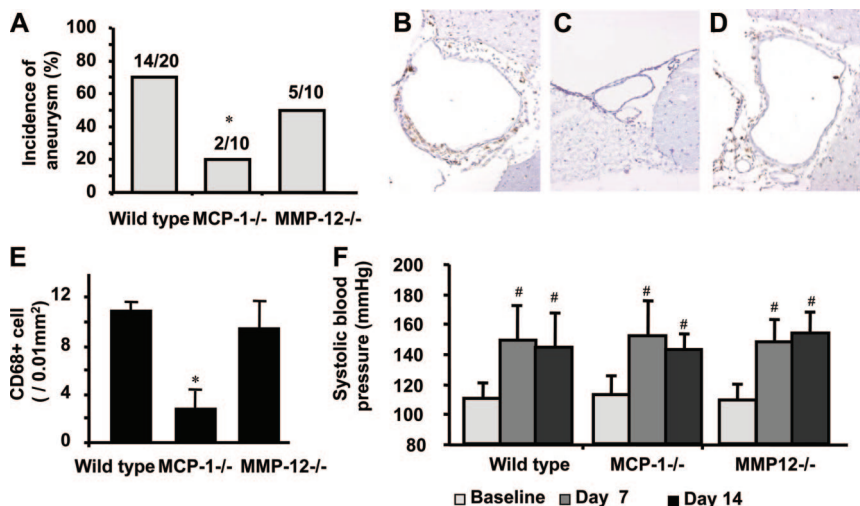


Figure 5. A, MCP-1 knockout mice had a lower incidence of aneurysms compared with wild-type mice ($P < 0.05$). There was no difference in the incidence of intracranial aneurysms between MMP-12 knockout mice and wild-type mice. B–D, Whereas macrophage infiltration was observed in the cerebral arteries of wild-type mice (B) and MMP-12 knockout mice (D), cerebral arteries in MCP-1 knockout mice showed a lack of macrophage infiltration (C). F, Successful induction of hypertension by angiotensin II.

pathological vascular remodeling.¹⁸ Therefore, we investigated the roles of MMP-12 in the formation of intracranial aneurysms. However, there was no difference in the incidence of intracranial aneurysms between MMP-12 knockout mice and wild-type mice (50% versus 70%). Moreover, immunohistochemical staining for macrophages (CD68-positive cells) showed a similar number of macrophages that accumulated in MMP-12 knockout mice compared with the number of macrophages in wild-type mice (9.4 ± 2.3 versus 10.9 ± 0.8 ; Figure 5E).

Continuous infusion of angiotensin II increased systolic blood pressure from the baseline after 1 week and 2 weeks in MCP-1 knockout mice and MMP-12 knockout mice. There was no significant difference between wild-type mice and MCP-1 or MMP-12 knockout mice at 1 week and 2 weeks (Figure 5F).

Discussion

In this study, we have shown the critical roles of macrophages in the formation of intracranial aneurysms in mice. We used a recently developed intracranial aneurysm model in which intracranial aneurysms were induced by a combination of single stereotaxic injection of elastase into the cerebrospinal fluid and pharmacologically induced hypertension in mice. Intracranial aneurysms in this mouse model closely resemble histological changes that are observed in human intracranial aneurysms.¹¹ Using this model, we first showed infiltration of inflammatory cells, mostly macrophages, into the aneurysmal wall. Second, mice with pharmacological depletion of macrophages had a significantly reduced incidence of intracranial aneurysms compared with mice with intact macrophages. In addition, MCP-1 knockout mice, mice with reduced monocyte/macrophage counts and impaired macrophage function, had a significantly reduced incidence of intracranial aneurysms compared with wild-type mice. These findings strongly indicate that macrophages play critical roles in the formation of intracranial aneurysms in this model, especially during the early stages of aneurysmal formation and growth.

Intracranial aneurysms are commonly found in locations where abnormal hemodynamic stresses are exerted on the vascular wall.¹⁹ Abnormal hemodynamic stresses trigger an inflammatory process by activating endothelial cells and monocytes/macrophages. These cells secrete proteinases, including MMPs and elastases.¹ MMPs can destabilize the vascular wall directly by facilitating vascular remodeling by digestion of the vascular matrix and indirectly by activating and releasing of other proteinases and angiogenic factors.²⁰ We have previously shown critical roles of macrophages and MMPs in adaptive vascular remodeling of large arteries.⁹ Intracranial aneurysms may represent a result of maladaptive vascular remodeling in which inflammatory cells maintain active and abnormal remodeling processes that lead to aneurysm growth and rupture.¹

Similar to our study, Aoki et al used MCP-1 knockout mice in a different mouse intracranial aneurysm model in which intracranial aneurysms were induced by a combination of 4 manipulations over 5 months: treatment with β aminopropionitrile (irreversible lysyl oxidase inhibitor), unilateral carotid artery ligation, bilateral posterior renal artery ligation,

and high-salt drinking water.²¹ In their study, aneurysmal changes, defined as disruption of elastic lamina with or without the formation of aneurysms, were less frequent in MCP-1 knockout mice compared with wild-type mice, which is generally consistent with our data.²¹ In their study, there was a weak trend for MCP-1 knockout mice to have a reduced incidence of aneurysms compared with wild-type mice (10% versus 20%), whereas our study showed a statistically significant reduction of the incidence of aneurysms in MCP-1 knockout mice compared with wild-type mice (20% versus 70%). Such difference between these two studies might be due to a difference in severity of the phenotype between these two models. Aneurysms induced by a single injection of elastase into the cerebrospinal fluid in hypertensive mice tend to be larger and macroscopically apparent.¹¹ In contrast, the mouse aneurysm model used by Aoki et al yielded smaller aneurysms with more subtle histological changes.^{21,22}

Previously, potential roles of MMPs were shown in the formation of intracranial aneurysms.^{6,11,22} We have shown that a broad-spectrum inhibitor of MMPs can suppress the formation of intracranial aneurysms. Although MMP-2 was not critical for the formation of intracranial aneurysms, mice lacking MMP-9 had a reduced incidence of aneurysms.¹¹ Macrophage-derived MMP-9 may be playing critical roles in the formation of intracranial aneurysms.²² In this study, we assessed roles of another key MMP that is produced by macrophages—MMP-12, a macrophage elastase. However, a lack of MMP-12 did not affect the incidence of aneurysms. Unlike MMP-9, MMP-12 may not play a significant role in the formation of intracranial aneurysms. Because exogenous elastase was used to induce aneurysms in our model, it may be the case that the early processes that require endogenous elastases such as MMP-12 may have been bypassed in this model. Alternatively, roles of macrophages and MMPs may be different between different stages—early and late stages—of aneurysm formation and growth.

Clodronate liposome, the treatment we used to deplete macrophages, may have unknown side effects. However, in our experiments, the animals that received clodronate liposome did not show any apparent signs of adverse effects. In our previous study, we have shown that clodronate liposome treatment did not have effects on other leukocyte subpopulation, platelets, or red blood cells.⁹ Our methods to deplete macrophages did not completely deplete the target cell population. This may have resulted in an incomplete suppression of aneurysm formation. Alternatively, other cell types may have had compensated for the relative lack of macrophages.

In summary, data from this study strongly indicated critical roles of macrophages in the formation of intracranial aneurysms in mice. Macrophages and macrophage-derived cytokines may be maintaining abnormal and active aneurysmal wall remodeling that lead to aneurysmal growth and rupture. Pharmacological therapy that modifies inflammation mediated by macrophages may be studied for the prevention of progression, growth, and rupture of intracranial aneurysms.

Sources of Funding

This study was funded by National Institutes of Health (NIH) R01NS055876 (T.H.), NIH R01NS027713 (W.L.Y.), and NIH P01NS044155 (T.H., W.L.Y.).

Disclosures

None.

References

1. Hashimoto T, Meng H, Young WL. Intracranial aneurysms: links between inflammation, hemodynamics and vascular remodeling. *Neurol Res.* 2006;28:372–380.
2. Chyatte D, Bruno G, Desai S, Todor DR. Inflammation and intracranial aneurysms. *Neurosurgery.* 1999;45:1137–1146.
3. Kataoka K, Taneda M, Asai T, Kinoshita A, Ito M, Kuroda R. Structural fragility and inflammatory response of ruptured cerebral aneurysms. A comparative study between ruptured and unruptured cerebral aneurysms. *Stroke.* 1999;30:1396–1401.
4. Shi C, Awad IA, Jafari N, Lin S, Du P, Hage ZA, Shenkar R, Getch CC, Bredel M, Batjer HH, Bendok BR. Genomics of human intracranial aneurysm wall. *Stroke.* 2009;40:1252–1261.
5. Inoue K, Mineharu Y, Inoue S, Yamada S, Matsuda F, Nozaki K, Takenaka K, Hashimoto N, Koizumi A. Search on chromosome 17 centromere reveals tnfrsf13b as a susceptibility gene for intracranial aneurysm: a preliminary study. *Circulation.* 2006;113:2002–2010.
6. Kim SC, Singh M, Huang J, Prestigiacomo CJ, Winfree CJ, Solomon RA, Connolly ES Jr. Matrix metalloproteinase-9 in cerebral aneurysms. *Neurosurgery.* 1997;41:642–666.
7. Frosen J, Piippo A, Paetau A, Kangasniemi M, Niemela M, Hernesniemi J, Jaaskelainen J. Remodeling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture: histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases. *Stroke.* 2004;35:2287–2293.
8. Ota R, Kurihara C, Tsou TL, Young WL, Yeghiazarians Y, Chang M, Mobashery S, Sakamoto A, Hashimoto T. Roles of matrix metalloproteinases in flow-induced outward vascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29:1547–1558.
9. Nuki Y, Matsumoto MM, Tsang E, Young WL, van Rooijen N, Kurihara C, Hashimoto T. Roles of macrophages in flow-induced outward vascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29:495–503.
10. Hashimoto N, Handa H, Hazama F. Experimentally induced cerebral aneurysms in rats. *Surg Neurol.* 1978;10:3–8.
11. Nuki Y, Tsou TL, Kurihara C, Kanematsu M, Kanematsu Y, Hashimoto T. Elastase-induced intracranial aneurysms in hypertensive mice. *Hypertension.* 2009;54:1337–1344.
12. Nakao S, Kuwano T, Tsutsumi-Miyahara C, Ueda S, Kimura YN, Hamano S, Sonoda KH, Saijo Y, Nukiwa T, Strieter RM, Ishibashi T, Kuwano M, Ono M. Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularization and tumor growth. *J Clin Invest.* 2005;115:2979–2991.
13. Stamatovic SM, Shakui P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N, Andjelkovic AV. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood–brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25:593–606.
14. Kanematsu Y, Kanematsu M, Kurihara C, Tsou TL, Nuki Y, Liang EI, Makino H, Hashimoto T. Pharmacologically induced thoracic and abdominal aortic aneurysms in mice. *Hypertension.* 2010;55:1267–1274.
15. Van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods.* 1994;174:83–93.
16. Danenberg HD, Fishbein I, Gao J, Monkkonen J, Reich R, Gati I, Moerman E, Golomb G. Macrophage depletion by clodronate-containing liposomes reduces neointimal formation after balloon injury in rats and rabbits. *Circulation.* 2002;106:599–605.
17. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med.* 1998;187:601–608.
18. Brown PM, Zelt DT, Sobolev B. The risk of rupture in untreated aneurysms: the impact of size, gender, and expansion rate. *J Vasc Surg.* 2003;37:280–284.
19. Schievink WI. Intracranial aneurysms. *N Engl J Med.* 1997;336:28–40.
20. Tronc F, Mallat Z, Lehoux S, Wassef M, Esposito B, Tedgui A. Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with no. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:E120–E126.
21. Aoki T, Kataoka H, Ishibashi R, Nozaki K, Egashira K, Hashimoto N. Impact of monocyte chemoattractant protein-1 deficiency on cerebral aneurysm formation. *Stroke.* 2009;40:942–951.
22. Aoki T, Kataoka H, Morimoto M, Nozaki K, Hashimoto N. Macrophage-derived matrix metalloproteinase-2 and -9 promote the progression of cerebral aneurysms in rats. *Stroke.* 2007;38:162–169.

Supplemental Material

Critical roles of macrophages in the formation of intracranial aneurysm

Authors

Yasuhisa Kanematsu, MD PhD,^{1,4,5} Miyuki Kanematsu, MD^{1,4,6}, Chie Kurihara, BS^{1,4}, Yoshiteru Tada, MD, PhD^{1,4,5}, Tsung-Ling Tsou, BS^{1,4}, Nico van Rooijen, MD, Michael T. Lawton, MD⁷, William L. Young, MD^{1,2,3,4}, Elena I. Liang, BS^{1,4}, Yoshitsugu Nuki, MD PhD,^{1,4} Tomoki Hashimoto, MD^{1,4}

Department of Anesthesia and Perioperative Care¹, Neurology² and Neurosurgery³, Center for Cerebrovascular Research⁴, University of California, San Francisco, California, U.S.A.

Department of Neurosurgery⁵, and Department of Thoracic, Endocrine Surgery and Oncology⁶, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima, Tokushima, Japan

Department of Molecular Cell Biology⁷, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands

Correspondence to: Tomoki Hashimoto, MD, Department of Anesthesia and Perioperative Care, University of California, San Francisco, 1001 Potrero Avenue, No. 3C-38, San Francisco, CA 94110, USA. Phone: (415) 206-8958. Fax: (415) 206-8170; Email: hashimot@anesthesia.ucsf.edu

Immunohistochemical analysis

Immunohistochemical staining was performed using rat monoclonal anti mouse CD45 for pan-leukocytes and rat monoclonal anti mouse CD68 for macrophages as previously described.¹ Representative aneurysms from the wild-type mice that received elastase and angiotensin-II treatment and control middle cerebral artery (immediately distal of the bifurcation from the internal carotid artery) from the wild-type mice that received a stereotaxic injection of PBS and a continuous infusion of PBS through osmotic pump were used to identify inflammatory cell types that infiltrated into aneurysms.

For quantification of macrophages infiltration into cerebral arteries, an additional five mice in each group (clodronate liposome, PBS liposome, MCP-1 knockout mice, MMP-12 knockout mice, and wild-type mice) were sacrificed one week after aneurysm induction. One cross-sectional slice of the middle cerebral artery, immediately distal of the bifurcation from the internal carotid artery, from each mouse was used. Two blinded observers independently performed quantitative analysis as previously described.¹ Macrophages were counted under high magnification (400x) in a randomly selected area of each quadrant of the cross-section of the middle cerebral artery. The arterial area per field was measured by using ImageJ software (National Institutes of Health). The number of macrophages per area of 0.01 square millimeters was calculated using the following formula: number of positive cells per field / arterial area per field. Results from the two observers were averaged.

References

1. Kanematsu Y, Kanematsu M, Kurihara C, Tsou TL, Nuki Y, Liang EI, Makino H, Hashimoto T. Pharmacologically induced thoracic and abdominal aortic aneurysms in mice. *Hypertension*. 2010;55:1267-1274

Abstract

頭蓋内動脈瘤形成におけるマクロファージの重要な役割

Critical Roles of Macrophages in the Formation of Intracranial Aneurysm

Yasuhisa Kanematsu, MD, PhD^{1,4,5}; Miyuki Kanematsu, MD^{1,4,6}; Chie Kurihara, BS^{1,4}; Yoshiteru Tada, MD, PhD^{1,4,5}; Tsung-Ling Tsou, BS^{1,4}; Nico van Rooijen, PhD⁷; Michael T. Lawton, MD^{3,4}; William L. Young, MD^{1,2,3,4}; Elena I. Liang, BS^{1,4}; Yoshitsugu Nuki, MD, PhD^{1,4}; Tomoki Hashimoto, MD^{1,4}

¹Departments of Anesthesia and Perioperative Care, ²Neurology, and ³Neurological Surgery, and ⁴Center for Cerebrovascular Research, University of California, San Francisco, Calif; ⁵Departments of Neurosurgery and ⁶Thoracic, Endocrine Surgery and Oncology, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima, Tokushima, Japan; and ⁷Department of Molecular Cell Biology, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands

背景および目的: 血行動態ストレスや炎症によって誘発される異常な血管リモデリングは、頭蓋内動脈瘤の病態生理における重要なプロセスの1つと考えられている。ヒトでは、炎症細胞、特にマクロファージが頭蓋内動脈瘤壁に浸潤することが多くの研究で示されている。本研究では頭蓋内動脈瘤マウスモデルを用いて、頭蓋内動脈瘤形成にマクロファージが重要な役割を果たしているか否かを検証した。
方法: アンジオテンシンIIにより高血圧を誘発した成熟雌性マウスの脳脊髄液内にエラスターゼを単回注射し、頭蓋内動脈瘤を誘発した。動脈瘤形成の評価を3週後に行った。クロドロン酸リボソームによりマクロファージ欠失を誘導し、マクロファージの役割を検討した。さらに、単球走化性蛋白1 (CCL2) 欠失マウスおよびマトリックスメタロプロテアーゼ12 (マクロファージエラスターゼ) 欠失マウスを用いて、動脈瘤の発生率を調べた。

結果: マウスモデルの頭蓋内動脈瘤では、動脈瘤壁への白血球浸潤が認められ、白血球の大半はマクロファージであった。マクロファージ欠失マウスは対照マウスに比べて、動脈瘤の発生率が有意に低かった (10匹中1匹 対 10匹中6匹, $p < 0.05$)。同様に、単球走化性蛋白1欠失マウスは野生型マウスに比べて、動脈瘤の発生率が低かった (10匹中2匹 対 20匹中14匹, $p < 0.05$)。マトリックスメタロプロテアーゼ12欠失マウスと野生型マウスの比較では、動脈瘤の発生率に差はみられなかった。
結論: 以上のデータより、本研究で用いたマウスモデルでは、頭蓋内動脈瘤形成におけるマクロファージの重要な役割とその適正な機能が示唆された。

Stroke 2011; 42: 173-178

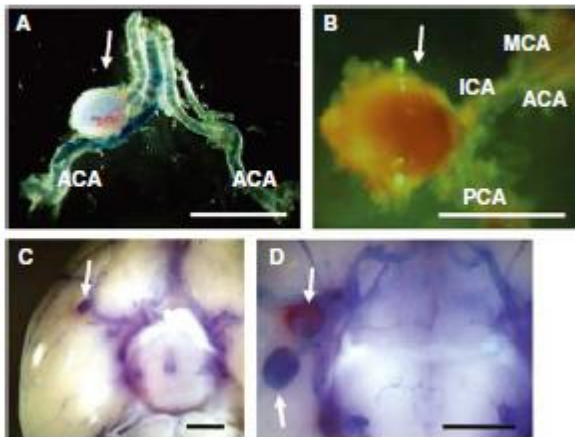


図1 脳脊髄液にエラスターゼを単回注射した高血圧マウスで観察された。代表的な頭蓋内動脈瘤。矢印は動脈瘤を示す。ウィリス動脈瘤とその主要枝に沿って大きな動脈瘤が形成されていた (A ~ D)。切開した動脈瘤は嚢状の形をしていた (A ~ B)。一部のマウスには複数の動脈瘤が形成されていた (D)。尺度線 = 1 mm。ACA: 前大脳動脈, MCA: 中大脳動脈, PCA: 後大脳動脈, ICA: 内頸動脈。

Решающая роль макрофагов в формировании аневризм внутричерепных сосудов

Источник: Y. Kanematsu, M. Kanematsu, C. Kurihara, Y. Tada, T.-L. Tsou, N. van Rooijen, M.T. Lawton, W.L. Young, E.I. Liang, Y. Nuki, T. Hashimoto. Critical roles of macrophages in the formation of intracranial aneurysm. Stroke 2011;42:1:173–178

Дополнительные данные доступны на сайте: <http://stroke.ahajournals.org/cgi/content/full/STROKEAHA.110.590976/DC1>
Departments of Anesthesia and Perioperative Care, Neurology and Neurological Surgery, and the Center for Cerebrovascular Research, University of California, San Francisco, Calif; the Departments of Neurosurgery and Thoracic, Endocrine Surgery and Oncology, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima, Tokushima, Japan; and the Department of Molecular Cell Biology, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands.

Предпосылки и цель исследования. Причиной аномального ремоделирования сосудов являются гемодинамические нагрузки, а ключевым процессом в патофизиологии аневризм внутричерепных сосудов считают воспаление. Результаты многочисленных исследований свидетельствуют об инфильтрации стенки аневризм внутричерепных сосудов человека воспалительными клетками, преимущественно макрофагами. Используя модель внутричерепных аневризм у мышей, мы проверили, играют ли макрофаги решающую роль в формировании аневризм внутричерепных сосудов. **Методы.** У взрослых самцов мышей индуцировали развитие аневризм внутричерепных сосудов с помощью комбинации однократного введения в спинномозговую жидкость эластазы и артериальной гипертензии, индуцированной ангиотензином II. Сформированные аневризмы оценивали через 3 недели. Роль макрофагов изучали с помощью фармакологического уменьшения их числа на фоне применения липосом с клодронатом. Кроме того, оценивали частоту развития аневризм у мышей с отсутствием белка хемотаксиса моноцитов-1 (CCL2) и у мышей с отсутствием матричной металлопротеиназы-12 (макрофагальной эластазы). **Результаты.** При изучении аневризм внутричерепных сосудов на модели выявили наличие лейкоцитарной инфильтрации в стенках аневризм, преимущественно за счет макрофагов. У мышей, которым провели фармакологическое уменьшение числа макрофагов, частота развития аневризм была значительно ниже, чем у мышей контрольной группы (1 из 10 против 6 из 10; $p < 0,05$). Кроме того, у мышей с отсутствием белка хемотаксиса моноцитов-1 частота развития аневризм также была ниже по сравнению с частотой развития аневризм у мышей дикого типа (2 из 10 vs 14 из 20, $p < 0,05$). Между группами мышей с отсутствием матричной металлопротеиназы-12 и мышами дикого типа различия в частоте развития аневризм не было. **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о решающей роли макрофагов и свойственных макрофагам функций в формировании аневризм внутричерепных сосудов на модели.

Ключевые слова: модель на животных (animal model), воспаление (inflammation), внутричерепная аневризма (intracranial aneurysm), макрофаг (macrophage), инсульт (stroke)

В обзорных и генетических исследованиях было высказано предположение о потенциальной роли воспаления в формировании аневризм внутричерепных сосудов – как разорвавшихся, так и неразорвавшихся [1–6]. Макрофагальная инфильтрация в разорвавшихся и неразорвавшихся аневризмах у людей была убедительно подтверждена документальными доказательствами [2, 3, 7]. Выраженность воспаления в аневризмах, по всей вероятности, связана с разрушением и разрывом стенки аневризмы [3, 7].

Недавно нам удалось продемонстрировать решающую роль макрофагов и выделяемых ими цитокинов в гемодинамически-индуцированном ремоделировании сосудистой стенки [8, 9]. По всей видимости, ремоделирование сосудов в сочетании с воспалением играет ключевую роль в патофизиологии аневризм внутричерепных сосудов [4, 10]. Непрерывное ремоделирование сосудов может привести к росту аневризм и ее разрыву [1, 11]. Путем опосредованного участия в воспалении и гемодинамически-индуцированном ремоделировании сосудов макрофаги могут играть важнейшую роль в развитии, росте и разрыве внутричерепных аневризм.

В данной работе мы изучали предполагаемое решающее значение макрофагов в формировании аневризм внутричерепных сосудов с помощью экспериментальной модели на мышах, в которой воспроизвели основные особенности аневризм внутричерепных сосудов у людей. Во-первых, мы оценили влияние фармакологического снижения числа макрофагов с помощью липосом с клодронатом на формирование аневризм. Во-вторых, оценили формирование аневризм у мышей с отсутствием белка хемотаксиса моноцитов-1 (MCP-1, CCL2). MCP-1 является фактором хемотаксиса, имеющим решающее значение для нормального осуществления свойственных макрофагам функций. У мышей с нокаутом гена MCP-1 было снижено число макрофагов/моноцитов и нарушена функция макрофагов. Таким образом, эту группу мышей использовали в качестве генетического эквивалента группе мышей, у которых провели фармакологическое снижение числа макрофагов и моноцитов, в различных физиологических и патологических условиях [12, 13].

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили в соответствии со стандартами, утвержденными комитетом Institutional Animal Care and Use Committee Университета Калифорнии, Сан-Франциско.

В экспериментальной модели использовали 8- и 9-недельных мышей с артериальной гипертензией,

© American Heart Association, Inc., 2011
Адрес для корреспонденции: Tomoki Hashimoto, MD, Department of Anesthesia and Perioperative Care, University of California, San Francisco, 1001 Potrero Avenue, No. 3C-38, San Francisco, CA 94110.
E-mail: hashimoto@anesthesia.ucsf.edu

у которых индуцировали развитие аневризм внутричерепных сосудов, как было описано ранее [11]. В этой модели для индуцирования формирования аневризм внутричерепных сосудов у мышей объединили два хорошо известных клинических фактора, связанных с развитием внутричерепных аневризм у людей – артериальную гипертензию и разрушение эластичной пластинки. Мы выполнили однократную стереотаксическую инъекцию эластазы в спинномозговую жидкость в правую базальную цистерну. Раствор эластазы (17 mU) объемом 2,5 мкл вводили со скоростью 0,2 мкл/мин (Ultramicropump, World Precision Instruments). Артериальную гипертензию индуцировали путем длительной подкожной инфузии ангиотензина II в дозе 1000 нг/кг/мин в течение 3 недель через имплантированный осмотический насос (Alzet pump; Durect) [11, 14].

Систолическое артериальное давление у мышей измеряли до лечения, через 1 неделю после инъекции эластазы и через 2 недели после инъекции эластазы путем непрямого измерения с помощью хвостовой манжеты. Через 3 недели мы подвергли мышей эвтаназии и провели перфузию животных красителем бромфенолом синим. Два ослепленных наблюдателя оценили формирование аневризм внутричерепных сосудов путем изучения Виллизиева круга и его основных ветвей под препаровальной лупой (x10). Критерием наличия аневризмы внутричерепных сосудов считали локальное выпячивание наружу стенки сосуда Виллизиева круга или основных крупных ветвей, как было описано ранее [10, 11]. После изучения сосудов Виллизиева круга все образцы тканей мозга подвергли заморозке для последующего иммуногистохимического окрашивания.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ СНИЖЕНИЕ ЧИСЛА МАКРОФАГОВ

Снижения числа макрофагов достигли с помощью внутривенного введения инкапсулированного в липосомы дихлорметилена дифосфоната (липосомы с клондронатом) [15]. Мы использовали 8- и 9-недельных самцов мышей линии C57BL/6J ($n=10$ в каждой группе). Клондронат был предоставлен компанией Roche Diagnostics GmbH (Мангейм, Германия). Липосомы с клондронатом вводили животным внутривенно за 2 суток до инфузии эластазы и ангиотензина II. При таком режиме введения происходит снижение числа макрофагов менее чем до 10% от их исходного числа [9, 16]. Животным контрольной группы вводили аналогичный объем липосом, содержащих фосфатно-солевой буфер (липосомы с ФСБ). Мы оценили эффективность снижения числа макрофагов путем иммуногистохимического анализа макрофагов в селезенке, как было описано ранее [9, 16].

ЧАСТОТА РАЗВИТИЯ АНЕВРИЗМ У МЫШЕЙ С НОКАУТОМ ГЕНА MCP-1 И У МЫШЕЙ С НОКАУТОМ ГЕНА МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-12

Оценили частоту развития аневризм у мышей с нокаутом гена MCP-1 и мышей с нокаутом гена матриксной металлопротеиназы-12 (MMP-12) ($n=10$). Мышей

дикого типа с одинаковым генетическим фоном (C57BL/6J) использовали в качестве контрольной группы ($n=20$).

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Подробная информация об иммуногистохимическом анализе представлена в дополнительных материалах (см. <http://stroke.ahajournals.org>).

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Все результаты представили в виде “среднее значение \pm CO”. Различия между множественными группами проанализировали с помощью одностороннего дисперсионного анализа с последующим *post hoc* тестом Тьюки-Крамера. Для анализа частоты развития аневризм использовали точный критерий Фишера. Статистически значимым считали результаты при значении $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

НАЛИЧИЕ МАКРОФАГОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ АНЕВРИЗМАХ ВНУТРИЧЕРЕПНЫХ СОСУДОВ

На рисунке 1 (см. цв. вклейку) показаны аневризмы внутричерепных сосудов у мышей с артериальной гипертензией, которым выполнили однократную инъекцию эластазы в спинномозговую жидкость. Было обнаружено формирование крупных мешотчатых аневризм в сосудах Виллизиева круга или их основных ветвей, что согласуется с результатами нашей предыдущей работы (рис. 1А–Г, см. цв. вклейку) [11]. Диаметр большинства аневризм превышал 250 мкм, что примерно в 2–5 раз больше, чем диаметр их родоначальных сосудов, о чем приводились данные ранее (рис. 1А–Г, см. цв. вклейку). У некоторых мышей были обнаружены множественные аневризмы (рис. 1Г, см. цв. вклейку).

В церебральных артериях мышей контрольной группы (ложно-оперированных) обнаружили эндотелиальную оболочку с тонким слоем гладкомышечных клеток, как описывали ранее (рис. 2А, см. цв. вклейку) [11]. В отличие от этого в аневризмах внутричерепных сосудов мышей основной группы было выявлено частичное утолщение стенок с воспалительной клеточной инфильтрацией (рис. 2Б, см. цв. вклейку). Эндотелиальная оболочка в большинстве случаев была интактна, однако слой гладкомышечных клеток в зоне выраженной воспалительной клеточной инфильтрации был утолщен.

Окрашивание всех лейкоцитов с использованием анти-CD45 антител и окрашивание макрофагов с использованием анти-CD68 антител в артерии мозга мышей контрольной (ложно-оперированной) группы показало отсутствие воспалительных клеток и макрофагальной инфильтрации (рис. 2В и 2Д, см. цв. вклейку). В адвентиции и медики стенки аневризм внутричерепных сосудов было обнаружено большое число лейкоцитов (CD45-положительных клеток) (рис. 2Г, см. цв. вклейку), особенно в утолщенной части стенки аневризмы, что в целом соответствует наблюдениям

при аневризмах внутричерепных сосудов у людей [2, 3, 7]. Окрашивание макрофагов выявило наличие макрофагальной инфильтрации в стенке аневризмы с распределением, сходным с распределением лейкоцитов (рис. 2Е–Ж, см. цв. вклейку). Двойное окрашивание с анти-CD68 и анти-CD45 антителами показало, что основную долю лейкоцитов в аневризмах внутричерепных сосудов в этой модели составили макрофаги (рис. 2З, см. цв. вклейку).

ВЛИЯНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО СНИЖЕНИЯ ЧИСЛА МАКРОФАГОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ АНЕВРИЗМ ВНУТРИЧЕРЕПНЫХ СОСУДОВ

Десяти мышам провели снижение числа макрофагов путем введения липосом с клондронатом за 2 суток до индукции аневризм внутричерепных сосудов, еще 10 мышам выполнили инфузию липосом, содержащих ФСБ. Всем этим 20 мышам провели однократную стереотаксическую инъекцию эластазы в спинномозговую жидкость для разрушения эластичной пластинки и длительную инфузию ангиотензина II для индукции артериальной гипертензии.

Через 3 недели после индуцирования формирования аневризм, у мышей, которым провели фармакологическое снижение количества макрофагов с помощью липосом с клондронатом, обнаружили снижение частоты развития аневризм внутричерепных сосудов по сравнению с мышами, которым вводили липосомы с ФСБ (мышь с интактными макрофагами; 1 [10%] из 10 vs 6 [60%] из 10 случаев, $p < 0,05$; рис. 3А), что свидетельствует о решающей роли макрофагов в формировании аневризм внутричерепных сосудов в этой модели.

Несмотря на большое число макрофагов в аневризмах внутричерепных сосудов, у мышей, получавших липосомы с ФСБ (рис. 3Г–Д, см. цв. вклейку), в средней мозговой артерии мышей контрольной группы (рис. 3Б–В, см. цв. вклейку) или группы с фармакологическим снижением числа макрофагов (рис. 3Е–Ж, см. цв. вклейку) отсутствовала макрофагальная инфильтрация сосудистой стенки.

Количественный анализ макрофагов ($n=5$ в каждой группе) показал, что их число было большим у мышей, которым вводили эластазу, ангиотензин II и липосомы с ФСБ, чем у мышей контрольной группы или группы с фармакологическим снижением числа макрофагов ($0,5 \pm 0,3$ и $11,1 \pm 3,3$ соответственно, $p < 0,05$; $0,5 \pm 0,3$ и $1,0 \pm 0,3$ соответственно, $p < 0,05$; рис. 3З, см. цв. вклейку). Иммуногистохимическое окрашивание CD68-позитивных клеток (моноцитов/макрофагов) в селезенке ($n=5$ в каждой временной точке) использовали для оценки эффективности и динамики лечения с помощью липосом с клондронатом, как описано выше (рис. 4А–Б, см. цв. вклейку) [9, 16]. После введения липосом с клондронатом площадь CD68-позитивной области в селезенке снизилась на 88% от исходного размера ($28,8 \pm 4,1$ и $3,2 \pm 1,0$, соответственно, $p < 0,05$), демонстрируя эффективное снижение числа макрофагов/моноцитов на фоне лечения клондронатом. Через 2 недели произошло восстановление

площади CD68-позитивного региона в селезенке до исходного размера ($28,8 \pm 4,1$ и $23,1 \pm 2,6$, соответственно).

Инфузия ангиотензина II привела к развитию артериальной гипертензии в обеих группах. Через 1 и 2 недели после начала инфузии систолическое артериальное давление было выше исходного уровня. Подавление макрофагов не повлияло на уровень систолического артериального давления (рис. 4Б, см. цв. вклейку).

СНИЖЕНИЕ ЧАСТОТЫ РАЗВИТИЯ АНЕВРИЗМ ВНУТРИЧЕРЕПНЫХ СОСУДОВ У МЫШЕЙ С НОКАУТОМ ГЕНА MCP-1

Поскольку у мышей с нокаутом гена MCP-1 было снижено число моноцитов/макрофагов и нарушена функция макрофагов [17], мы использовали мышей с нокаутом гена MCP-1 для дальнейшего анализа решающей роли макрофагов в формировании аневризм внутричерепных сосудов. У двадцати мышей дикого типа и десяти мышей с нокаутом гена MCP-1 индуцировали развитие аневризм внутричерепных сосудов.

У мышей с нокаутом гена MCP-1 была ниже частота развития аневризм по сравнению с мышами дикого типа (2 [20%] из 10 и 14 [70%] из 20 соответственно, $p < 0,05$; рис. 5А, см. цв. вклейку). Иммуногистохимическое окрашивание макрофагов в церебральных артериях продемонстрировало отсутствие макрофагальной инфильтрации у мышей с нокаутом гена MCP-1 (рис. 5Б, см. цв. вклейку). Количественный анализ макрофагов в средней мозговой артерии ($n=5$ в каждой группе) показал уменьшение макрофагальной инфильтрации в средней мозговой артерии у мышей с нокаутом гена MCP-1 по сравнению с макрофагальной инфильтрацией у мышей дикого типа ($2,8 \pm 1,4$ и $10,9 \pm 0,8$ соответственно, $p < 0,05$; рис. 5Д, см. цв. вклейку).

Макрофаги продуцируют металлопротеиназы (ММП), играющие важную роль в ремоделировании сосудов [8, 9]. Ранее, используя эту же экспериментальную модель, нам удалось продемонстрировать высокую активность ММП в аневризмах внутричерепных сосудов [11]. Использование ингибитора ММП доксициклина позволяет значительно снизить частоту развития аневризм внутричерепных сосудов [11]. Снижение частоты развития аневризм внутричерепных сосудов было зарегистрировано у мышей с нокаутом гена ММП-9, но не гена ММП-2 [11]. Принимая во внимание, что ММП-9 является основной желатиназой, продуцируемой макрофагами, важно отметить, что ММП-12 в свою очередь представляет собой основную эластазу макрофагов. ММП-12 может быть протеиназой, ответственной за содействие структурным изменениям эластичной пластинки, приводящим к физиологическому и патологическому сосудистому ремоделированию [18]. В связи с этим мы изучали роль именно ММП-12 в формировании аневризм внутричерепных сосудов. Однако нам не удалось выявить различий в частоте развития аневризм внутричерепных сосудов между мышами с нокаутом гена ММП-12 и мышами дикого типа (50 и 70% соответственно). Кроме того, иммуногистохимическое окраши-

вание макрофагов (CD68-позитивных клеток) показало наличие одинакового числа макрофагов, накопившихся у мышей с нокаутом гена MMP-12 и у мышей дикого типа ($9,4 \pm 2,3$ vs $10,9 \pm 0,8$; рис. 5Д, см. цв. вклейку).

Длительная инфузия ангиотензина II привела к повышению исходного уровня систолического артериального давления через 1 и 2 недели у мышей с нокаутом гена MCP-1 и мышей с нокаутом гена MMP-12. Не удалось выявить значимого различия через 1 и 2 недели между мышами дикого типа и мышами с нокаутом гена MCP-1 или MMP-12 (рис. 5Е, см. цв. вклейку).

■ ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании мы показали решающую роль макрофагов в формировании аневризм внутричерепных сосудов у мышей. Мы использовали недавно разработанную экспериментальную модель аневризм внутричерепных сосудов, в которой развитие аневризм индуцировали сочетанием однократной стереотаксической инъекции эластазы в спинномозговую жидкость и фармакологически-индуцированной артериальной гипертензии у мышей. Морфологические характеристики аневризм внутричерепных сосудов в этой модели у мышей точно соответствуют изменениям, наблюдающимся при аневризмах внутричерепных сосудов у людей [11]. Используя эту модель, мы, во-первых, продемонстрировали наличие воспалительной клеточной инфильтрации стенки аневризмы преимущественно за счет макрофагов. Во-вторых, у мышей с фармакологическим снижением числа макрофагов была значительно ниже частота развития аневризм внутричерепных сосудов, чем у мышей с интактными макрофагами. Кроме того, у мышей с нокаутом гена MCP-1, т. е. мышей со сниженным числом моноцитов/макрофагов и нарушением функции макрофагов, была значительно ниже частота развития аневризм внутричерепных сосудов по сравнению с мышами дикого типа. Эти данные убедительно свидетельствуют в пользу решающей роли макрофагов в формировании аневризм внутричерепных сосудов в этой модели, особенно на ранних этапах формирования и роста аневризмы.

Аневризмы внутричерепных сосудов чаще встречаются в зонах, которые подвержены аномальной гемодинамической нагрузке на сосудистую стенку [19]. Аномальные гемодинамические нагрузки провоцируют развитие воспалительного процесса путем активации эндотелиальных клеток и моноцитов/макрофагов. Эти клетки секретируют протеиназы, в т. ч. MMP и эластазы [1]. MMP может дестабилизировать сосудистую стенку непосредственно, путем содействия ремоделированию при расщеплении сосудистой матрицы и опосредованно, путем активации и высвобождения других протеиназ и ангиогенных факторов [20]. Ранее нами была продемонстрирована важная роль макрофагов и MMP в адаптивном ремоделировании сосудов крупных артерий [9]. Аневризмы внутричерепных сосудов могут развиваться в результате неадекватного ремоделирования сосудов, при котором воспалительные клетки способствуют активным и ано-

мальным процессам ремоделирования, приводящим к росту и разрыву аневризм [1].

Как и в нашем исследовании, Т. Аоки и соавт. использовали мышей с нокаутом гена MCP-1 в другой модели аневризм внутричерепных сосудов, в которой развитие аневризм индуцировали сочетанием 4 манипуляций в течение 5 месяцев: введения β -аминопропионитрила (необратимого ингибитора лизил-оксидазы), одностороннего лигирования сонной артерии, двустороннего лигирования задних почечных артерий и повышенной солевой нагрузки [21]. В своем исследовании Т. Аоки и соавт. обнаружили, что аневризматические изменения, такие как нарушение эластичной мембраны с или без формирования аневризм, реже встречались у мышей с нокаутом гена MCP-1 по сравнению с мышами дикого типа, и это наблюдение в целом соответствует нашим данным [21]. Также у мышей с нокаутом гена MCP-1 была отмечена слабая тенденция к снижению частоты развития аневризм по сравнению с мышами дикого типа (10 и 20% соответственно), тогда как в нашем исследовании удалось продемонстрировать статистически значимое снижение частоты развития аневризм у мышей с нокаутом гена MCP-1 по сравнению с мышами дикого типа (20 vs 70%). Эта разница между двумя исследованиями может быть обусловлена различием в тяжести фенотипа в этих двух экспериментах. Аневризмы, развитие которых индуцировано однократной инъекцией эластазы в спинномозговую жидкость мышам с артериальной гипертензией, как правило, крупнее и с более выраженными изменениями [11]. В отличие от этого в модели внутричерепных аневризм у мышей, использованной Т. Аоки и соавт., аневризмы были меньше, с более тонкими гистологическими изменениями [21, 22].

Ранее уже была продемонстрирована потенциальная роль MMP в формировании аневризм внутричерепных сосудов [6, 11, 22]. Мы доказали, что ингибитор MMP широкого спектра действия может подавлять формирование аневризм внутричерепных сосудов. Хотя MMP-2 играла важную роль в формировании аневризм внутричерепных сосудов, у мышей с отсутствием MMP-9 частота развития аневризм была ниже [11]. Выделяемая макрофагами MMP-9 может играть решающую роль в формировании аневризм внутричерепных сосудов [22]. В данном исследовании мы оценили роль еще одной ключевой MMP, продуцируемой макрофагами – MMP-12, макрофагальной эластазы. Однако отсутствие MMP-12 не повлияло на частоту развития аневризм. В отличие от MMP-9, MMP-12 не может играть значимой роли в формировании аневризм внутричерепных сосудов. Поскольку для индукции развития аневризм в нашей модели использовали экзогенную эластазу, вполне возможно, что ранние процессы, для которых необходимо участие эндогенных эластаз, таких как MMP-12, в нашей модели были блокированы. Кроме того, на разных стадиях формирования и роста аневризм – ранних и поздних – роль макрофагов и MMP может отличаться.

Вполне вероятно, что введение липосом с клондронатом, т. е. лечение, которое мы использовали для снижения числа макрофагов, имеет неизвестные побочные

эффекты. Однако в наших экспериментах мы не обнаружили никаких видимых признаков побочных эффектов у животных, получавших липосомы с клодронатом. В нашем предыдущем исследовании мы продемонстрировали, что введение липосом с клодронатом не оказывает влияние на другие субпопуляции лейкоцитов, тромбоциты или эритроциты [9]. Наши методы снижения числа макрофагов не позволяют полностью подавить целевую популяцию клеток. По всей вероятности, это приводит к неполной супрессии формирования аневризм. Кроме того, относительный дефицит макрофагов, возможно, был компенсирован другими типами клеток.

Таким образом, результаты проведенного исследования четко указывают на решающую роль макрофагов в формировании аневризм внутричерепных сосудов у мышей. Макрофаги и высвобождаемые макрофагами цитокины могут способствовать аномальному и активному ремоделированию стенки аневризмы, что приводит к ее росту и последующему разрыву. Для предотвращения прогрессирования, роста и разрыва аневризм внутричерепных сосудов необходимо изучать эффективность фармакологической терапии, модифицирующей опосредованное макрофагами воспаление.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hashimoto T, Meng H, Young W.L. Intracranial aneurysms: links between inflammation, hemodynamics and vascular remodeling. *Neurol Res.* 2006;28:372–380.
2. Chyatte D, Bruno G, Desal S, Todor D.R. Inflammation and intracranial aneurysms. *Neurosurgery.* 1999;45:1137–1146.
3. Kataoka K, Taneda M, Asai T, Kinoshita A, Ito M, Kuroda R. Structural fragility and inflammatory response of ruptured cerebral aneurysms. A comparative study between ruptured and unruptured cerebral aneurysms. *Stroke.* 1999;30:1396–1401.
4. Shi C, Awad IA, Jafari N, Lin S, Du P, Hage ZA, Shenkar R, Getch C.C., Bredel M., Batjer H.H., Bendok B.R. Genomics of human intracranial aneurysm wall. *Stroke.* 2009;40:1252–1261.
5. Inoue K, Mineharu Y, Inoue S, Yamada S, Matsuda F, Nozaki K, Takenaka K, Hashimoto N, Kotzumi A. Search on chromosome 17 centromere reveals *Tnfrsf13b* as a susceptibility gene for intracranial aneurysm: a preliminary study. *Circulation.* 2006;113:2002–2010.
6. Kim S.C, Singh M, Huang J, Prestigiacomo C.J., Winfree C.J., Solomon R.A., Connolly E.S. Jr. Matrix metalloproteinase-9 in cerebral aneurysms. *Neurosurgery.* 1997;41:642–666.
7. Frosen J, Pliippo A, Paetau A, Kangasniemi M, Niemela M, Hernesniemi J, Jaaskelainen J. Remodelling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture: histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases. *Stroke.* 2004;35:2287–2293.
8. Ota R, Kurihara C, Tsou T.L., Young W.L., Yeghiazarians Y, Chang M, Mobashery S, Sakamoto A, Hashimoto T. Roles of matrix metalloproteinases in flow-induced outward vascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29:1547–1558.
9. Nuki Y, Matsumoto M.M., Tsang E, Young W.L., van Rooijen N, Kurihara C, Hashimoto T. Roles of macrophages in flow-induced outward vascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29:495–503.
10. Hashimoto N, Handa H, Hazama F. Experimentally induced cerebral aneurysms in rats. *Surg Neurol.* 1978;10:3–8.
11. Nuki Y, Tsou T.L., Kurihara C, Kanematsu M, Kanematsu Y, Hashimoto T. Elastase-induced intracranial aneurysms in hypertensive mice. *Hypertension.* 2009;54:1337–1344.
12. Nakao S, Kuwano T, Tsutsumi-Miyahara C, Ueda S, Kimura Y.N., Hamano S, Sonoda K.H., Saljo Y, Nukiwa T, Strieter R.M., Ishibashi T, Kuwano M, Ono M. Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 β -induced neovascularization and tumor growth. *J Clin Invest.* 2005;115:2979–2991.
13. Stamatovic S.M., Shukil P, Keep R.F., Moore B.B., Kunkel S.L., Van Rooijen N, Andjelkovic A.V. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood–brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25:593–606.
14. Kanematsu Y, Kanematsu M, Kurihara C, Tsou T.L., Nuki Y, Llang E.L, Makino H, Hashimoto T. Pharmacologically induced thoracic and abdominal aortic aneurysms in mice. *Hypertension.* 2010;55:1267–1274.
15. Van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods.* 1994;174:83–93.
16. Danenberg H.D., Fishbeln I, Gao J, Monkkonen J, Reich R, Gati I, Moerman E, Golomb G. Macrophage depletion by clodronate-containing liposomes reduces neointimal formation after balloon injury in rats and rabbits. *Circulation.* 2002;106:599–605.
17. Lu B, Rutledge B.J., Gu L, Florillo J, Lukacs N.W., Kunkel S.L., North R, Gerard C, Rollins B.J. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med.* 1998;187:601–608.
18. Brown P.M., Zelt D.T., Sobolev B. The risk of rupture in untreated aneurysms: the impact of size, gender, and expansion rate. *J Vasc Surg.* 2003;37:280–284.
19. Schievink W.I. Intracranial aneurysms. *N Engl J Med.* 1997;336:28–40.
20. Tronc F., Mallat Z., Lehoux S., Wassef M., Esposito B., Tedgui A. Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with no. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:E120–E126.
21. Aoki T, Kataoka H, Ishibashi R, Nozaki K, Egashira K, Hashimoto N. Impact of monocyte chemoattractant protein-1 deficiency on cerebral aneurysm formation. *Stroke.* 2009;40:942–951.
22. Aoki T, Kataoka H, Morimoto M, Nozaki K, Hashimoto N. Macrophage-derived matrix metalloproteinase-2 and -9 promote the progression of cerebral aneurysms in rats. *Stroke.* 2007;38:162–169.