

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 578.089.1-616.831-005-611.139

ВЫЯВЛЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ ГНЕЗДОВОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ КЛЕТОК КОСТНОМОЗГОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В НЕОИНТИМАЛЬНОМ УТОЛЩЕНИИ СОННОЙ АРТЕРИИ КРЫСЫ¹

© 2008 г. О. П. Ильинская*, **, Ю. Г. Антропова*, Н. И. Калинина*, В. А. Мишина*,
Н. В. Радюхина*, Э. М. Тарарак*

*ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росмедтехнологий
121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
119992 Москва, ГСП-2, Ленинские горы, д. 1

E-mail: cardiocell@cardio.ru

Поступила в редакцию 12.04.07 г.
Окончательный вариант получен 19.09.07 г.

Для установления костномозгового происхождения клеток, участвующих в формировании неоинтимы после повреждения люминальной поверхности сосуда, применяли высокочувствительный метод гнездовой полимеразной цепной реакции для изолированных клеток стенки сосуда. Исследование проводили на модели экспериментальной интимальной гиперплазии сонной артерии после баллонной ангиопластики у радиационных костномозговых химер между самцами и самками крыс Вистар. В качестве маркера клеток костномозгового происхождения использовали Y-хромосому самцов крыс, которые служили донорами клеток костного мозга для облученных самок. Метод позволил показать, что значительная часть α -актинположительных (гладкомышечных) клеток неоинтимы имеет костномозговое происхождение.

Ключевые слова: радиационные костномозговые химеры, баллонная ангиопластика, неоинтима, клетки костномозгового происхождения, гнездовая полимеразная цепная реакция.

Очаговое скопление гладкомышечных клеток (ГМК) в интима артерий – интимальная гиперплазия – играет ключевую роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. В основе общепринятой концепции развития гиперплазии лежит представление о том, что в условиях повреждения стенки сосуда вследствие хирургического вмешательства или развития атеросклеротического поражения ГМК медиальной оболочки дедифференцируются и мигрируют в интиму. Здесь в результате избыточной пролиферации и синтеза этими клетками компонентов межклеточного матрикса развивается гиперплазированная интима (Clowes et al., 1983 a,b; Ross, 1993; Dzau et al., 2002), следствием чего является частичное или даже полное зарастание просвета сосуда.

Исследования последних лет свидетельствуют о том, что костный мозг также может поставлять в поврежденную стенку сосуда циркулирующие в крови предшественники как для гладкомышеч-

ных, так и для эндотелиальных клеток. В экспериментах на животных показано, что такие клетки-предшественники участвуют в новообразовании интимы артерий при экспериментальной аллотрансплантации органов, после механического повреждения сосудов, а также при экспериментальном атеросклерозе (Hillebrands et al., 2001, 2003; Saiura et al., 2001; Sata et al., 2002).

О костномозговом происхождении клеток, образующих неоинтиму, свидетельствует и ранее выполненное нами исследование процесса репарации участка сонной артерии крысы, поврежденного баллонным катетером. Было показано, что на ранней стадии процесса развивается острая воспалительная реакция, в которой участвуют нейтрофилы, моноциты-макрофаги и недифференцированные клетки гематогенного происхождения, а на поздней в очаге репарации появляются клетки, несущие специфические маркеры ГМК (α -актин, смузелин). Исследование кинетики пролиферации этих клеток с помощью бромдезоксипридина показало, что они имеют скорее гематогенное, чем местное происхождение (Ильинская и др., 2003).

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 07-04-01456-а) и Министерством образования и науки РФ (госконтракт № 02.512.11.2049).

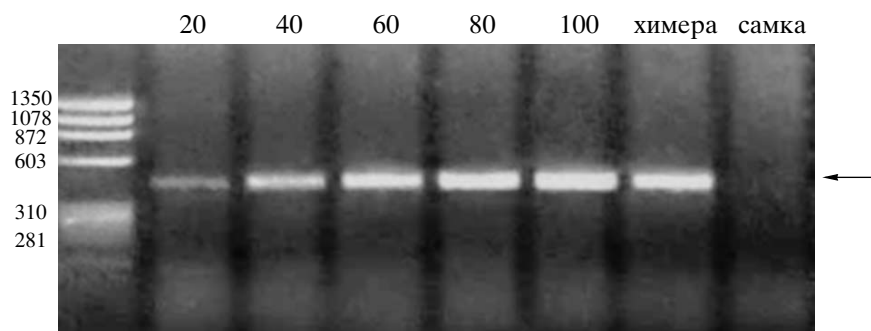


Рис. 1. Определение степени химеризма у экспериментальных крыс.

По горизонтали – интенсивность свечения количественно связанного с ДНК этидиума бромида, %; по вертикали – длина фрагмента ДНК, п. о. (→) – полосы, соответствующие длине Y-хромосомного фрагмента ДНК в 345 п. о.

Цель нашей работы – выявление клеток костномозгового происхождения в области сонной артерии у радиационных костномозговых крысиных химер. Клетки костного мозга химерных самок были заменены клетками самцов, что позволило идентифицировать клеточные элементы костномозгового происхождения по наличию в них Y-хромосомы. Для выявления этого маркера использовали высокочувствительный метод гнездовой полимеразной цепной реакции (ПЦР, nested PCR), позволивший проводить анализ ДНК в единичных клетках, изолированных из стенки сосуда.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Опыты проведены на самках крыс Вистар ($n = 12$) с исходной массой 170 г, которых облучали летальной дозой 9 Гр (мощность дозы 0.17 Гр/мин) для получения радиационных костномозговых половых химер. Через 1 сут после облучения животным вводили в хвостовую вену суспензию клеток костного мозга самцов (3×10^7 кл/мл).

Через 6 мес после облучения проводили ПЦР-анализ ДНК клеток костного мозга химер на наличие в них Y-хромосомы (SR Y-область) для подтверждения успешной репопуляции костного мозга клетками самца и определения степени химеризма. Для выявления фрагмента Y-хромосомы самца были использованы праймеры, имевшие следующую последовательность нуклеотидов:

прямой – 5'-GGA GAG AGG CAC AAG TTG GC-3',

обратный – 5'-CTT CAG TCT CTG CGC CTC CT-3';

продукт амплификации – 345 п.о. (праймеры любезно предоставил проф. А. Бобик, Бейкеровский институт, г. Мельбурн, Австралия). Для определения степени химеризма готовили эталонные пробы ДНК контрольных животных, в которых смешивали ДНК самки и самца. При

сравнении эталонных проб, содержащих 0, 20, 40, 60, 80 и 100% ДНК самца, с пробами ДНК, выделенными из клеток костного мозга химер, оказалось, что степень химеризма составила приблизительно 80% (рис. 1). Далее у химерных животных повреждали общую сонную артерию с помощью баллонного катетера Фогарти 2F (“Baxter”, США) по стандартной методике (Clowes et al., 1983b), применявшейся ранее для получения неоинтимы (Kudryashova et al., 2002). Обезболивание проводили с помощью внутривентрального введения кетамина (10 мг/кг), местно наносили лидокаин. Забор сонных артерий у крыс производили на 14-е сут от начала эксперимента после эвтаназии с помощью кетамина (20 мг/кг). Материал замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C .

Из замороженных сосудов готовили срезы толщиной 7 мкм. Для идентификации ГМК на срезах препараты фиксировали в холодном ацетоне и окрашивали с помощью моноклональных антител, распознающих α -актин гладких мышц (anti-SM- α -actin, “DAKO”, США), по стандартному протоколу с использованием вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой (secondary biotinylated anti-mouse antibodies, “Vector Laboratories”, США), и дальнейшей визуализацией с помощью диаминобензида. Антитела использовали в разведении 1 : 100. Ядра клеток окрашивали гематоксилином. Далее на окрашенных срезах проводили лазерную микродиссекцию α -актинположительных и α -актинотрицательных клеток неоинтимы с использованием системы Laser Dissection Microscope (“Zeiss”, Германия) с микроманипулятором и лазерной установкой (PALM). Комплекс позволял при большом увеличении микроскопа идентифицировать любую специфически окрашенную (или неокрашенную) клетку и с помощью лазерного луча вырезать из нее ядро с окружающей цитоплазмой. Схема выполненных микроманипуляций представлена на рис. 2. Затем в условиях, максимально исключающих

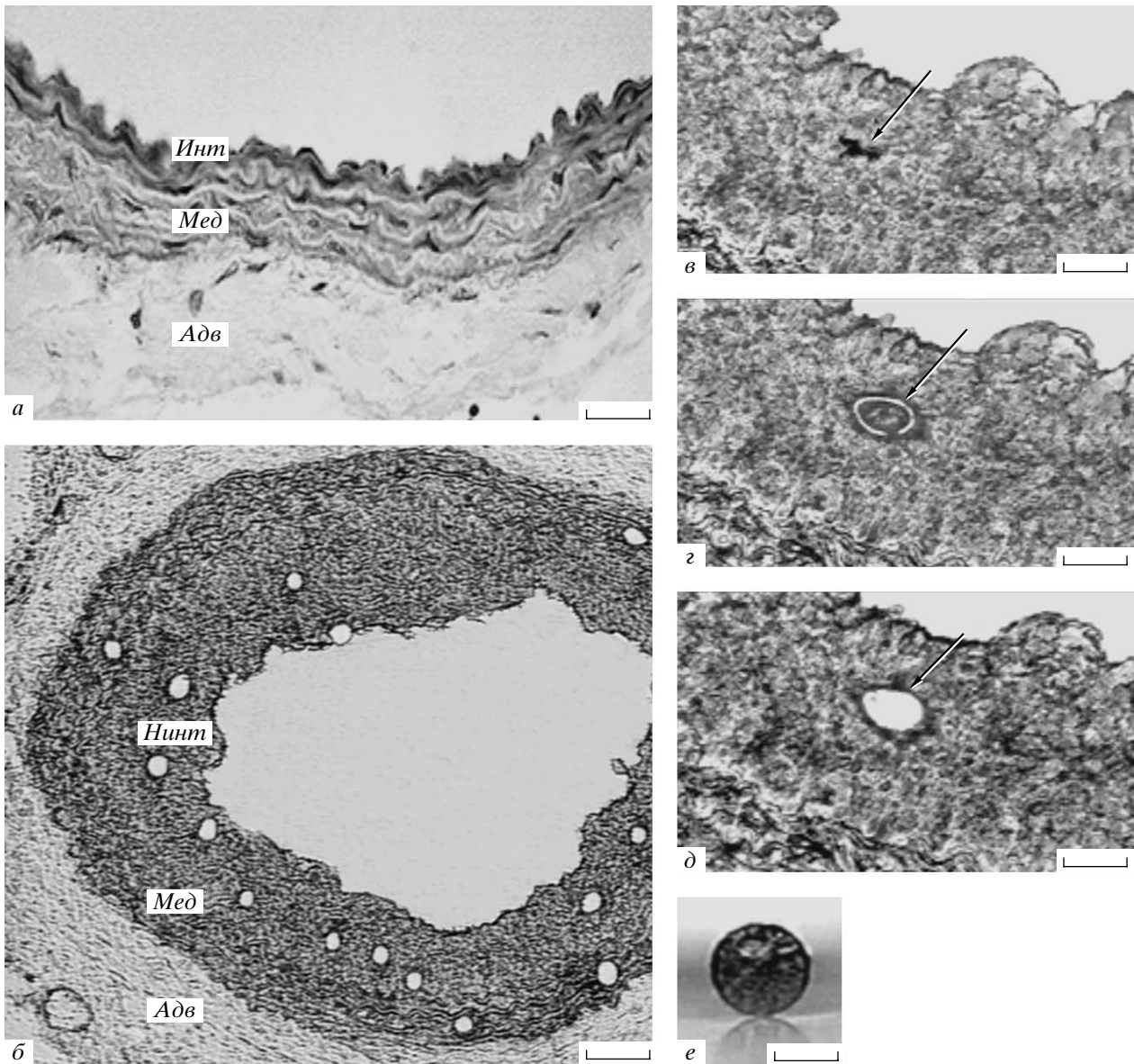


Рис. 2. Нормальная и гиперплазированная стенки сонной артерии крысы (*а* – intactный сосуд; *б* – сосуд через 14 сут после баллонной ангиопластики; видна стенка сосуда после проведенной лазерной микродиссекции отдельных клеток у химеры № 3; *в-е* – последовательность этапов лазерной микродиссекции отдельной α -актинположительной клетки из неоинтимы: *в* – выбор интенсивно окрашенной α -актинположительной клетки (стрелка); *з* – выбранная клетка обведена лазерным лучом (стрелка); *д* – вырезанная клетка извлечена с помощью второго лазерного луча (стрелка); *е* – вырезанная клетка на дне пробирки).

Условные обозначения: *Инт* – интима, *Нинт* – неоинтима, *Мед* – медиа, *Адв* – адвентиция.

Масштаб: *а* – 20, *б* – 40, *в-д* – 10, *е* – 5 мкм.

какую-либо контаминацию, вырезанный фрагмент клетки с ядром переносили в микроцентрифужную пробирку для последующего проведения ПЦР (рис. 2, *е*). Из каждой неоинтимы вырезали по 10–15 клеточных ядер с небольшим фрагментом окружающей цитоплазмы. Наряду с клетками неоинтимы в работе также исследовали клетки других оболочек поврежденной сонной арте-

рии, т.е. адвентиции и медиа (рис. 2, *б*), а также лейкоцитов крови у контрольных животных. В общей сложности из всех образцов было извлечено и проанализировано 127 ядер.

В каждом из изолированных ядер с помощью гнездовой ПЦР выявляли специфический фрагмент Y-хромосомы крысы по описанной ранее методике (Hillebrands et al., 2000), в соответствии с

которой проводили два раунда амплификаций по 30 циклов в каждом, используя две пары праймеров. В первом раунде амплифицировали основной фрагмент ДНК, используя внешнюю пару праймеров, а во втором – внутреннюю пару праймеров, комплементарных последовательностям, лежащим внутри основного ампликона. Общее число циклов составило 60, что обеспечило высокую чувствительность метода, необходимую при работе с малым количеством исходной ДНК, содержащейся в одном клеточном ядре.

Для амплификации использовали протокол и реактивы из коммерческого набора “SuperScript” 10342-053 (“Invitrogen”, Нидерланды). В качестве праймеров использовали следующие последовательности олигонуклеотидов: 1) внешней пары праймеров для первого раунда ПЦР: прямой праймер –

5'-CAGGCTGGAAAGGCTTGTAG-3',

обратный праймер –

5'-CCCATGTTTGGTCCACATAG-3';

продукт амплификации – 549 п.о.; 2) внутренней пары праймеров для второго раунда ПЦР: прямой –

5'-GCTGGTGATTTGCAGAGTGA-3',

обратный –

5'-GAATGTTTTCGATTCCGACTGG-3';

продукт амплификации – 128 п.о. (праймеры любезно предоставил Ж.-Л. Хиллебрандс (J.-L. Hillebrands), Гронингенский университет, Нидерланды).

Для проведения гнездовой ПЦР извлеченные из стенки сосуда ядра автоматически переносили в пробирки с 30 мкл раствора протеиназы К (“Boeringer Mannheim”, Германия) в буфере для ПЦР и инкубировали 1 ч при 50°C. Затем инактивировали протеиназу К в течение 10 мин при 95°C, после чего в пробирки вносили 20 мкл буфера для ПЦР с 1 ед. Taq-полимеразы таким образом, чтобы конечная концентрация в объеме 50 мкл составляла 200 мкл/л dNTP, добавляли 30 мкл/л праймеров, 0.05% детергента W-1 и 1.5 mM MgCl₂ в буфере для ПЦР. Температурный режим для первого раунда: 95° – 3 мин, 95° – 60 с, 62° – 60 с, 72° – 1 мин 12 с – 30 циклов, 72° – 7 мин. После завершения первого раунда амплификации 2 мкл полученного продукта переносили в другие пробирки, содержащие 48 мкл реакционной смеси с тем же составом реагентов и проводили второй раунд ПЦР. Температурный режим для второго раунда: 95° – 3 мин, 95° – 60 с, 58° – 60 с, 72° – 1 мин 12 с – 30 циклов, 72° – 7 мин. После завершения второго раунда ПЦР 10 мкл ПЦР-продуктов, полученных в результате амплификации ДНК, разделяли и идентифицировали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле. По на-

личию полосы, соответствующей длине 128 п.о., судили о наличии или отсутствии Y-хромосомы в исследуемой клетке, а следовательно, о ее донорском или реципиентском происхождении. В качестве позитивного контроля при определении эффективности процедуры клеточной микродиссекции и проведении последующего ПЦР-анализа использовали ДНК клеток, вырезанных из области гиперплазии сонной артерии и мазков крови самца. Как следует из таблицы, эффективность метода в позитивном контроле составила 79%. Для негативного контроля использовали ДНК клеток неоинтимы и лейкоцитов крови самки. Остальные контроли проводили в соответствии с протоколом фирмы-производителя коммерческого набора реактивов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологическое исследование показало, что к 14-м сут эксперимента во всех исследованных образцах поврежденных сосудов как у нормальных, так и у химерных крыс была сформирована неоинтима, состоявшая из нескольких слоев клеток (рис. 2, б). Иммуноцитохимическое окрашивание антителами к α -актину показало, что популяция этих клеток была гетерогенна: в ней присутствовали как α -актинположительные, так и α -актинотрицательные элементы, что соответствовало ранее полученным нами данным (Ильинская и др., 2003).

После лазерной микродиссекции из стенки сосуда произвольно выбранных клеток ядерную ДНК анализировали с помощью гнездовой ПЦР и последующего электрофореза ПЦР-продуктов на наличие специфического фрагмента Y-хромосомы крысы. На рис. 3 представлен типичный результат разделения с помощью электрофореза продуктов гнездовой ПЦР для ДНК, выделенной из клеток неоинтимы на 14-е сут после баллонной ангиопластики у химеры № 3 (таблица; рис. 3, а), у нормального самца (положительный контроль) (рис. 3, б), а также у нормальной самки (рис. 3, в).

В таблице приведены сводные данные, полученные при анализе всех образцов успешно выделенной ДНК, из которых следует, что в области репарации сосудистой стенки у химерных животных значительную долю (38%) составляют клетки, несущие маркер донорских клеток – Y-хромосому. Наличие маркера свидетельствует о костномозговом происхождении этих клеток. Большинство из них располагались в неоинтимах и несли маркер ГМК – α -актин. Наряду с ними здесь же располагались и α -актинотрицательные клетки донорского происхождения. Клетки α -актинположительные, несущие Y-маркер, были обнаружены и в меди. В адвентиции располагались в

Результаты анализа ДНК изолированных клеток ($n = 127$) гиперплазированной стенки сонной артерии химерных и контрольных крыс, а также мазков крови контрольных крыс после проведения электрофореза ПЦР-продуктов на наличие Y-хромосомного маркера

Образцы	Область локализации клеток	Число вырезанных клеток	Число Y-положительных клеток		
			+	-	Всего*
Химерные:					
№ 1	Неоинтима	15	6	2	8 (53)
	Медия	10	4	-	4 (40)
	Адвентиция	6	1	2	3 (50)
№ 2	Неоинтима	15	2	1	3 (20)
	Медия	10	2	-	2 (20)
	Адвентиция	5	-	1	1 (20)
№ 3	Неоинтима	15	5	2	7 (47)
	Медия	11	3	1	4 (36)
	Адвентиция	7	0	4	4 (47)
	Всего:	94	23	13	36 (38)
Контрольные:					
Самка	Неоинтима	10	0	0	(0)
	Медия	5	0	0	(0)
	Адвентиция	4	0	0	(0)
	Мазок крови (лейкоциты)	10	0	0	(0)
	Всего:	29	0	0	(0)
Самец	Неоинтима	10	7	3	(70)
	Медия	6	4	2	(67)
	Адвентиция	8	7	1	(88)
	Мазок крови (лейкоциты)	9	8	1	(89)
	Всего:	33	26		(79)

Примечание: “+”, “-” – α -актинположительные и отрицательные клетки соответственно, * в скобках указано количество клеток в %.

основном α -актинотрицательные клетки донорского происхождения. Учитывая наши ранее полученные данные о присутствии в неоинтимае на 14-е сут наряду с ГМК также и моноцитов-макрофагов и недифференцированных элементов (Ильинская и др., 2003), можно полагать, что α -актинотрицательные клетки могут относиться именно к этим клеточным категориям.

Результаты нашей работы свидетельствуют об участии ГМК костномозгового происхождения в образовании неоинтимы и репарации меди артериальной стенки у крыс. Они согласуются с ранее полученными данными японских исследователей, которые обнаружили у мышинных химер 63% ГМК костномозгового происхождения в неоинтимае и 46% – в меди в области репарации бедренной артерии через 4 нед после повреждения.

Эксперименты были проведены на летально облученных мышах дикого типа, кроветворение у которых восстанавливали с помощью клеток мышной линии ROS26, экспрессировавших маркерный ген β -галактозидазы (Sata et al., 2002). Основываясь на полученных результатах, можно заключить, что в процессе репарации в поврежденную область сосуда с током крови наряду с гематогенными элементами, участвующими в ранней стадии воспаления (Ильинская и др., 2003), проникают циркулирующие в крови предшественники ГМК. Эти клетки пролиферируют и дифференцируются как в зрелые элементы неоинтимы, замещающей разрушенную интиму, так и в медиальные ГМК, восполняя их частичную утрату.

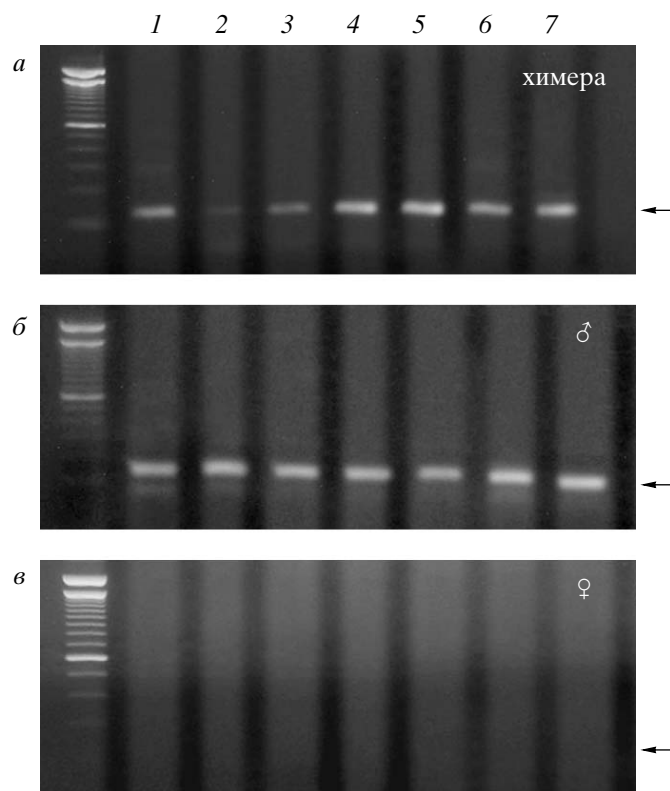


Рис. 3. Результат электрофореза ПЦР-продуктов при анализе ДНК на наличие Y-хромосомного маркера в изолированных клетках (1–7) неоинтимы сонных артерий крыс: а – химерная крыса № 3; б – контрольный самец (♂); в – контрольная самка (♀). (→) – полосы, соответствующие длине в 128 п.о. Y-хромосомного фрагмента ДНК.

Таким образом, в настоящей работе с помощью метода гнездовой ПЦР получены экспериментальные доказательства участия клеток костномозгового происхождения в репарации сосудистой стенки, в том числе предшественников ГМК, которые являются клеточным элементом неоинтимы. Положительный опыт использования метода гнездовой ПЦР в нашей работе свидетельствует о возможности его применения для установления источника происхождения тех или иных клеток, участвующих в репаративных процессах.

Авторы приносят искреннюю благодарность заведующей лабораторией Гематологического научного центра РАМН Н.И. Дризе за консультации и помощь в работе при получении радиационных костномозговых химер, а также Ж.-Л. Хиллебрандсу за помощь при выполнении работы по лазерной микродиссекции и гнездовой ПЦР на базе Университета г. Гронинген.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ильинская О.П., Кудряшова Е.Ю., Антропова Ю.Г. и др. Происхождение клеток неоинтимы, образованной в сонных артериях крыс после баллонной ангиопластики // Цитология. 2003. Т. 45. № 7. С. 678–689.

Clowes A.W., Reidy M.A., Clowes M.M. Mechanisms of stenosis after arterial injury // Lab. Invest. 1983a. V. 49. № 2. P. 208–215.

Clowes A. W., Reidy M. A., Clowes M. M. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. Smooth muscle growth in the absence of endothelium // Ibid. 1983b. V. 49. № 3. P. 327–333.

Dzau V.J., Braun-Dullaeus R.S., Sedding D.G. Vascular proliferation and atherosclerosis. New perspectives and therapeutic strategies // Nat. Med. 2002. V. 8. № 11. P. 1249–1256.

Hillebrands J.-L., van den Hurk B.M.H, Klatter F.A. et al. Recipient origin of neointimal vascular smooth muscle cells in cardiac allografts with transplant arteriosclerosis // J. Heart Lung Transplant. 2000. V. 19. № 12. P. 1183–1192.

Hillebrands J.-L., Klatter F.A., Bart M.H. et al. Origin of neointimal endothelium and α -actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis // J. Clin. Invest. 2001. V. 107. № 11. P. 1411–1422.

Hillebrands J.-L., Klatter F.A., Rozing J. Origin of vascular smooth muscle cells and the role of circulating stem cells in transplant arteriosclerosis // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2003. V. 3. P. 380–387.

Kudryashova E., Bashtrikov P., Bochkov V. et al. Expression of adhesion molecule T-cadherin is increased during neointima formation in experimental restenosis // *Histochem. Cell Biol.* 2002. V. 118 № 4. P. 281–290.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s // *Nature.* 1993. V. 362. № 6423. P. 801–809.

Saiura A., Sata M., Hirata Y. et al. Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis // *Nat. Med.* 2001. V. 7. № 4. P. 382–383.

Sata M., Saiura A., Kunisato A. et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis // *Ibid.* 2002. V. 8. № 4. P. 403–409.

Detection of Bone Marrow-Derived Cells in Neointimal Thickening in the Rat Carotid Artery by Nested Polymerase Chain Reaction

O. P. Il'inskaya^{a,b}, Yu. G. Antropova^a, N. I. Kalinina^a, V. A. Mishina^a,
N. V. Radyukhina^a, and E. M. Tararak^a

^a Russian Cardiology Research Complex, ul. 3-ya Cherepkovskaya 15a, Moscow, 121552 Russia

^b Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

e-mail: cardiocell@cardio.ru

Abstract—The bone marrow origin of cells involved in neointimal formation after injury of the luminal surface of the vessel was confirmed by highly sensitive nested polymerase chain reaction on isolated vascular wall cells. The model of intimal hyperplasia after balloon angioplasty of the carotid artery in radiation bone marrow chimeras between male and female Wistar rats was used. The Y chromosomes of rat male donors of the bone marrow for irradiated females were used as a marker of bone marrow-derived cells. This approach demonstrated a bone marrow origin of a large fraction of α -actin-positive (smooth muscle) neointimal cells.

Key words: radiation bone marrow chimeras, balloon angioplasty, neointima, bone marrow-derived cells, nested polymerase chain reaction.