

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 57.085.23

РЕГИОНАЛЬНАЯ ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК АОРТЫ КРЫСЫ

© 2017 г. К. А. Левчук^а, А. Б. Малашичева^{а, б, *}

^аСанкт-Петербургский Государственный университет
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

^бФедеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова
197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

*E-mail: amalashicheva@gmail.com

Поступила в редакцию 06.10.2016 г.

Аорта — это магистральная артерия, которую традиционно воспринимали как сосуд с одинаковыми свойствами по всей длине. Однако в последнее десятилетие были накоплены факты, свидетельствующие о различном эмбриональном происхождении разных участков аорты и, соответственно, о гетерогенности гладкомышечных клеток, составляющих основу сосуда. Прослеживание судьбы гладкомышечных клеток, составляющих основу сосуда, методами генетического маркирования свидетельствует о наличии зависимости ответа клеток на различные воздействия от эмбрионального происхождения данной популяции клеток. Функциональные различия гладкомышечных клеток, составляющих отделы аорты, остаются слабо изученными. Целью данной работы являлось сравнение по функциональным свойствам популяций гладкомышечных клеток, входящих в состав стенки аорты, в ее областях, различных по эмбриональному происхождению. Для этого были получены культуры гладкомышечных клеток из трех участков аорты линейных крыс: восходящая грудная аорта — происходит из клеток нервного гребня, нисходящая грудная аорта — происходит из сомитов, брюшная аорта — происходит из спланхнической мезодермы. Клетки из разных областей аорты были охарактеризованы по содержанию гладкомышечного актина, виментина и SM22 методом иммуноцитохимического окрашивания и иммуноблоттинга. Интенсивность пролиферации клеток исследовали методом построения кривых роста. Мы показали, что все три популяции гладкомышечных клеток, соответствующие различному эмбриональному происхождению, различаются между собой по морфологическим характеристикам и по содержанию гладкомышечного актина и SM22. Показана более интенсивная пролиферация гладкомышечных клеток восходящего отдела аорты по сравнению с клетками нисходящей грудной аорты. Таким образом, функциональные свойства популяций гладкомышечных клеток аорты крысы различны в зависимости от эмбрионального происхождения участка аорты, из которого происходит данная популяция.

Ключевые слова: гладкомышечные клетки, аорта, эмбриональное развитие

DOI: 10.7868/S0475145017030090

ВВЕДЕНИЕ

Аорта — самая крупная артерия позвоночных; в аорте выделяют четыре крупных отдела — восходящий грудной, дуга аорты, нисходящий грудной, брюшной. На функциональную гетерогенность стенки аорты обратили внимание довольно давно. Так, при помощи гетеротопических трансплантаций участков этого сосуда было показано, что брюшной отдел аорты подвержен атеросклеротическому поражению, а грудной — нет (Haimovici, Maier, 1971). С развитием методов тканеспецифичного маркирования было показано, что аорта состоит из гладкомышечных клеток (ГМК), имеющих неодинаковое происхождение. В аорте выделяют 4 участка, имеющие ГМК различного эмбрионального происхождения (Majesky, 2007). Так, базальный корень аорты происходит из вторичного сердечного

поля (Waldo et al., 2005), восходящая аорта и дуга — производные нервного гребня (Jiang et al., 2000). ГМК нисходящей аорты происходят из параксиальной мезодермы (мезодермы сомитов), ГМК брюшной аорты происходят из спланхнической мезодермы (Wasteson et al., 2008).

Один из важных вопросов, возникающий при изучении ГМК аорты — как связано происхождение в эмбриогенезе с функциональными особенностями ГМК данной области. Вопрос этот изучен недостаточно. В связи с упомянутыми региональными различиями в предрасположенности к атерогенезу описаны различия ГМК аорты брюшного и грудного отделов в отношении содержания в них металлопротеаз и их ингибиторов, а также некоторых других белков (Ruddy et al., 2008). Что касается функционирования основных сигнальных путей, важных для функционирования ГМК,

то до недавнего времени было известно лишь, что ГМК грудной и брюшной аорты различаются по ответу на действие таких цитокинов как ангиотензин II и TGF-beta (Topouzis, Majesky 1996). Лишь недавно появились работы, которые вернулись к изучению гетерогенности функционирования сигнальных путей в ГМК аорты в зависимости от эмбрионального происхождения уже на современном уровне. Так, показано, что в аорте ряда млекопитающих наблюдается позиционная экспрессия *Hox*-генов (*Hoxb-10*) в зависимости от эмбрионального происхождения данного участка аорты (Trigueros-Motos et al., 2013). При помощи направленной дифференцировки эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека удалось получить три различные линии ГМК, соответствующие по происхождению нервному гребню, вторичному сердечному полю и сомитам. На таких клетках было показано, что между этими тремя линиями существуют различия в функционировании сигнальных путей, в частности — в ответ на стимуляцию фактором TGF-beta клетки пролиферировали с разной интенсивностью в зависимости от происхождения, а также эти популяции различались по степени активации синтеза специфических мишеней TGF-beta (Cheung et al., 2012). Производные, полученные при дифференцировке ЭСК, все еще не являются прямым отражением происходящего в клеточных популяциях *in vivo* в связи с несовершенством методов дифференцировки, поэтому вопрос о функциональной и морфологической гетерогенности ГМК, происходящих из участков аорты, различающихся по эмбриональному происхождению, остается актуальным. Целью данного исследования было сравнить морфологические и функциональные свойства ГМК аорты крысы, полученных *in vitro* из различных по происхождению участков аорты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы фрагменты восходящего, нисходящего отделов грудной аорты, и фрагменты брюшной аорты лабораторных крыс линии Вистар.

Клеточные культуры

ГМК аорты крыс получали из фрагментов стенки аорты путем ферментативного расщепления при помощи коллагеназы II типа (2 мг/мл, LS004174, Worthington). Клетки выращивали в чашках Петри в условиях 37°C, 95% воздуха, 5% CO₂ в инкубаторе (SANYO MCO-18A1C), в культуральной среде M199, содержащей L-глутамин с добавлением 10% эмбриональной сыворотки коров и 100× пенициллина-стрептомицина.

Исследование уровня пролиферации ГМК аорты

Снятые при помощи трипсина клетки были рассеяны в 24-луночную плату с плотностью 10×10^3 клеток на лунку (5×10^3 клеток/см²). Клетки поочередно снимали трипсином через 2, 4, 6, 8 сут. Подсчет клеток производили в камере Фукса-Розенталя. По полученным данным с помощью программы Excel MS Office были построены графики зависимости количества клеток от прошедшего времени.

Иммуноцитохимическое окрашивание

Клетки растили на покровных стеклах. После 2–3 дней клетки фиксировали в растворе 4% параформальдегида на льду в течение 10 мин. Использовали следующие первичные антитела: α SMA (Santa Cruz) — 1 : 100, виментин (Abcam) — 1 : 1000, SM22 α (Abcam) — 1 : 200; вторичные антитела были конъюгированы с флуоресцентным красителем Alexa fluor 546 и Alexa fluor 488 (Thermo Scientific). Визуализацию окраски производили при помощи флуоресцентного микроскопа Axio Observer D1 (Carl Zeiss). Препараты анализировали с использованием видеосистемы AxioVision (Carl Zeiss).

Анализ содержания специфических белков ГМК методом вестернблоттинга

Для получения белковых экстрактов фрагменты ткани и клетки выдерживали в растворе лизирующего буфера (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS) 1 ч на льду. Для осаждения ДНК пробы центрифугировали при $t = 4^\circ\text{C}$ на скорости 14000 об./мин в течение 10 мин. Измерение концентрации белка в пробах производилось с помощью набора Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce biotechnology, USA) согласно методике, описанной в руководстве. Пробы подверглись электрофорезу по Лэммли с использованием набора для гель-электрофореза BioRad. Окрашивание блота производили по стандартной методике. Проявка полученных результатов осуществлялась при помощи набора SuperSignal@West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific). Визуализацию мембран производили при помощи системы гель-документирования Fusion-Fx7 (Vilber Lourmat). Содержание белков анализировали в программе Fusion (Vilber Lourmat).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что ГМК сосудов развиваются из разных источников в эмбриогенезе, они обладают общими свойствами гладких мышц — сокращение и синтез внеклеточного матрикса, однако функциональные свойства этих клеток могут различаться (Topouzis and Majesky, 1996; Cheung et al.,

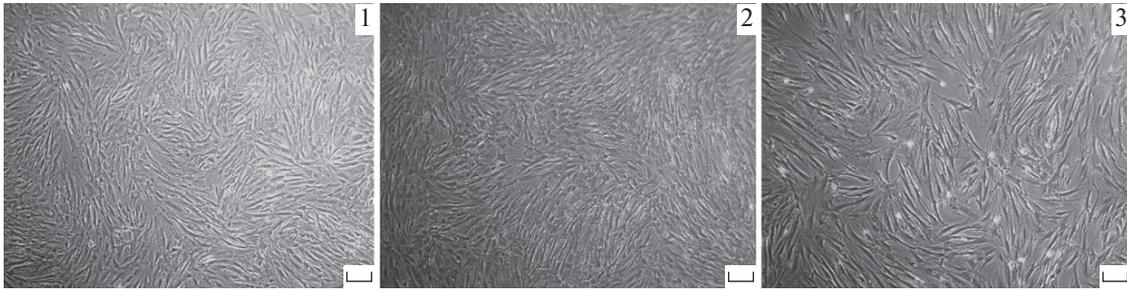


Рис. 1. Фото культур ГМК аорты крысы (световая микроскопия, ув. 50×). 1, 2, 3 – ГМК восходящей, нисходящей грудной, брюшной аорты соответственно.

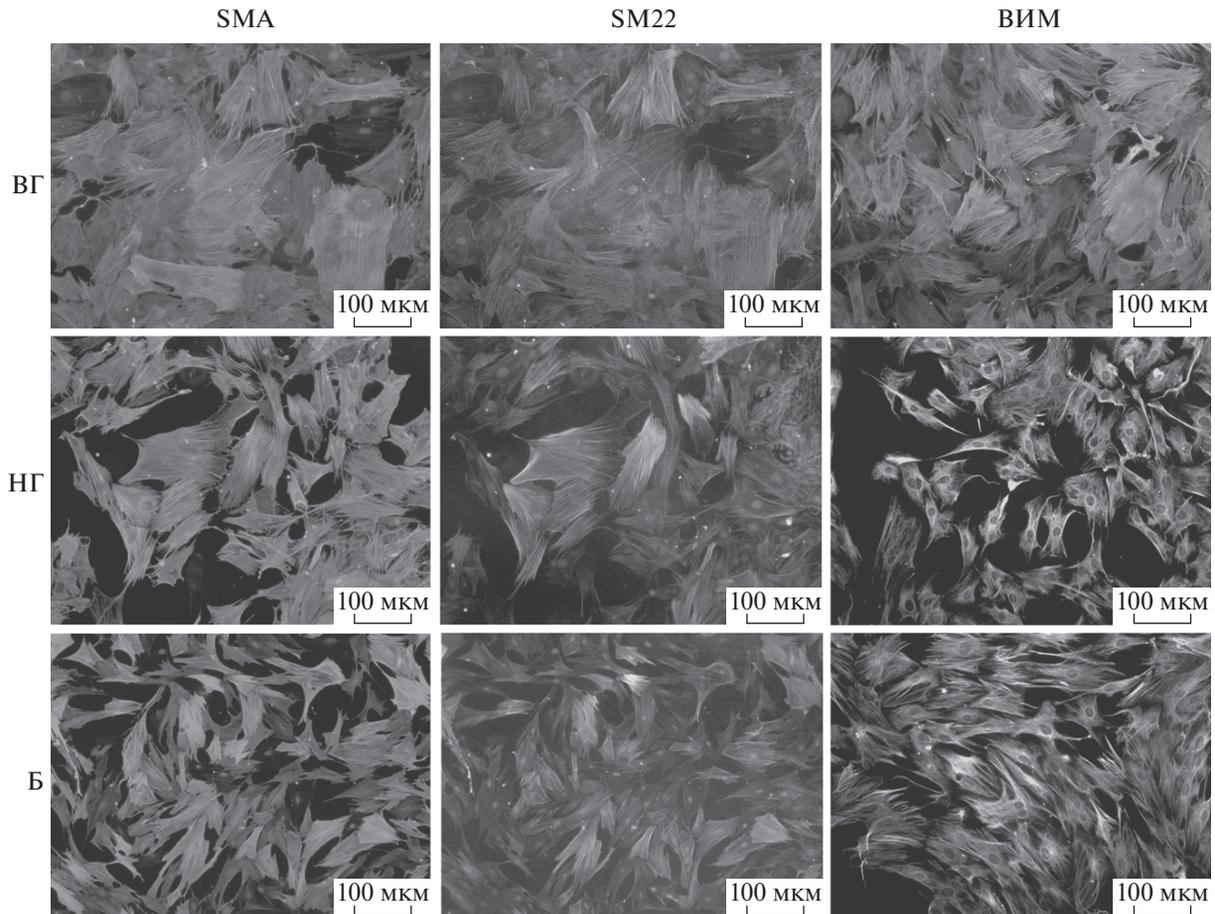


Рис. 2. Иммуноцитохимическая окраска ГМК участков аорты крысы на специфические белки ГМК. ВГ – ГМК восходящей аорты, НГ – ГМК нисходящей грудной аорты, Б – ГМК брюшной аорты; SMA – окрашивание ГМК на гладкомышечный актин, SM22 – окрашивание ГМК на SM22 α ; ВИМ – окрашивание ГМК на виментин.

2012). Для проверки гипотезы о наличии функциональной и морфологической гетерогенности ГМК мы выделили 3 популяции клеток из восходящей аорты и дуги (производные нейроэктодермы), нисходящей грудной аорты (производные сомитов) и брюшной аорты (производные спланхнической мезодермы) крыс (рис. 1). Мы выделяли ГМК этих участков, так как именно они рассматривались в большинстве литературных данных. Важным участ-

ком является также корень аорты, происходящий из вторичного сердечного поля (Waldo et al., 2005), однако он не был доступен для данного исследования из-за своего небольшого размера.

Для изучения морфологических особенностей полученных популяций ГМК аорты крысы мы использовали непрямой метод иммуноокрашивания на белки, специфичные для сокращения ГМК – SMA, SM22 α , виментин (рис. 2). Конфлюентные

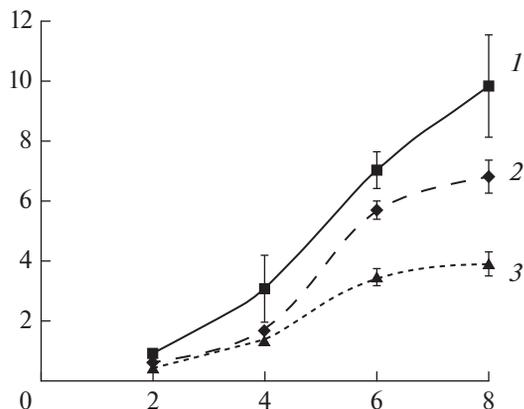


Рис. 3. Кривые роста ГМК стенки восходящей аорты (1), нисходящей грудной аорты (2) и брюшной аорты (3) крысы. По оси абсцисс – сутки культивирования, по оси ординат – кол-во клеток × 10000.

клетки всех участков представляли рост в виде “холм-долина”, как это было описано для данного типа клеток (Touzaris and Majesky, 1996). Получен-

ные популяции ГМК аорты крысы различались морфологически. В первичной культуре ГМК восходящей и нисходящей грудной аорты были эпителиоидной формы, в отличие от ГМК брюшной аорты, которые были веретеновидными. При помощи иммуноцитохимической окраски было подтверждено, что полученные первичные культуры клеток представляют собой ГМК, при этом ГМК восходящей аорты были крупнее клеток остальных исследованных участков аорты.

На следующем этапе мы оценили пролиферативную активность трех популяций ГМК, имеющих различное происхождение (рис. 3), путем построения кривых роста полученных культур. Были проанализированы клетки на пассажах 3–5 культивирования. Мы обнаружили достоверные различия в уровне пролиферации ГМК различного происхождения уже на 2 сут культивирования на всех исследованных пассажах.

Таким образом, три исследованные популяции клеток обладают разной способностью к про-

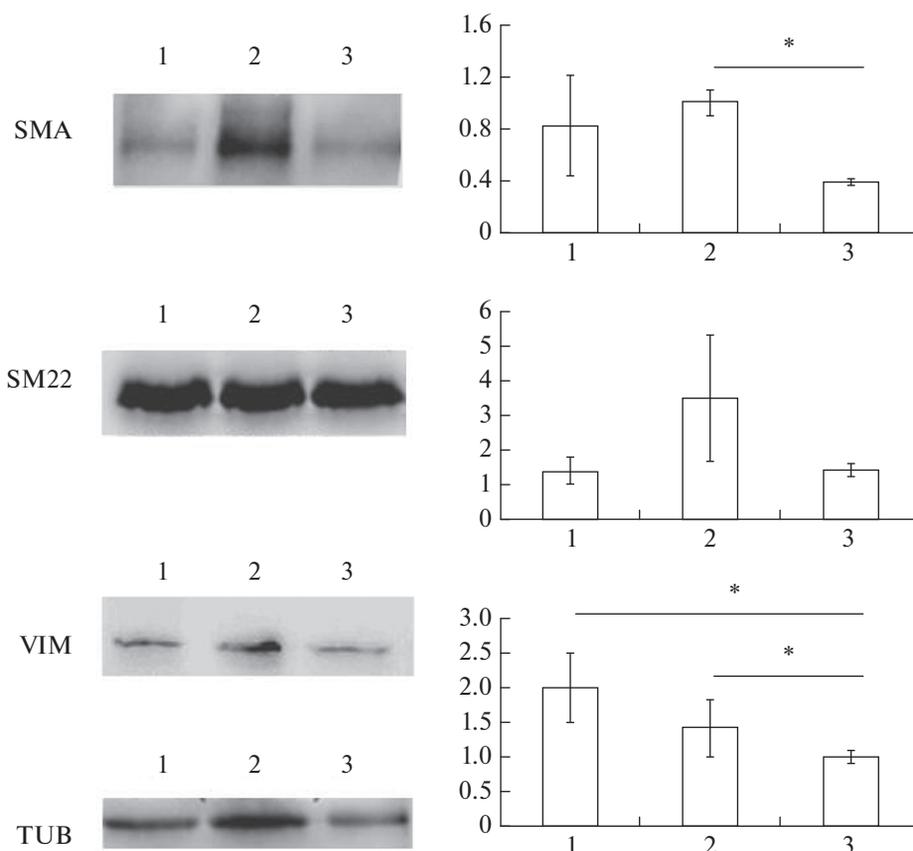


Рис. 4. Сравнение содержания специфических белков ГМК в стенке аорты крысы методом иммуноблоттинга. Слева приведены репрезентативные изображения иммуноблоттов, справа – денситограммы, соответствующие относительному содержанию белка; по оси ординат – относительное количество белка. В качестве референсного белка использован тубулин (TUB). Условные обозначения: 1, 2, 3 – ГМК восходящей, нисходящей грудной, брюшной аорты соответственно; SMA – гладкомышечный актин, SM22 – SM22α; VIM – виментин; звездочкой обозначены статистически значимые различия между группами, согласно критерию Стьюдента; $p < 0.05$.

лиферации и две из них теряют свой пролиферативный потенциал по-разному.

На основании имеющихся данных о гетерогенной структуре ткани на протяжении аорты (Ruddy et al., 2008), мы предположили, что содержание белков, специфичных для ГМК, может различаться в разных участках аорты. Для проверки этого предположения, мы проанализировали содержание ряда специфических белков ГМК — α SMA, виментина, SM22 α и кальпонина — в ткани стенки восходящей аорты, нисходящей грудной аорты и брюшной аорты методом вестернблоттинга. Наименьшее содержание исследуемых белков было обнаружено в брюшной аорте (рис. 4).

Гетерогенность сосудистых ГМК в зависимости от происхождения была описана довольно давно (Le Lièvre and Le Douarin, 1975), однако на сегодняшний день мало работ посвящено исследованию этой проблемы. Данное исследование было нацелено на установление наличия гетерогенности свойств ГМК аорты, учитывая различающееся эмбриональное происхождение популяций.

Мы обнаружили, что ГМК восходящей аорты обладают более высоким пролиферативным потенциалом по сравнению с ГМК нисходящей грудной аорты и брюшной аорты. Вероятно, разные уровни пролиферации ГМК данных регионов можно объяснить не одинаковой, обусловленной происхождением, чувствительностью к митогенам сыворотки, ответ на которые выражается в увеличенной или сниженной пролиферации. В ряде работ одним из таких митогенов являлся TGF- β -1, который увеличивал пролиферацию ГМК нейроэктодермального происхождения, а в культурах мезодермальных ГМК пролиферация в присутствии TGF- β -1 была снижена (Topouzis and Majesky, 1996).

В представляемом исследовании обнаружено, что на протяжении аорты уровень специфических белков ГМК в составе ткани сосуда варьирует. Так, в брюшной аорте уровень всех исследованных белков снижен. Такой результат может быть следствием влияния гемодинамических факторов на смену фенотипа клеток с сократительного на синтез белков внеклеточного матрикса (Hao et al., 2002), а также обусловленного эмбриональным происхождением различия ответа ГМК на содержащиеся в ткани биохимические факторы, в частности цитокины, что приводит к различиям в экспрессии ГМК генов специфических белков SMA, SM22 α . В дополнение, снижение уровня белков дифференцировки ГМК в брюшной аорте может быть результатом сниженной экспрессии *HOXA4* (регулирует созревание и дифференцировку клеток) в этой области (Lillvis et al., 2011), предрасположенной к возникновению атеросклероза и аневризм.

Таким образом, функциональное различие популяций ГМК аорты определяется эмбриональным

происхождением, однако сложность взаимосвязей клеточных ответов и факторов микроокружения требует дополнительных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ailawadi G., Moehle C.W., Pei H. et al. Smooth muscle phenotypic modulation is an early event in aortic aneurysms // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2009. V. 6. № 138. P. 1392–1399.
- Cheung C., Bernardo A.S., Trotter M.W.B. et al. Generation of human vascular smooth muscle subtypes provides insight into embryological origin-dependent disease susceptibility // *Nat. Biotechnol.* 2012. V. 2. № 30. P. 165–173.
- Haimovici H. The role of arterial tissue susceptibility in atherogenesis // *Tex. Heart Inst. J.* 1991. V. 18. № 1. P. 81–83.
- Hao H., Ropraz P., Verin V. et al. Heterogeneity of smooth muscle cell populations cultured from pig coronary artery // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002. V. 22. № 7. P. 1093–1099.
- Jiang X., Rowitch D.H., Soriano P. et al. Fate of the mammalian cardiac neural crest // *Development.* 2000. V. 127. № 8. P. 1607–1616.
- Leroux-Berger M., Queguiner I., MacIel T.T. et al. Pathologic calcification of adult vascular smooth muscle cells differs on their crest or mesodermal embryonic origin // *J. Bone Miner. Res.* 2011. V. 26. № 7. P. 1543–1553.
- Le Lièvre C.S., Le Douarin N.M. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1975. V. 34. № 1. P. 125–154.
- Lillvis J.H., Erdman R., Schworer C.M. et al. Regional expression of *HOXA4* along the aorta and its potential role in human abdominal aortic aneurysms // *BMC Physiol.* 2011. V. 11. № 1. P. 1–9.
- Majesky M.W. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007. V. 27. № 6. P. 1248–1258.
- Rensen S.S., Doevendans P.A., van Eys G.J. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity // *Neth Hear. J.* 2007. V. 15. № 3. P. 100–108.
- Ruddy J.M., Jones J.A., Spinale F.G., Ikonomidis J.S. Regional heterogeneity within the aorta: Relevance to aneurysm disease // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2008. V. 136. № 5. P. 1123–1130.
- Topouzis S., Majesky M.W. Smooth muscle lineage diversity in the chick embryo // *Dev. Biol.* 1996. V. 178. № 2. P. 430–445.
- Trigueros-Motos L., González-Granado J.M., Cheung et al. Embryological-origin-dependent differences in homeobox expression in adult aorta role in regional phenotypic variability and regulation of NF- κ B activity // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2013. V. 33. № 6. P. 1248–1256.
- Waldo K.L., Hutson M.R., Ward C.C. et al. Secondary heart field contributes myocardium and smooth muscle to the arterial pole of the developing heart // *Dev. Biol.* 2005. V. 281. № 1. P. 78–90.
- Wasteson P., Johansson B.R., Jukkola T. et al. Developmental origin of smooth muscle cells in the descending aorta in mice // *Development.* 2008. V.135. № 10. P. 1823–1832.

Regional Functional Heterogeneity of Aortic Smooth Muscle Cells in Rats

K. A. Levchuk^a and A. B. Malashicheva^{a, b, *}

^a*St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia*

^b*Almazov Federal Medical Research Center, St. Petersburg, 197341 Russia*

**e-mail: amalashicheva@gmail.com*

Received October 6, 2016

The aorta is a magistral artery, which has been traditionally looked upon as a vessel whose properties are invariable throughout its length. However, in the most recent decade, there have been accumulated data that provide evidence that different aorta sections arise from different embryonic origins and that the population of smooth muscle cells making up the vessel's wall is, consequently, heterogenic. Tracing the fate of smooth muscle cells, the basic components of the vessel, with the aid of genetic marking methods revealed that the cells' response to various factors is largely determined by the embryonic origin of a certain cell population. However, functional differences between the smooth muscle cells making up different aorta sections remain poorly understood. The aim of the current work was to compare the functional characteristics of the populations of aortic wall smooth muscle cells obtained from the aorta sections differing by their embryonic origin. Towards this end, we obtained smooth muscle cell cultures from the three aorta sections of linear rats, namely, the neural crest derived ascending thoracic aorta, the somites derived descending thoracic aorta, and splanchnic mesoderm derived abdominal aorta. Using immunocytochemistry and Western blotting, the cells from the different regions of aorta were compared on the basis of smooth muscle actin, vimentin, and SM22 content in them. Cell proliferation rate was estimated using the growth curves method. We have demonstrated that the three smooth muscle cell populations arising from different embryonic origins differ in their morphological characteristics as well as by smooth muscle actin and SM22 content. We have shown that smooth muscle cells from the ascending aorta proliferate more actively than the corresponding cells from the descending thoracic aorta. Thus, the functional properties of the populations of rat aortic smooth muscle cells are different and depend on the embryonic origin of the aorta section from which they were obtained.

Keywords: smooth muscle cells, aorta, embryonal development