

18. *Ogunmekan A. O., Hwang P. A.* A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial of D-alpha-tocopheryl acetate (vitamin E), as add-on therapy, for epilepsy in children. *Epilepsia*. 1989; 30:84–89. DOI: 10.1111/j.1528-1157.1989.tb05287.x
19. *Kong Q., Lin C. L. G.* Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010; 67(11):1817–1829. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0277-y>

УДК 616.132-018.61:618.396:599.323.4

¹Серебрякова О. Н., ¹Иванова В. В., ^{1,2}Мильто И. В.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГЛАДКИХ МИОЦИТОВ СТЕНКИ АОРТЫ ПРЕЖДЕВРЕМЕННО РОЖДЕННЫХ КРЫС

¹Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России,
Томск, Российская Федерация

²Северский биофизический научный центр ФМБА России, Северск,
Российская Федерация

Аннотация. Целью исследования является изучение морфофункциональных особенностей гладких миоцитов средней оболочки грудного отдела нисходящей части аорты крыс, рожденных на 12 и 24 часа раньше срока.

Методика работы заключается в иммуногистохимическом и морфометрическом анализе гладких миоцитов стенки грудного отдела аорты крыс, рожденных преждевременно.

Контингент испытуемых: 53 крысы Вистар, рожденные на 12 и 24 часа раньше срока, а также доношенные особи.

Основные результаты работы показали, что преждевременное рождение приводит к более поздней смене фенотипа гладких миоцитов с синтетического на сократительный, что, в свою очередь, может привести к формированию патологии сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: аорта, крысы, преждевременное рождение, гладкие миоциты.

¹Serebryakova O. N., ¹Ivanova V. V., ^{1,2}Milto I. V.

MORPHOFUNCTIONAL FEATURES OF SMOOTH MUSCLE CELLS IN AORTA WALL OF PREMATURE BORN RATS

¹Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

²Seversk Biophysical Research Center of the Federal Medical and Biological Agency
of Russia, Seversk, Russian Federation

Abstract. The aim of the work is to study the morphological and functional features of smooth myocytes of the middle layer of the thoracic descending aorta of rats born 12 and 24 hours prematurely.

The methodology of the work consists in immunohistochemical and morphometric analysis of smooth muscle cells of the thoracic aorta wall of rats born prematurely.

The contingent of the subjects was 53 Wistar rats, born 12 and 24 hours ahead of time, as well as full-term individuals.

The main results of the work showed that preterm birth leads to a later change in the phenotype of smooth muscle cells from synthetic to contractile, which in turn can lead to the formation of pathologies of the cardiovascular system.

Keywords: aorta, rats, premature birth, smooth muscle cells.

ВВЕДЕНИЕ

Преждевременное рождение оказывает на развивающийся организм ряд негативных эффектов, влияющих на все системы органов, в частности, на сердечно-сосудистую систему, подвергающуюся адаптивным изменениям вследствие сокращения пренатального периода развития. Вследствие недостаточности пренатального эласто- и коллагеногенеза, стенка сосудов преждевременно рожденных животных нуждается в дополнительном источнике эластина и коллагена. Гладкие миоциты в стенке сосуда обладают рядом функций, начиная с синтеза компонентов внеклеточного матрикса, преобладающего в пренатальном периоде онтогенеза и на ранних этапах постнатального периода онтогенеза, заканчивая сократительной функцией на более поздних этапах [1]. Гладким миоцитам в стенке сосудов свойственна фенотипическая пластичность. Эти клетки не дифференцируются окончательно, а могут переходить от покоящегося (преимущественно сократительного) фенотипа к пролиферативному (преимущественно синтетическому) фенотипу в ответ на различные физиологические или патологические стимулы. Пролиферирующие гладкие миоциты имеют эпителиоидную форму, обладают высокой способностью к пролиферации и миграции, экспрессируют сниженные уровни сократительных белков и более высокие уровни синтетических белков (например, виментина, остеопонтина и кальций-связывающего белка) и синтезируют большое количество компонентов внеклеточного матрикса [2]. Полностью дифференцированные, покоящиеся гладкие миоциты имеют веретеновидную форму и экспрессируют высокие уровни сократительных белков (таких как α -гладкомышечный актин, киназа легких цепей миозина и гладкомышечный кальпонин), необходимых для выполнения сократительной функции. Изменения экспрессии сократительных и синтетических белков гладких миоцитов часто используют для маркировки их фенотипов [3, 4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводили на 53 крысах-самцах Вистар, из которых формировали 3 группы: доношенные животные (22 суток беременности, $n = 19$), недоношенные на 12 часов крысы (21,5 суток беременности, $n = 18$) и недоношенные на 24 часа крысы (21 сутки беременности, $n = 16$). Для получения потомства к самкам крыс (3-месячные весом 180 ± 20 г), находившимся на стадии проэструса полового цикла, подсаживали на ночь самцов крыс Вистар (2-месячные весом 180 ± 20 г). Отсчет первых суток беременности начинали с утра, при обнаружении во влагалищном мазке сперматозоидов.

Индукцию преждевременных родов осуществляли подкожным введением самкам крыс мифепристона (1 мл, 10 мг на 1 кг массы тела; Sigma-Aldrich, США)

за 48 часов (группа недоношенных на 24 часов) и 36 часов (группа недоношенных на 12 часов) до предполагаемого срока родов. Выведение потомства из эксперимента осуществляли на 1-ю, 8-ю и 24-ю неделю постнатального периода онтогенеза асфиксией CO_2 . Животных содержали в стандартных условиях вивария с 12-часовой продолжительностью светового дня и свободным доступом к пище и воде. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (№ 8473/1 от 30.11.2020).

Фрагменты грудного отдела нисходящей части аорты фиксировали в 10%-ном водном формалине (БиоВитрум, Россия) в течение 24 часов при температуре $+4^\circ\text{C}$, после чего промывали в проточной воде, проводили через Isoprep (БиоВитрум, Россия) и пропитывали в парафиновой смеси HISTOMIX (БиоВитрум, Россия). На срезах толщиной 4 мкм непрямым пероксидазным методом выявляли виментин и альфа-гладкомышечный актин. После депарафинизации срезов проводили высокотемпературную демаскировку антигенов в цитратном буфере (0,01 М; $\text{pH} = 6,0$). Во влажной камере на срезы наносили первичные антитела: моноклональные мышинные антитела Anti-Vimentin antibody (Leica, UK, 1:200, 45 мин) и поликлональные кроличьи Anti-alpha smooth muscle Actin antibody (Abcam, UK, 1:150, 45 мин). После постановки иммуногистохимической реакции ядра докрашивали гематоксилином Джилла. В 1 мм^2 поперечного среза стенки грудного отдела нисходящей части аорты крыс подсчитывали количество виментин-позитивных и альфа-гладкомышечных актин-позитивных клеток и оценивали интенсивность цитоплазматического иммунопозитивного окрашивания в них.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Количество виментин-позитивных гладких миоцитов в стенке грудного отдела нисходящей части аорты уменьшается в несколько раз в течение эксперимента. Интенсивность иммунопозитивного окрашивания также уменьшается с выраженной на 1-й неделе эксперимента до слабой к 24-й неделе у крыс всех групп (рис. 1). Количество виментин-позитивных гладких миоцитов в средней оболочке стенки грудного отдела нисходящей части аорты преждевременно рожденных крыс больше на протяжении всего эксперимента по сравнению с доношенными особями на аналогичные сроки (табл. 1).

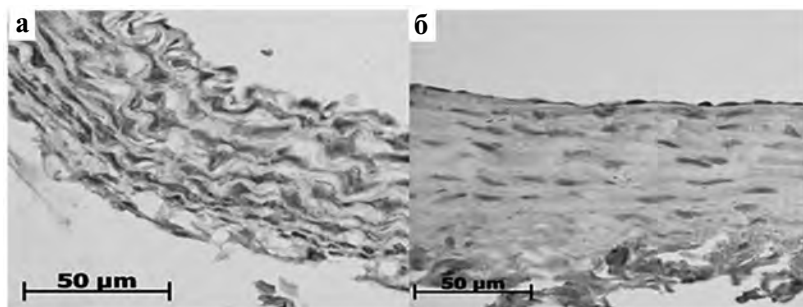


Рис. 1. Стенка грудного отдела нисходящей части аорты доношенных крыс: а — 1 неделя эксперимента; б — 24 неделя эксперимента. Виментин-позитивное окрашивание гладких миоцитов и эндотелиоцитов. Иммуногистохимическая реакция на виментин с докраской гематоксилином Джилла

Таблица 1

КОЛИЧЕСТВО ВИМЕНТИН-ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК В СТЕНКЕ
ГРУДНОГО ОТДЕЛА НИСХОДЯЩЕЙ ЧАСТИ АОРТЫ КРЫС В 1 мм² СРЕЗА,
шт./мм², МЕ(Q1;Q3)

Экспериментальная группа	Срок эксперимента, неделя		
	1	8	24
Доношенные животные	461,2 (447; 472)	81,8 (77; 85) ^a	33,8 (23; 40)
Недоношенные на 12 часов	625,6 (601; 651) ^b	223,4 (208; 240) ^{a, b}	95,4 (94; 100) ^{a, b}
Недоношенные на 24 часов	622,8 (588; 660) ^b	207,2 (187; 236) ^{a, b}	87,6 (76; 92) ^{a, b}

Результаты представлены в виде медианы, в скобках указаны значения нижнего и верхнего квартилей (Q1; Q3): a — отличие от показателя предыдущего срока этой же группы; b — отличие от соответствующего показателя доношенных животных; c — отличие от соответствующего показателя крыс недоношенных на 12 часов. $p < 0,005$.

На 8-ю неделю эксперимента в средней оболочке стенки грудного отдела нисходящей части аорты доношенных крыс слабое иммунопозитивное окрашивание на виментин выявляется в гладких миоцитах, расположенных под внутренней эластической мембраной, тогда как у недоношенных животных выраженная виментин-позитивная реакция гладких миоцитов определяется на всем протяжении средней оболочки в аналогичные сроки (рис. 2). Продление периода синтетической активности гладких миоцитов в стенке аорты может негативно влиять на структурно-функциональное состояние аорты [5].

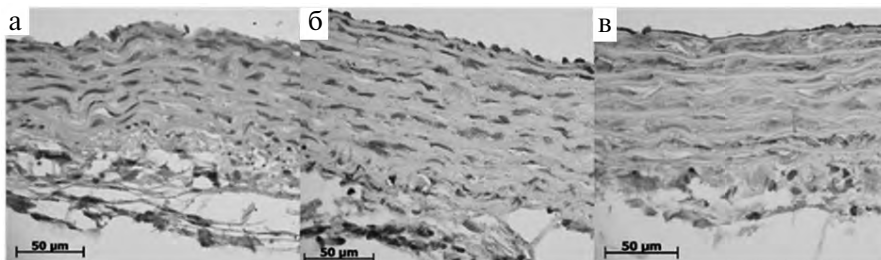


Рис. 2. Стенка грудного отдела нисходящей части аорты крыс на 8-ю неделю эксперимента: а — доношенные животные; б — крысы, рожденные на 12 часов раньше срока; в — крысы, рожденные на 24 часа раньше срока. Виментин-позитивное окрашивание гладких миоцитов и эндотелиоцитов. Иммуногистохимическая реакция на виментин с докраской гематоксилином Джилла

Иммунопозитивное цитоплазматическое окрашивание на альфа-гладкомышечный актин определяется в 100% гладких миоцитов стенки грудного отдела нисходящей части аорты крыс всех групп. Интенсивность альфа-гладкомышечного актин-позитивного окрашивания нарастает в течение эксперимента со слабой в 1-ю неделю до выраженной к 24-й неделе эксперимента у крыс всех групп (рис. 3). У преждевременно рожденных крыс интенсивность иммунопозитивного окрашивания в 1-ю неделю эксперимента представляется менее выраженной,

чем у доношенных особей. Увеличение интенсивности альфа-гладкомышечного актин-позитивного окрашивания в течение эксперимента, вероятно, связано с переходом гладких миоцитов стенки аорты на преимущественно сократительный фенотип [6].

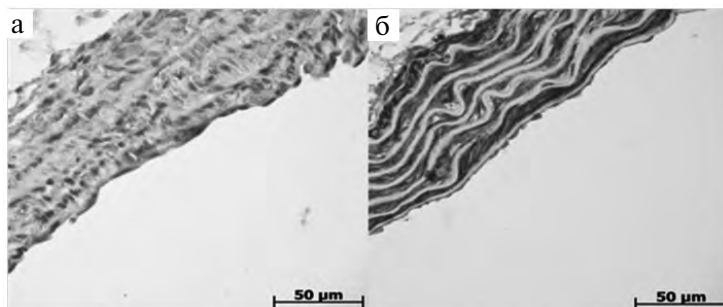


Рис. 3. Стенка грудного отдела нисходящей части аорты недоношенных на 12 часов крыс: а — 1-я неделя эксперимента; б — 24-я неделя эксперимента. Альфа-гладкомышечный актин-позитивное цитоплазматическое окрашивание гладких миоцитов.

Иммуногистохимическая реакция на альфа-гладкомышечный актин с докраской гематоксилином Джилла

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Преждевременное рождение замедляет смену фенотипа гладких миоцитов в средней оболочке стенки грудного отдела нисходящей части аорты с преимущественно синтетического на преимущественно сократительный, что может оказывать неблагоприятные эффекты на состояние организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lesauskaite V., Tanganelli P., Sassi C., et al.* Smooth muscle cells of the media in the dilatative pathology of ascending thoracic aorta: morphology, immunoreactivity for osteopontin, matrix metalloproteinases, and their inhibitors. *Human pathology.* 2001; 32:1003–1011.
2. *Tang H. Y., Chen A. Q., Zhang H., et al.* Vascular smooth muscle cells phenotypic switching in cardiovascular diseases. *Cell.* 2022; 11(24):40–60.
3. *Cao G., Xuan X., Hu J., et al.* How vascular smooth muscle cell phenotype switching contributes to vascular disease. *Cell Communication and Signaling.* 2022; 20:180–195.
4. *Sjolund M., Madsen K., Mark K., Thyberg J.* Phenotype modulation in primary cultures of smooth-muscle cells from rat aorta. *Differentiation.* 1986; 32:173–180.
5. *Bochaton-Piallat M. L., Back M.* Novel concepts for the role of smooth muscle cells in vascular disease: towards a new smooth muscle cell classification. *Cardiovascular Research.* 2018; 114:477–480.
6. *Rensen S. S. M., Doevendans P. A. F. M., van Eys G. J. J. M.* Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Heart Journal.* 2007; 15(3):100–108.