

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК ПРИ АНЕВРИЗМЕ АОРТЫ

© Д. А. Костина,<sup>1</sup> И. В. Воронкина,<sup>2</sup> Л. В. Смагина,<sup>2</sup> Н. Д. Гаврилюк,<sup>1</sup>  
О. М. Моисеева,<sup>1</sup> О. Б. Иртюга,<sup>1</sup> В. Е. Успенский,<sup>1</sup> А. А. Костарева,<sup>1</sup>  
А. Б. Малашичева<sup>3</sup>, \*

<sup>1</sup> Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова,

<sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

и <sup>3</sup> кафедра эмбриологии С.-Петербургского государственного университета;

\* электронный адрес: [malashicheva\\_ab@almazovcentre.ru](mailto:malashicheva_ab@almazovcentre.ru)

Аневризма аорты развивается в результате сложной последовательности событий, которая изменяет структуру и состав стенки сосуда, в результате чего происходит его патологическое расширение и разрыв. Основными функциональными единицами аорты являются гладкомышечные клетки (ГМК). Биология ГМК при аневризме восходящего отдела грудной аорты (АГА) остается слабоизученной. Целью настоящей работы было изучение функциональных изменений ГМК, полученных от пациентов с АГА и от здоровых доноров. Мы сравнили ткани и клетки, полученные от пациентов и от здоровых доноров, по следующим параметрам: скорость роста ГМК в культуре, скорость их миграции, чувствительность к индукции апоптоза перекисью водорода, содержание белков внеклеточного матрикса (ВКМ) — коллагена, эластина и фибриллина, а также уровень активности матриксных металлопротеаз ММП-2 и ММП-9. Мы показали, что свойства ГМК при аневризме аорты существенно изменены по сравнению с клетками здоровых доноров: скорость пролиферации ГМК пациентов снижена, содержание коллагена, эластина и фибриллина, а также активность ММП2 и ММП9 в тканях аорты и в ГМК аорты изменены при АГА по сравнению со здоровыми донорами. Наблюдаемые различия позволяют предположить важную роль этих изменений в возникновении АГА.

Ключевые слова: аневризма грудной аорты, внеклеточный матрикс, гладкомышечные клетки, матриксные металлопротеазы.

Принятые сокращения: АГА — аневризма восходящего отдела грудной аорты, АБА — аневризма брюшного отдела аорты, БАК — бicuspidальный аортальный клапан, ВКМ — внеклеточный матрикс, ГМК — гладкомышечные клетки, ММП — матриксные металлопротеазы, ТАК — трикуспидальный аортальный клапан.

Аневризма аорты — это патологическое расширение сосуда, при котором его диаметр увеличивается не менее чем на 50 % за счет структурных изменений во всех трех слоях сосудистой стенки. По локализации аневризмы аорты делятся на грудные и брюшные, но различия обусловлены не столько анатомическим расположением аневризмы, сколько механизмами их возникновения. Происхождение клеток, составляющих восходящий и последующие отделы аорты, различное. Так, гладкомышечные клетки (ГМК) брюшного отдела аорты происходят из клеток нервной трубки, а ГМК восходящего отдела аорты ведут свое происхождение от клеток нервного гребня, участвующих также и в формировании большинства отделов самого сердца (Milewicz et al., 2008). В связи с этим причины возникновения аневризм восходящего отдела грудной аорты (АГА) и аневризм брюшной аорты (АБА) также в значительной степени различаются. Традиционно АБА связывают с атеросклерозом, а АГА — с иными причинами. Часто с развитием АГА ассоциированы

врожденные пороки сердца, такие как бicuspidальный (двустворчатый) клапан аорты (БАК) (в норме клапан аорты трехстворчатый или трикуспидальный (ТАК)), а также ряд моногенных заболеваний, связанных с мутацией генов, кодирующих белки внеклеточного матрикса (ВКМ) (El-Namamsy, Yasoub, 2009).

В настоящее время опубликованы работы, подтверждающие наличие изменений ВКМ в составе стенки расширенной аорты при аневризме. Основными белками, которые претерпевают изменения при аневризме аорты, считают фибриллин, эластин и коллаген, а также матриксные металлопротеазы (ММП) (Milewicz et al., 2008). ММП — это семейство зависимых от цинка эндопептидаз, которые продуцируются лейкоцитами и гладкомышечными клетками в пределах стенки аорты и способны деградировать такие белки матрикса, как эластин, коллаген, а также некоторые другие белки, участвующие в поддержании целостности стенки аорты. Особенности экспрессии протеаз ММП-2 и ММП-9 хорошо изучены при

развитии АБА (Longo et al., 2002). Ингибирование ММП при АБА в настоящее время используется в качестве лечебного мероприятия. В связи с этим выяснение роли ММП в патогенезе АГА может иметь значение для разработки возможных терапевтических подходов.

Основными элементами стенки аорты, которые участвуют в синтезе белков ВКМ, ММП и их ингибиторов, являются ГМК. Изменение их свойств в конечном счете может приводить к изменению баланса в белках ВКМ и как следствие — к изменению свойств аорты и патологическому ее расширению — аневризме. Клеточные события, происходящие при развитии АГА, по-прежнему недостаточно изучены.

В связи с этим в настоящей работе изучали функциональные свойства ГМК аорты при АГА и в норме. Исследовали скорость пролиферации *in vitro* и скорость миграции ГМК, способность к индукции апоптоза под действием перекиси водорода; сравнивали уровни белков ВКМ фибриллина, коллагена и эластина и активность ММП-2 и ММП-9 в тканях стенки аорты и ГМК аорты пациентов с АГА и здоровых доноров. Показали, что функциональные свойства ГМК аорты при АГА значительно изменены по сравнению с ГМК аорты здоровых людей. Предполагается, что описанные изменения могут лежать в основе патогенетических изменений ткани аорты при формировании АГА.

### Материал и методика

Культивирование ГМК. Клетки получали из стенки аорты пациентов при проведении хирургических операций по коррекции АГА, либо от здоровых доноров во время мультиорганного заборов для трансплантации по описанной ранее методике (Kirschenlohr et al., 1996). Все пациенты перед оперативным вмешательством подписали информированное согласие, одобренное локальным этическим комитетом ФЦСКЭ им. В. А. Алмазова. Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 20 % эмбриональной телячьей сыворотки, 1 % глутамина и 0.2 % гентамицина (Invitrogen, США). В работе использовали клетки 2—7 пассажей.

Скорость пролиферации ГМК исследовали методом построения кривых роста. Скорость ГМК к миграции исследовали при помощи «скретч-теста»: после того как исследуемые клетки в культуре образовывали монослой, среду меняли на бессывороточную, содержащую гидроксимочевину (10 мМ) для подавления пролиферации, и фактор роста PDGF-BB (10 нг/мл). На дно культуральной чашки, покрытой слоем клеток, наносили царапину и затем через 6 ч подсчитывали количество клеток, оказавшихся на царапине.

Содержание белков ВКМ и ММП в ГМК и фрагментах стенки аорты. Перед началом исследования фрагменты аорты размером 0.5 × 1.0 см гомогенизировали в 500 мкл буфера TBS (0.15 М NaCl и 0.05 М Трис-HCl, pH 7.4) и центрифугировали. Содержание белка в супернатанте оценивали по методу Брэдфорд для стандартизации проб (Bradford, 1976). Активности ММП в супернатанте определяли методом зимографии на желатине в собственной модификации (Воронкина и др., 2002). Гель (10 % акриламида) содержал 0.5 г/мл желатина. Пробы наносили в количестве, соответствующем 10 мкг белка на дорожку. Для выявления положения зон, соответствующих ММП-2 и ММП-9, в качестве маркера

использовали среду, кондиционированную фибробластами линии HT-1080.

Содержание ММП-2, ММП-9 и белков ВКМ (коллагена I типа, фибриллина и эластина) во фрагментах аорты определяли методом иммуноблоттинга. Подготовку проб осуществляли по методу Лэммли (Laemmli, 1970). Электрофорез проводили на 10%-ном полиакриламидном геле. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-C extra, Amersham, США), промывали раствором TBS (0.15 М NaCl и 0.05 М Трис-HCl, pH 7.4) при комнатной температуре, а затем блокировали неспецифическое связывание в 5%-ном растворе обезжиренного молока на TBS. После этого мембрану инкубировали в течение ночи в растворе первых антител (разведение согласно рекомендациям производителя) при 4 °С. Далее мембрану инкубировали в растворе вторых антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой, и обрабатывали раствором для выявления активности щелочной фосфатазы BCIP/NBT (Sigma, США). После проявления окраски мембрану промывали водой и высушивали.

В качестве первых антител использовали антитела к фибриллину, эластину, коллагену I типа, ММП-2 и ММП-9 (Millipore, США), в качестве вторых — антитела, меченные щелочной фосфатазой (Sigma, США).

Для проведения количественного анализа гели и мембраны сканировали, полученные изображения обрабатывали с помощью программы QuantiScan 2.1. Результаты денситометрии представляли в виде гистограмм. Активности ММП-2 и ММП-9 и их содержание выражали в усл. ед., принятых в программе QuantiScan (произведение количества окрашенных пикселей на интенсивность окраски). Для проверки статистической значимости данных использовали парный двухвыборочный *t*-тест Стьюдента. Различия считали достоверными при  $P < 0.05$ .

Определение апоптотических ГМК. Клетки сеяли с плотностью  $10 \cdot 10^3$  кл./см<sup>2</sup>. Через 48 ч к культуральной среде добавляли пероксид водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) до конечной концентрации  $1 \cdot 10^{-3}$  М на 3 ч. Снятые трипсином клетки осаждали центрифугированием при 300 g в течение 5 мин и метили аннексином V, конъюгированным с FITC (Sigma, США). Количественную оценку содержания меченных аннексином V клеток проводили методом проточной цитометрии на приборе Calibur II (BD, США).

### Результаты

Скорость пролиферации и миграции ГМК. При АГА в стенке аорты наблюдаются специфические дегенеративные изменения ткани (Milewicz et al., 2008), сопровождающиеся снижением числа клеток в ткани сосуда. Для того чтобы оценить возможный вклад ГМК в эти изменения, мы сравнили скорость пролиферации и миграции ГМК пациентов и здоровых доноров. В последнее время накоплены данные о том, что АГА — это не одно заболевание, а группа заболеваний с разной этиологией. В частности, генетические исследования последних лет прямо указывают на то, что АГА, сопровождающиеся БАК, отличны от АГА, которые пороком клапана не сопровождаются (Folkersen et al., 2011; Kjellqvist et al., 2013). В связи с этим мы сформировали 3 группы пациентов: пациенты ( $n = 9$ ) с АГА без пороков клапана (АГА-ТАК), от которых были получены ГМК, пациенты ( $n = 7$ ) с АГА, сопровождающейся пороком аортального клапана (АГА-БАК), и здоровые доноры ( $n = 7$ ).

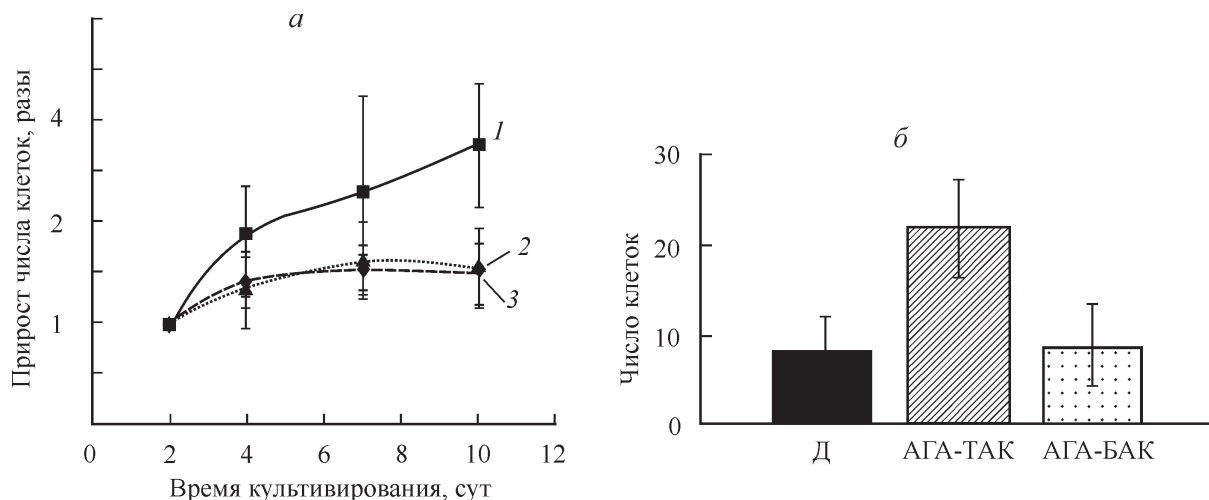


Рис. 1. Скорость роста (а) и миграции (б) гладкомышечных клеток (ГМК) при аневризме аорты и в норме.

а — ГМК из стенки аорты: здоровых доноров (кривая 1), при АГА-ТАК (кривая 2) и при АГА-БАК (кривая 3); показан прирост числа клеток за 2 сут культивирования. б — количество мигрировавших клеток в скретч-тесте. АГА-ТАК — аневризма аорты с трикуспидальным клапаном аорты, АГА-БАК — аневризма аорты с бicuspidальным клапаном аорты, Д — здоровые доноры; вертикальными отрезками показаны величины стандартного отклонения.

Скорость пролиферации ГМК исследовали, сравнивая кривые роста клеток в культуре. Результаты представлены на рис. 1, а. Рисунок показывает, что скорость пролиферации ГМК пациентов с АГА снижена по сравнению с клетками здоровых доноров независимо от того, сопровождается АГА пороком клапана или нет. Скорость миграции ГМК исследовали с помощью скретч-теста (рис. 1, б). Скорость миграции ГМК в случае АГА-ТАК выше, чем ГМК от здоровых доноров. Однако мы не наблюдали достоверных различий в скорости миграции ГМК при АГА-БАК и ГМК здоровых доноров. Эти результаты согласуются с полученными ранее генетическими данными о том, что АГА-ТАК и АГА-БАК представляют собой разные патологии.

Таким образом, одной из причин снижения числа клеток, составляющих стенку аорты при АГА, может являться снижение скорости пролиферации ГМК, составляющих стенку аорты. При этом наблюдаемое повышение скорости миграции ГМК при АГА-ТАК не влияет на картину снижения числа клеток в ткани аорты пациентов и может быть вызвано провоспалительными процессами, имеющими место при АГА-ТАК (Milewicz et al., 2008).

Апоптоз ГМК под действием  $H_2O_2$ . К наблюдаемому при АГА снижению числа клеток в стенке аорты может приводить повышенный уровень апоптоза в популяции клеток, составляющих стенку сосуда. Действительно, при исследовании поврежденных тканей при АГА выявляют повышенное по сравнению с нормой содержание клеток, позитивных по маркеру апоптоза — двухнитевым разрывам ДНК (El-Namamsy, Yasoub, 2009). Кроме того, была предположена роль окислительного стресса в возникновении АБА (McCormick et al., 2007) и АГА (Liao et al., 2008). В связи с этим мы предположили, что уровень апоптоза ГМК может различаться у пациентов и здоровых людей как при обычном культивировании этих клеток, так и в ответ на окислительный стресс. Для проверки этого предположения мы сравнили количество клеток, меченных аннексином V, в культуре ГМК, полученной от пациентов с АГА, и в ГМК здоровых доноров (рис. 2, а, в). Оказалось, что доля ГМК, меченных аннексином V, от

пациентов выше, чем от здоровых доноров, и не зависит от того, сопровождается АГА измененным клапаном или нет.

Окислительный стресс индуцировали добавлением в среду культивирования ГМК  $H_2O_2$ . Полученные данные (рис. 2, б, в) свидетельствуют о том, что степень индукции апоптоза значительно выше в клетках доноров, чем в клетках пациентов с АГА. Снижение степени индукции апоптоза, вызванного  $H_2O_2$ , было примерно одинаковым в группах АГА-ТАК и АГА-БАК. Таким образом, можно говорить о том, что способность ГМК вступать в апоптоз под действием  $H_2O_2$  снижена при АГА.

Анализ содержания белков матрикса и ММП в тканях и клетках при аневризме аорты. Дегенеративные изменения ткани, наблюдаемые при АГА, сопровождаются изменением структуры и уровня ряда белков ВКМ. Для того чтобы оценить вклад ГМК непосредственно в синтез белков ВКМ (эластина, фибриллина и коллагена) в пределах стенки аорты, методом Вестерн-блоттинга в тканях, ГМК и среде культивирования ГМК оценивали их количество (рис. 3, а). В образцах тканей обнаружены достоверные различия в содержании эластина и фибриллина между пациентами и здоровыми донорами: содержание эластина и фибриллина снижено в тканях пациентов с АГА как в случае АГА-ТАК, так и при АГА-БАК. В ГМК понижается содержание эластина лишь в группе АГА-ТАК, но не АГА-БАК. В среде культивирования ГМК снижаются уровень фибриллина при АГА-БАК и уровень эластина при АГА-ТАК. Таким образом, уровень эластина снижается в тканях пациентов с АГА-ТАК (по сравнению со здоровыми донорами), что сопровождается также снижением его уровня в ГМК и в среде их культивирования. Это указывает на то, что ГМК могут являться ключевым клеточным компонентом, синтезирующим сниженное количество эластина при АГА-ТАК. Для фибриллина и коллагена такой однозначной закономерности получить не удалось.

ММП-2 и ММП-9 способны расщеплять белки ВКМ эластин и коллагены. Ранее были получены данные о возможном повышении активности этих ММП при АГА, од-

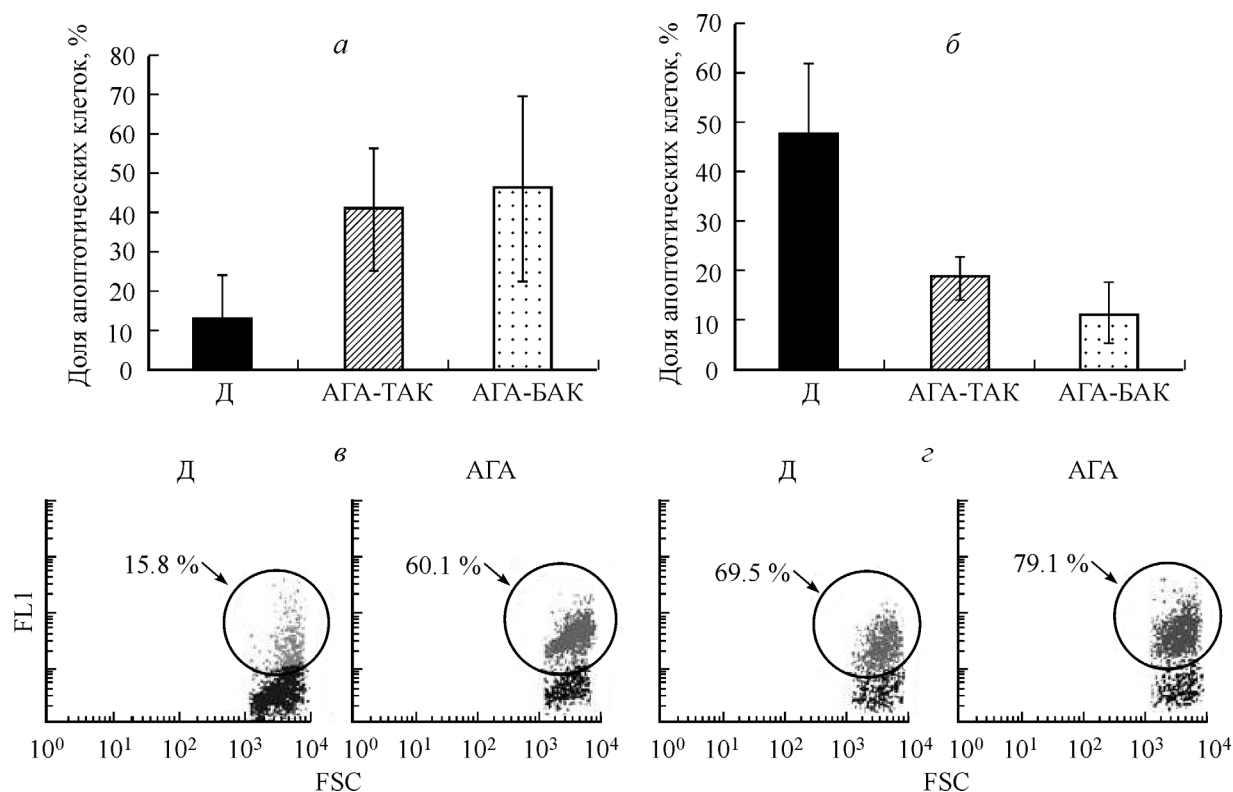


Рис. 2. Апоптоз в популяциях ГМК, полученных от пациентов с АГА и от здоровых доноров.

*а* — уровень апоптоза, выявляемого с помощью аннексина V при культивировании ГМК. *б* — индукция апоптоза, вызванного действием 10 мМ  $H_2O_2$ , в ГМК при АГА и у здоровых доноров; показана доля клеток, меченных аннексином V, по отношению к контролю, принятому за 100 %. *в, г* — примеры гистограмм, получаемых методом проточной цитометрии, для контрольных и апоптотических клеток соответственно; *цифры* показывают долю клеток, меченных аннексином V. Обозначения те же, что и на рис. 1.

нако роль этих ферментов в возникновении АГА остается спорной, кроме того, остается открытым вопрос о том, какие именно клетки в составе стенки аорты синтезируют эти ферменты (Theruvath et al., 2012). В связи с этим мы оценили уровни активности ММП-2 и ММП-9 в тканях, ГМК и среде культивирования ГМК в группах АГА-ТАК и АГА-БАК в сравнении со здоровыми донорами (рис. 3, б). Активность латентной (лат) и активной (акт) форм ММП-2 и ММП-9 оценивали методом зимографии. Согласно полученным данным, активность ММП-9 в ГМК и среде культивирования ГМК повышена в обеих группах пациентов с АГА по сравнению со здоровыми донорами, что коррелирует с выявленным нами снижением уровня эластина, а также с гипотезой о возможном значении повышения уровня активности ММП-9 в патогенезе АГА. Для ММП-2 таких однозначных результатов получить не удалось (рис. 3, б).

### Обсуждение

Аневризма восходящего отдела грудной аорты в ряде случаев сопровождается сопутствующими пороками развития сердца, в частности пороком клапана — БАК. В то же время у части пациентов никаких дополнительных пороков не обнаруживается, и аневризма формируется на фоне ТАК. В последнее время опубликованы работы, доказывающие, что генные профили образцов аорты у пациентов с АГА при БАК и ТАК различаются, что указы-

вает на различную этиологию этих АГА (Folkersen et al., 2011; Kjellqvist et al., 2013). Исследования, проведенные на ГМК с изучением описанной патологии, практически отсутствуют, основная масса исследований до настоящего времени проведена на целых тканях. Лишь в одной недавней работе исследовали некоторые свойства ГМК, происходящих из стенки аорты пациентов с АГА (Blunder et al., 2012).

По нашим данным, скорость пролиферации ГМК снижена в обеих исследуемых группах пациентов (АГА-ТАК и АГА-БАК). Представленные данные согласуются с данными других авторов о том, что при АГА ГМК аорты имеют сниженный пролиферативный потенциал как в случае с БАК, так и в случае с ТАК. Недавно было опубликовано похожее исследование (Blunder et al., 2012), в котором показано, что клетки, происходящие от пациентов с АГА, имеют сниженный пролиферативный потенциал по сравнению с клетками от здоровых доноров. Однако в цитируемой работе авторы приводят анализ роста ГМК при АГА лишь для группы АГА-БАК и здоровых доноров, так как им не удалось получить достаточное количество клеток для анализа из стенки аорты при АГА-ТАК. Таким образом, наши данные и данные других авторов (Blunder et al., 2012) сходны и говорят о том, что при АГА ГМК аорты имеют сниженный пролиферативный потенциал как в случае БАК (Blunder et al., 2012), так и в случае ТАК (настоящие данные). Этот факт объясняет описываемое в других работах (El-Hamamsy, Yasoub, 2009) наблюдение о том, что количество ГМК

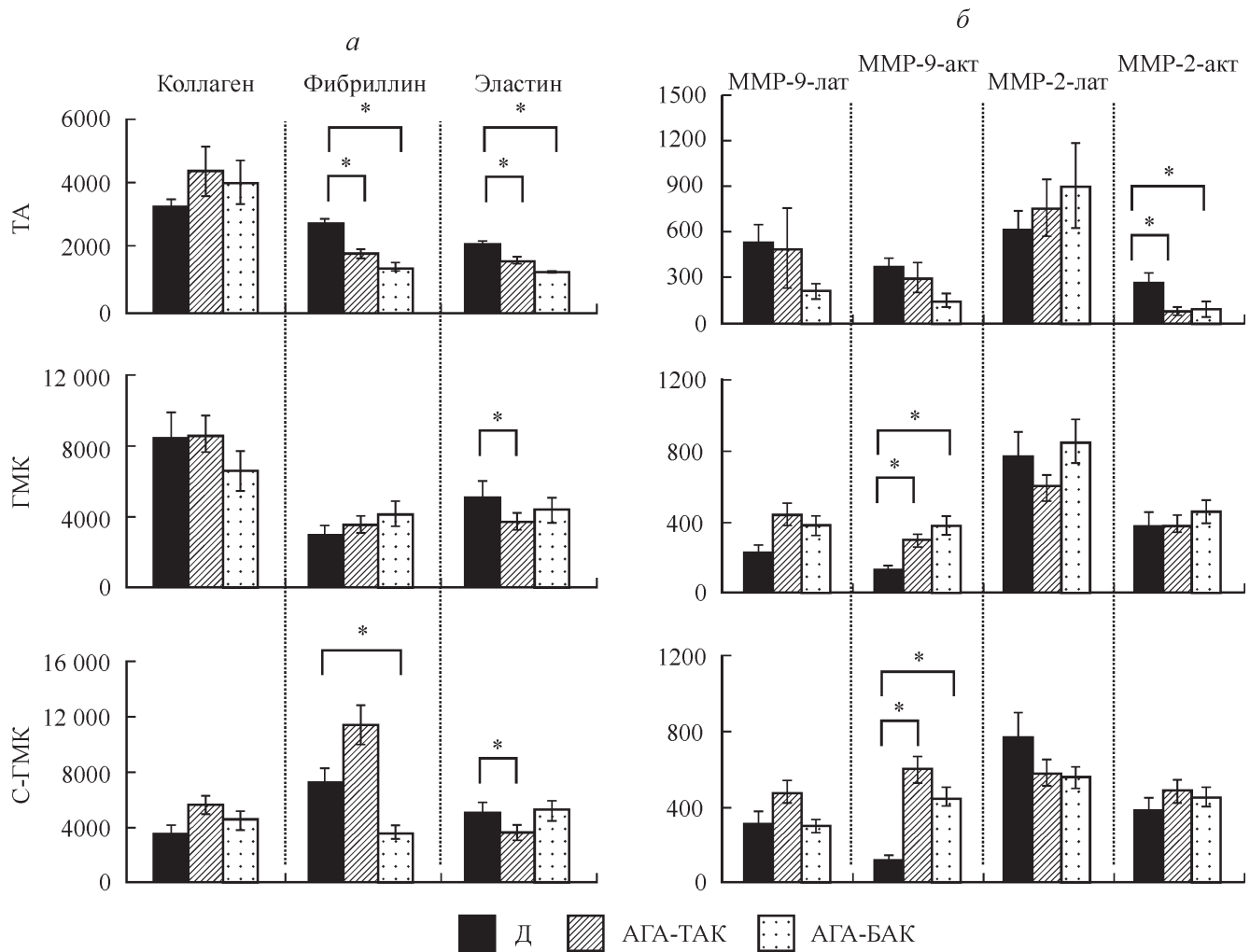


Рис. 3. Содержание белков ВКМ и активность матричных металлопротеаз в тканях аорты (ТА), ГМК и в среде культивирования ГМК (С-ГМК) при АГА и в норме.

По вертикали — количество белка (а) и активность ММП (б), отн. ед. Звездочкой показаны достоверные различия при  $P < 0.05$ . Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

значительно снижено в образцах стенки аорты у пациентов с АГА по сравнению со здоровыми донорами.

Несмотря на схожесть симптомов, у пациентов с ТАК и БАК при аневризме грудной аорты скорости миграции их ГМК в культуре, согласно полученным нами данным, различаются. Однако повышенная скорость миграции у ГМК в случае АГА-ТАК вряд ли может рассматриваться как причина формирования аневризмы. Известно, что при аневризмах с трехстворчатым клапаном в поврежденной ткани имеется большое количество лимфоцитов, продуцирующих провоспалительные цитокины (Foelkersen et al., 2012), что в свою очередь может способствовать усилению миграционных свойств клеток. Напротив, при АГА-БАК повышения уровня провоспалительных цитокинов нет, соответственно миграция ГМК при этом не усиливается. Таким образом, полученные результаты подтверждают предположение о том, что АГА-БАК и АГА-ТАК — это различные заболевания и свойства ГМК при этих двух заболеваниях не идентичны.

Повышенный уровень апоптоза ГМК в культуре при АГА, показанный нами и для АГА-ТАК, и для АГА-БАК, согласуется с данными, полученными ранее другими ис-

следованиями на тканях (Della Corte et al., 2008). Из представленных результатов следует, что в популяции ГМК пациентов с АГА уровень апоптоза выше по сравнению с популяцией донорских ГМК. И это внутренняя характеристика ГМК от пациентов с АГА, которая выявляется даже в отсутствие непосредственного влияния ВКМ и других компонентов стенки аорты. В то же время степень индукции апоптоза под действием  $H_2O_2$  у ГМК при АГА говорит об их относительной устойчивости к окислительному стрессу. Эти данные согласуются с результатами исследования (Mohamed et al., 2010), в котором авторы не обнаружили корреляции между диаметром аневризмальной аорты при наличии БАК и способностью ГМК вступать в апоптоз под действием  $H_2O_2$ . Что касается различий между ГМК при АГА-БАК и ГМК при АГА-ТАК, то по способности к индукции апоптоза в ответ на окислительный стресс эти две группы пациентов не различаются.

Одной из задач работы было исследовать содержание белков ВКМ и активности ММП-2 и ММП-9 в образцах стенки аорты и в выделенных из аорты ГМК при АГА и в норме, так как было показано, что содержание именно

этих белков изменено в стенке аорты у пациентов с аневризмой аорты (El-Hamamsy, Yacoub, 2009).

Поддержание соотношения белков внеклеточного матрикса, а именно эластина, фибриллина и коллагена, важно с точки зрения нормального функционирования стенки аорты. Поэтому нам представлялось важным сопоставить уровень вышеперечисленных белков в нативной стенке аорты с уровнем, выявляемым в ГМК и в среде их культивирования. Нами выявлено снижение уровня эластина в образцах тканей в обеих исследованных группах аневризм, однако в клеточных экстрактах и в среде культивирования удалось вывить снижение уровня эластина лишь в группе АГА с нормальным клапаном. По данным других авторов, напротив, содержание эластина было снижено только в образцах стенки аорты при АГА, сопровождаемой БАК, но не ТАК (LeMaire et al., 2005). Наблюдаемые различия с результатами, полученными другими авторами, можно объяснить тем, что мы исследовали содержание изучаемых белков методом иммуноблотинга, т. е. анализировали тотальный лизат клеток и стенки аорты, а в цитируемой работе (LeMaire et al., 2005) уровень белков оценивали визуально на гистологических срезах при иммуногистохимической окраске на соответствующие белки.

Увеличение содержания коллагена в стенке аорты при АГА согласуется с данными других авторов (Ikonmidis et al., 2007). По нашим данным, содержание фибриллина снижено в стенках аорты при аневризме; однако это снижение не коррелирует с результатами, полученными для ГМК и их культуральной среды.

Из полученных данных возникает вопрос о том, насколько синтез изучаемых белков ВКМ осуществляется ГМК аорты. Существуют ли другие типы клеток, которые синтезируют коллаген и другие белки матрикса? В частности, имеется работа, показывающая, что эту функцию могут выполнять фибробласты (Jones et al., 2010). В этой работе, выполненной на мышах, подтверждена высокая степень сходства между фибробластами и ГМК. Есть также работы, показывающие переход этих типов клеток друг в друга (Forte et al., 2010; Jones et al., 2010). Очевидно, что данный вопрос нуждается в более детальном дальнейшем исследовании.

Содержание ММП при аневризмах аорты изучали и ранее (см. обзор: Theruvath et al., 2012), в том числе и мы (Иртюга и др., 2013). Но не было исследований, параллельно анализирующих уровни ММП и расщепляемых ими белков (коллагена, эластина и фибриллина) в тканях аорты (in vivo) и в первичной культуре ГМК, выделенных из стенки аорты при АГА (in vitro). В некоторых исследованиях показано увеличение ММП-2 (Ikonmidis et al., 2007) при аневризме аорты, тогда как в других отмечено, что ММП-2 при АГА-ТАК не увеличивается (LeMaire et al., 2005). Наши результаты в отношении ММП-2 совпадают с данными из литературы (LeMaire et al., 2005). Мы не наблюдали различий и в уровне активности ММП-9 в тканях аорты при аневризме и в норме. Однако в нашей работе активность ММП-9 in vitro возрастала при аневризме как в ГМК, так и в среде культивирования, что указывает на возможное участие ММП в патогенезе АГА.

Согласно полученным данным, функциональные свойства ГМК при аневризме аорты изменены как в случае аневризм, ассоциированных с БАК, так и в случае изолированных форм заболевания. Существенные различия свойств ГМК клеток пациентов с БАК и ТАК подтверждают выдвинутую недавно гипотезу о том, что ме-

ханизмы возникновения аневризм аорты в двух этих группах различны. В настоящее время основным ведущим механизмом патогенеза АГА признают изменения в функционировании сигнального пути TGF-beta (Lindsay, Dietz, 2011; Малашичева и др., 2013). Изучение особенностей функционирования этого сигнального пути в ГМК аорты в связи с данными настоящей работы относительно изменений свойств ГМК при аневризме является одним из дальнейших направлений нашего исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007—2013 годы» (Гос. контракт № 11.519.11.2018 от 21.10.2011) и ФЦП «Кадры» (ГК П1062 от 10.03.2011, соглашение № 8120 от 23.10.2012).

### Список литературы

- Воронкина И. В., Харисов А. М., Блинова М. И., Парамонов Б. А., Потюкин И. Л., Пинаев Г. П. 2002. Модель «воздушного пузыря» у мышей и изучение протеолитической активности раневого экссудата. Цитология. 44 (3) : 270—276.
- Иртюга О. Б., Гаврилюк Н. Д., Воронкина И. В., Успенский В. Е., Малашичева А. Б., Моисеева О. М. 2013. Механизмы формирования аневризмы восходящего отдела аорты различной этиологии. Рос. кардиол. журн. 99 : 14—18.
- Малашичева А. Б., Моисеева О. М., Успенский В. Е., Фрейлихман О. А., Костина Д. А., Гаврилюк Н. Д., Хромова Н. В., Пономарева Г. М., Стариков А. С., Берникова О. Г., Костарева А. А. 2013. TGF-beta в патогенезе восходящего отдела грудной аорты. Бюл. Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова. (В печати.)
- Blunder S., Messner B., Aschacher T., Zeller I., Türkcan A., Wiedemann D., Andreas M., Blüschke G., Laufer G., Schachner T., Bernhard D. 2012. Characteristics of TAV- and BAV-associated thoracic aortic aneurysms — smooth muscle cell biology, expression profiling, and histological analyses. *Atherosclerosis*. 220 : 355—361.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248—254.
- Della Corte A., Quarto C., Bancone C., Castaldo C., Di Meglio F., Nurzynska D., De Santo L. S., De Feo M., Scardone M., Montagnani S., Cotrufo M. 2008. Spatiotemporal patterns of smooth muscle cell changes in ascending aortic dilatation with bicuspid and tricuspid aortic valve stenosis: focus on cell-matrix signaling. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 135 : 8—18.
- El-Hamamsy I., Yacoub M. H. 2009. Cellular and molecular mechanisms of thoracic aortic aneurysms. *Nat. Rev. Cardiol.* 12 : 771—786.
- Folkersen L., Wågsäter D., Paloschi V., Jackson V., Petrini J., Kurtovic S., Maleki S., Eriksson M. J., Caidahl K., Hamsten A., Michel J. B., Liska J., Gabrielsen A., Franco-Cereceda A., Eriksson P. 2011. Unraveling divergent gene expression profiles in bicuspid and tricuspid aortic valve patients with thoracic aortic dilatation: the ASAP study. *Mol. Med.* 17 : 1365—1373.
- Forte A., Della Corte A., De Feo M., Cerasuolo F., Cipollaro M. 2010. *Cardiovasc. Res.* 88 : 395—405.
- Ikonmidis J. S., Jones J. A., Barbour J. R., Stroud R. E., Clark L. L., Kaplan B. S., Zeeshan A., Bavaria J. E., Gorman J. H., 3rd, Spinale F. G., Gorman R. C. 2007. Expression of matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors within ascending aortic aneurysms of patients with bicuspid or tricuspid aortic valves. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 133 : 1028—1036.
- Jones J. A., Zavadzka J. A., Chang E. I., Sheats N., Koval C., Stroud R. E., Spinale F. G., Ikonmidis J. S. 2010. Cellular phenotype transformation occurs during thoracic aortic aneurysm development. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 140 : 653—659.

- Kirschenlohr H. L., Metcalfe J. C., Grainger D. J. 1996. Cultures of proliferating vascular smooth muscle cells from adult human aorta. *Human Cell Culture Protocols* (Meth. Mol. Med.) 24 : 319—334.
- Kjellqvist S., Maleki S., Olsson T., Chwastyniak M., Branca R. M., Lehtiö J., Pinet F., Franco-Cereceda A., Eriksson P. 2013. A combined proteomic and transcriptomic approach shows diverging molecular mechanisms in thoracic aortic aneurysm development in patients with tricuspid- and bicuspid aortic valve. *Mol. Cell Proteomics*. 12 : 407—425.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 : 680—685.
- Le Maire S. A., Wang X., Wilks J. A., Carter S. A., Wen S., Won T., Leonardelli D., Anand G., Conklin L. D., Wang X. L., Tompson R. W., Coselli J. S. 2005. Matrix metalloproteinases in ascending aortic aneurysms: bicuspid versus trileaflet aortic valves. *Surg. Res.* 123 : 40—48.
- Liao M., Liu Z., Bao J., Zhao Z., Hu J., Feng X., Feng R., Lu Q., Mei Z., Liu Y., Wu Q., Jing Z. J. 2008. A proteomic study of the aortic media in human thoracic aortic dissection: implication for oxidative stress. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 136 : 65—72.
- Lindsay M. E., Dietz H. C. 2011. Lessons on the pathogenesis of aneurysm from heritable conditions. *Nature*. 7347 : 308—316.
- Longo G. M., Xiong W., Greiner T. C., Zhao Y., Fiotti N., Baxter B. T. 2002. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J. Clin. Invest.* 110 : 625—632.
- McCormick M. L., Gavrila D., Weintraub N. L. 2007. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.* 27 : 461—469.
- Milewicz D. M., Guo D. C., Tran-Fadulu V., Lafont A. L., Papke C. L., Inamoto S., Kwartler C. S., Pannu H. 2008. Genetic basis of thoracic aortic aneurysms and dissections: focus on smooth muscle cell contractile dysfunction. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9 : 283—302.
- Mohamed S., Misfeld M., Hanke T., Charitos S., Bullerdiek J., Belge G., Kuehnel W., Sievers H. 2010. Inhibition of caspase-3 differentially affects vascular smooth muscle cell apoptosis in the concave versus convex aortic sites in ascending aneurysms with a bicuspid aortic valve. *Ann. Anat.* 92 : 145—150.
- Theruvath T. P., Jones J. A., Ikonomidis J. S. 2012. Matrix metalloproteinases and descending aortic aneurysms: parity, disparity, and switch. *J. Card. Surg.* 27 : 81—90.

Поступила 19 VI 2013

#### FUNCTIONAL PROPERTIES OF SMOOTH MUSCLE CELLS IN ASCENDING AORTIC ANEURYSM

D. A. Kostina,<sup>1</sup> I. V. Voronkina,<sup>2</sup> L. V. Smagina,<sup>2</sup> N. D. Gavriluk,<sup>1</sup> O. M. Moiseeva,<sup>1</sup>  
O. B. Irtiuga,<sup>1</sup> V. E. Uspensky,<sup>1</sup> A. A. Kostareva,<sup>1</sup> A. B. Malashicheva<sup>3, \*</sup>

<sup>1</sup> Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, <sup>2</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and <sup>3</sup> Department of Embryology, St. Petersburg State University; \* e-mail: malashicheva\_ab@almazovcentre.ru

Thoracic aortic aneurism (TAA) develops as a result of complex series of events that dynamically alter the structure and composition of the aortic vascular extracellular matrix (ECM). The main elements that alter the composition of aortic wall are smooth muscle cells (SMC). The purpose of the present work was to study alteration of smooth muscle cell functions derived from the patients with TAA and from healthy donors. As it is supposed that TAA associated with bicuspid aortic valve (BAV) and with tricuspid aortic valve (TAV) differ in their pathogenesis, we compared the SMC and tissues samples from BAV-, TAV-patients and healthy donors. We compared TAA patients' derived tissues and SMC to healthy donors' ones in several parameters: SMC growth, migration and apoptotic dynamics; metalloproteinase MMP2 and MMP9 activity (zymography) and elastin, collagen and fibrillin content (Western blot) in both tissue samples and cultured SMC. Proliferation ability of both BAV and TAV SMC was decreased comparing to donors cells; migration ability in scratch tests was increased in TAV-derived SMC comparing to donor cells. BAV-cells migration ability was not changed comparing to donor-SMC. Elastin content was decreased in TAA SMC comparing to donor cells whereas the content of fibrillin and collagen was not altered. At the same time elastin and collagen protein level was significantly higher in tissue samples of TAA patients comparing to donor-derived samples. SMS proliferation and migration ability is differently affected in TAV and BAV-associated TAA that supports the idea of different nature of these two groups of TAA. Also our data show that SMC functional properties are altered in TAA patients and these alterations could play a significant role in the disease pathogenesis.

Key words: extracellular matrix, matrix metalloproteases, smooth muscle cells, thoracic aortic aneurysm.