

УДК 618.396:616.132.018.61:575.21]-092.9:599.323.4

ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ФЕНОТИПА И УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ГЛАДКИХ МИОЦИТОВ ВОСХОДЯЩЕЙ ЧАСТИ АОРТЫ ПРЕЖДЕВРЕМЕННО РОЖДЕННЫХ КРЫС

© 2024 г. О. Н. Серебрякова^{1, *}, В. В. Иванова¹, И. В. Мильто^{1, 2}

¹Кафедра морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета, Томск, 634050, Россия

²Отдел молекулярной и клеточной радиобиологии Северского биофизического научного центра ФМБА России, Северск, 636013, Россия

*E-mail: oserebryakovan@gmail.com

Поступила в редакцию 26.10.2023

После доработки 06.12.2023

Принята к публикации 12.12.2023

Преждевременное рождение может способствовать развитию болезней системы кровообращения во взрослом возрасте в связи с незавершенностью морфогенеза стенки кровеносных сосудов. Гладкие миоциты являются ведущей клеточной популяцией в средней оболочке стенки аорты и являются пластичными по своей природе, т. е. они способны менять свой фенотип в зависимости от их микроокружения. Наличие синтетически активных гладких миоцитов в стенке аорты взрослого индивида является предиктором формирования широкого спектра сердечно-сосудистых заболеваний. Целью нашего исследования является изучение особенностей молекулярного фенотипа и ультраструктуры гладких миоцитов средней оболочки стенки восходящей части аорты крыс, рожденных на 12 и 24 ч раньше срока. В работе представлены результаты иммуногистохимического и морфометрического, а также ультраструктурного анализа стенки восходящей части аорты крыс Вистар, рожденных на 12 ч и 24 ч раньше срока. Показано, что преждевременное рождение приводит к более поздней смене фенотипа гладких миоцитов с синтетического на сократительный, что может негативно отразиться на морфофункциональном состоянии сердечно-сосудистой системы.

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

DOI: 10.31857/S0041377124030091, **EDN:** PEVMSK

Люди, рожденные недоношенными, подвергаются повышенному риску развития сердечно-сосудистых заболеваний в более позднем возрасте, включая увеличение среднего артериального давления, неоптимальную работу сердца, а также различные патологии сосудистой сети (Bensley et al., 2016). Преждевременное рождение способствует ремоделированию стенки аорты в постнатальном периоде онтогенеза, что в свою очередь приводит к формированию сердечно-сосудистых патологий, однако механизмы данного процесса на сегодняшний день не ясны (Barnard et al., 2020).

Основными продуцентами волокнистого компонента межклеточного вещества средней оболочки стенки аорты, дезорганизация которых приводит к ремоделированию сосуда, являются васкулярные гладкие миоциты (Wagenseil, Mecham, 2009). Васкулярным гладким миоцитам свойственна фенотипическая пластичность. Данный тип клеток

может переходить от сократительного (покоящегося) фенотипа к синтетическому (пролиферативному) фенотипу в ответ на различные физиологические или патологические стимулы (Rensen et al., 2007). В пренатальном периоде онтогенеза гладкие миоциты средней оболочки стенки аорты крыс имеют преимущественно синтетический фенотип. В первые 2–4 недели постнатального периода онтогенеза крыс гладкие миоциты средней оболочки аорты в физиологических условиях постепенно снижают интенсивность эластогенеза и коллагеногенеза, переключаясь на сократительный фенотип (Wang et al., 2015). Помимо этого, гладкие миоциты способны менять свой фенотип в зависимости от условий окружающей их среды. Так, в ответ на стресс или повреждение сосудов гладкие миоциты изменяют сократительный фенотип на синтетический, в результате чего приобретают пролиферативные, миграционные и синтетические свойства, необходимые

для восстановления тканей (Lesauskaite et al., 2001). Дисбаланс фенотипического переключения гладких миоцитов может привести к различным патологическим процессам (например, кальцификация, рестеноз) или сердечно-сосудистым заболеваниям (например, атеросклероз, аневризма аорты) (Shi et al., 2020).

Полностью дифференцированные гладкие миоциты продуцируют большое количество сократительных белков, таких как α -гладкомышечный актин, киназа легких цепей миозина, тяжелая цепь миозина и гладкомышечный кальпонин, необходимых для выполнения сократительной функции (Gabbiani et al., 1981). Синтетические гладкие миоциты продуцируют сниженное количество сократительных белков и большое количество белков внеклеточного матрикса. Помимо этого, при переключении фенотипа происходит смена белков промежуточных филаментов гладких миоцитов (Balint et al., 2023). В гладких миоцитах стенки аорты, имеющих синтетический фенотип, преобладают виментиновые промежуточные филаменты, тогда как в гладких миоцитах, имеющих сократительный фенотип — десминовые (Fujimoto et al., 1987; Osborn et al., 1987). В связи с этим изменения количества сократительных белков и состава белков промежуточных филаментов гладких миоцитов часто используют для маркировки их фенотипов.

Целью настоящего исследования является изучение особенностей молекулярного фенотипа и ультраструктуры гладких миоцитов средней оболочки стенки восходящей части аорты крыс, рожденных на 12 и 24 ч раньше срока, и сравнение их с молекулярными фенотипами и ультраструктурой аналогичных клеток доношенных особей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Дизайн исследования. Эксперимент проводили на 84 крысах-самцах Вистар, из которых формировали 3 группы: контрольная группа (доношенные животные, 22 сут беременности, $n = 30$), 1-я группа (недоношенные на 12 ч крысы, 21.5 сут беременности, $n = 28$) и 2-я группа (недоношенные на 24 ч крысы, 21 сут беременности, $n = 26$). Более выраженная степень недоношенности (более 1 сут) у крыс приводит к преждевременному рождению нежизнеспособного потомства. Для получения потомства к самкам крыс (3 мес., вес 180 ± 20 г), находившимся на стадии проэструса полового цикла, подсаживали на ночь самцов крыс Вистар (2 мес. вес 180 ± 20 г). На следующие сутки с утра, самкам делали влагалищные

мазки и при обнаружении в мазке сперматозоидов, начинали отсчет первых суток беременности.

Индукцию преждевременных родов осуществляли подкожным введением самкам крыс мифепристона (1 мл, 10 мг на 1 кг массы тела; Sigma-Aldrich, США) за 48 ч (группа 2, недоношенные на 24 ч) и 36 ч (группа 1, недоношенные на 12 ч) до предполагаемого срока родов. Выведение потомства из эксперимента осуществляли на 1, 2, 4, 8 и 24 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).

Иммуногистохимическое и морфометрическое исследование. Фрагменты восходящей части аорты фиксировали в 10 %-ном водном нейтральном (pH 7.4) формалине («БиоВитрум», Россия) в течение 24 ч при температуре 4°C , после чего промывали в проточной воде, проводили через Isoprep («БиоВитрум», Россия) и пропитывали в парафиновой смеси HISTOMIX («БиоВитрум», Россия). Срезы толщиной 4 мкм, приготовленные на автоматическом ротационном микротоме (HM 355S Thermo Fisher Scientific, США), монтировали на предметные стекла с полилизинным адгезивным покрытием. После депарафинизации срезов проводили высокотемпературную демаскировку антигенов в цитратном буфере (0.01 М; pH 6.0). Эндогенную пероксидазу блокировали с помощью Hydrogen Peroxide Block (Abcam, Великобритания) в течение 10 мин. Неспецифическое окрашивание минимизировали за счет инкубации срезов с Protein Block (Abcam, Великобритания) в течение 10 мин. Во влажной камере на срезы наносили по 50 мкл разведенных в ИНС Diluent (Novocastra, Великобритания) в соответствии с рекомендациями производителей первичных антител: анти-виментин (1:200, 45 мин) и анти- α -гладкомышечный актин (1:150, 45 мин). Использовали моноклональные мышечные антитела Anti-Vimentin antibody (NCL-L-VIM-572; Leica, Великобритания) и поликлональные кроличьи Anti-alpha smooth muscle Actin antibody (ab5694; Abcam, Великобритания) соответственно. После инкубации с первичными антителами, срезы промывали в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), дополнительно на срезы с антителами к виментину наносили Mouse Specifying Reagent (Complement) на 30 мин. После промывки в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4) наносили на срезы полимерный комплекс Goat anti-rabbit HRP-Conjugate на 30 мин и в качестве визуализирующей системы — диаминобензидин (Abcam, Великобритания) на 5 мин.

Иммуноферментную реакцию останавливали, промывая срезы в фосфатно-солевом буфере (рН 7.4), ядра докрашивали гематоксилином Джилла. Окрашенные срезы исследовали с помощью светового микроскопа Axioscope 40 (Zeiss, Германия) с последующей фотосъемкой на цифровую камеру CanonG5 (Canon, Китай). На срезах оценивали интенсивность (легкая, умеренная или выраженная) иммунопозитивного окрашивания клеток средней оболочки стенки восходящей части аорты крыс и подсчитывали количество иммунопозитивных клеток на 1 мм².

Ультроструктурное исследование. Для трансмиссионного электронно-микроскопического исследования фрагменты восходящей части аорты крыс фиксировали в 4%-ном водном растворе параформальдегида (Serva, Германия) 24 ч при 4 °С, отмывали буфером Хэнкса (Gibco, Великобритания), постфиксацию проводили в 1%-ном OsO₄ (SPI, США) 1.5 ч при 4 °С. Фрагменты восходящей части аорты дегидратировали и заливали в смесь смол Epon 812-Araldite 502-DDSA (SPI Supplies, США). На ультратоме Leica EM UC7 (Leica, Австрия) готовили ультратонкие срезы (70 нм), которые помещали на гексагональные медные сетки и контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, а затем просматривали на электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Япония). Фотосъемку осуществляли при увеличении 15 000, 20 000 и 25 000× при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Статистический анализ. Статистическую обработку количественных данных производили с помощью статистического пакета GraphPad Prism 8.0. Данные представляли в виде медианы, а также первого и третьего квартилей — Me (Q₁; Q₃). Проверку на нормальность распределения определяли критерием Шапиро–Уилка, статистическую значимость выявляли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с последующим post-hoc тестом Бонферрони для уменьшения ошибки множественных сравнений. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Иммуногистохимическое выявление виментина в стенке восходящей части аорты крыс. Виментин является белком промежуточных филаментов и содержится в клетках мезенхимного происхождения. Замещение виментиновых промежуточных филаментов на десминовые происходит при смене фенотипа васкулярных гладких миоцитов с синтетического на сократительный (Schmid et al., 1987). Иммунопозитивное цитоплазматическое окрашивание на виментин выявляется во всех оболочках стенки восходящей части аорты доношенных и недоношенных крыс. Во внутренней и наружной оболочках стенки аорты на протяжении всего эксперимента выявляются виментин-позитивные эндотелиоциты и интерстициальные клетки с умеренной и выраженной интенсивностью окрашивания. Количество виментин-позитивных клеток в средней оболочке стенки восходящей части аорты крыс всех групп уменьшается в течение эксперимента. У доношенных особей в течение эксперимента количество виментин-позитивных клеток в средней оболочке стенки восходящей части аорты уменьшается в несколько раз, также снижается интенсивность иммунного окрашивания с умеренной до легкой (рис. 1).

Количество виментин-позитивных клеток в средней оболочке стенки восходящей части аорты крыс 1-й группы больше со 2-й по 8-ю нед. эксперимента в сравнении с контрольными животными (табл. 1). На протяжении всего эксперимента количество иммунопозитивных клеток в средней оболочке стенки восходящей части аорты крыс 2-й группы больше, чем аналогичный показатель доношенных особей.

Интенсивность иммунопозитивного окрашивания гладких миоцитов средней оболочки стенки восходящей части аорты крыс 1-й и 2-й групп на протяжении всего эксперимента остается выраженной в большинстве клеток и умеренной в единичных клетках (рис. 2).

Таблица 1. Число виментин-позитивных клеток в средней оболочке стенки восходящей части аорты доношенных (контрольная группа), а также недоношенных на 12 (1-я группа) и 24 ч (2-я группа) животных на 1 мм² среза

Экспериментальная группа	Число окрашенных клеток на 1 мм ² среза (Me; Q ₁ ; Q ₃) на сроке эксперимента, нед.				
	1	2	4	8	24
Контрольная группа	647.0 (628; 684)	388.2 (367; 402) ^a	200.2 (182; 204) ^a	107.4 (99; 113) ^a	61.2 (54; 68)
1-я группа (12 ч недоношенности)	695.4 (659; 721)	585.8 (512; 654) ^{a, б}	403.2 (372; 435) ^{a, б}	227.4 (232; 241) ^{a, б}	119.8 (108; 138) ^a
2-я группа (24 ч недоношенности)	794.8 (789; 806) ^{б, в}	518.2 (499; 554) ^{a, б, в}	387.4 (389; 405) ^{a, б}	329.6 (292; 355) ^{б, в}	158.6 (151; 168) ^{a, б}

^a — отличие от показателя предыдущего срока этой же группы; ^б — отличие от соответствующего показателя крыс контрольной группы; ^в — отличие от соответствующего показателя крыс 1 группы; $p < 0.05$.

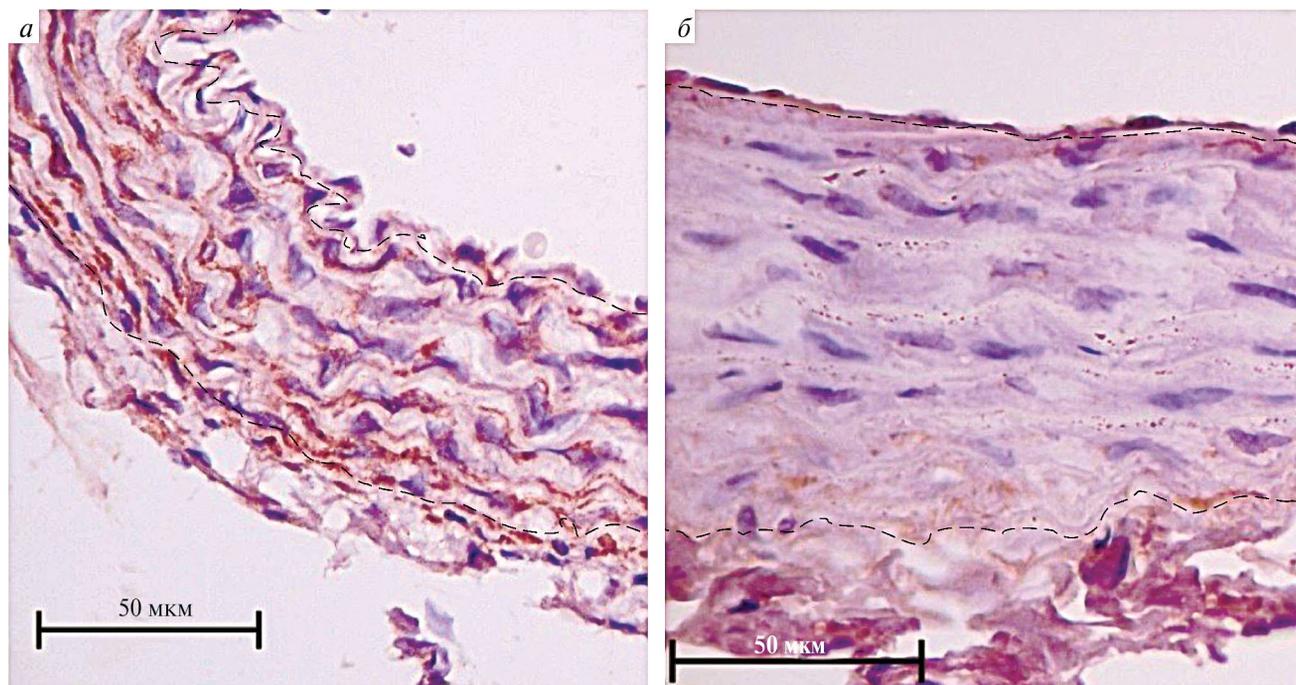


Рис. 1. Стенка восходящей части аорты доношенных крыс. *a, б* — 1 и 24 нед. эксперимента соответственно. Виментин-позитивное окрашивание эндотелиоцитов внутренней оболочки, гладких миоцитов средней оболочки и интерстициальных клеток наружной оболочки стенки восходящей части аорты крыс. Оболочки стенки аорты разделены штриховой линией. В течение эксперимента наблюдается уменьшение количества виментин-позитивных клеток в средней оболочке и снижение интенсивности иммунопозитивной реакции. Иммуногистохимическая реакция на виментин с докраской гематоксилином Джилла.

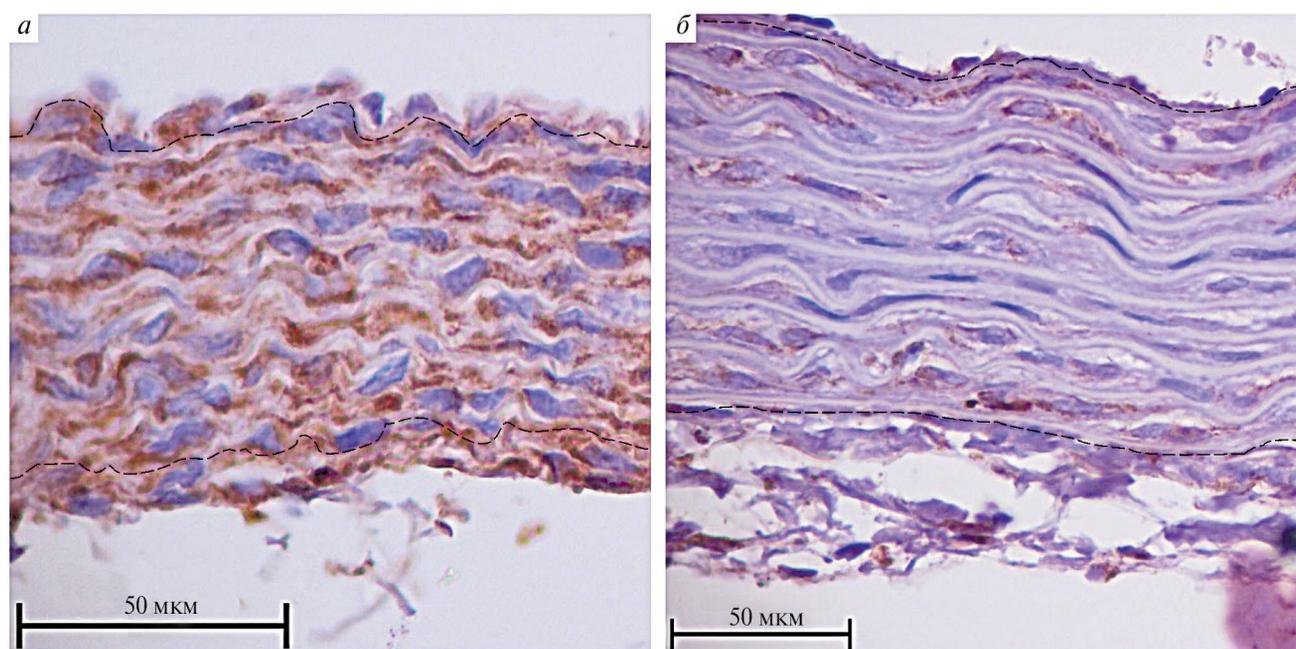


Рис. 2. Стенка восходящей части аорты недоношенных на 24 ч крыс. *a, б* — 1 и 24 нед. эксперимента соответственно. Виментин-позитивное окрашивание эндотелиоцитов внутренней оболочки, гладких миоцитов средней оболочки и интерстициальных клеток наружной оболочки стенки восходящей части аорты. Оболочки стенки аорты разделены штриховой линией. Наблюдается уменьшение количества виментин-позитивных клеток, интенсивность иммуногистохимической реакции остается выраженной на протяжении всего эксперимента. Иммуногистохимическая реакция на виментин с докраской гематоксилином Джилла.

Иммуногистохимическое выявление α -гладкомышечного актина в стенке восходящей части аорты крыс.

α -Гладкомышечный актин является изоформой мышечного актина, формирует микрофиламенты и является маркером сократительного, непролиферативного фенотипа васкулярных гладких миоцитов в стенке аорты (Nalauko et al., 1996). Позитивное иммунное окрашивание на α -гладкомышечный актин выявляется в 100 % гладких миоцитов средней оболочки стенки восходящей части аорты крыс всех групп. Интенсивность иммунной реакции вышеуказанных

клеток в стенке аорты увеличивается на протяжении всего эксперимента у крыс 1-й и 2-й групп от слабой до выраженной, тогда как у крыс контрольной группы практически все клетки имеют выраженную интенсивность иммунного окрашивания на протяжении всего эксперимента (табл. 2). Интенсивность α -гладкомышечный актин-положительного иммунного окрашивания гладких миоцитов средней оболочки стенки восходящей части аорты меньше в 1-й и 2-й группах, в сравнении с аналогичными клетками животных контрольной группы на 1 неделю эксперимента (рис. 3).

Таблица 2. Число иммуноокрашенных на α -гладкомышечный актин клеток в стенке восходящей части аорты доношенных (контрольная группа), а также недоношенных на 12 ч (1-я группа) и 24 ч (2-я группа) крыс на 1 мм² среза

Экспериментальная группа	Интенсивность	Число окрашенных клеток на 1 мм ² среза (Me; Q ₁ ; Q ₃) на сроке эксперимента, нед.				
		1	2	4	8	24
Контрольная группа (доношенные животные)	Легкая	0 (0; 0)	0 (0; 0)	1.2 (0; 2)	0.2 (0; 0)	0.4 (0; 1)
	Умеренная	0 (0; 0)	1.8 (0; 2)	7 (1; 11)	11.6 (5; 18)	26 (16; 29)
	Выраженная	946.8 (932; 964) ^a	756.4 (616; 868) ^a	476 (488; 517) ^a	314.6 (278; 337) ^a	355.8 (324; 400)
1-я группа (12 ч недоношенности)	Легкая	706.2 (618; 879) ^b	678.4 (612; 711) ^b	141.2 (112; 159) ^{a, б}	38.6 (30; 51) ^б	35.6 (19; 53) ^б
	Умеренная	93.2 (55; 128) ^б	218.2 (185; 248) ^б	408.4 (368; 417) ^б	223.8 (198; 243) ^{a, б}	241.2 (197; 284) ^б
	Выраженная	53 (24; 73) ^б	72.2 (65; 74) ^б	190.2 (194; 217) ^{a, б}	264 (218; 307)	201.6 (198; 214) ^б
2-я группа (24 ч недоношенности)	Легкая	623.8 (547; 661) ^б	317 (199; 357) ^{b, c}	115.8 (84; 156) ^б	50.4 (27; 55) ^б	27.6 (14; 39)
	Умеренная	97.8 (75; 98) ^б	299.8 (259; 378) ^б	228 (189; 312) ^{б, в}	97.2 (61; 115) ^{б, в}	164.4 (140; 198) ^б
	Выраженная	46.6 (18; 74) ^б	136.8 (100; 152) ^б	260 (248; 294) ^{a, б}	280.8 (256; 288)	306.8 (285; 317) ^в

^a — отличие от показателя предыдущего срока этой же группы; ^б — отличие от соответствующего показателя крыс контрольной группы; ^в — отличие от соответствующего показателя крыс 1-й группы; $p < 0.05$.

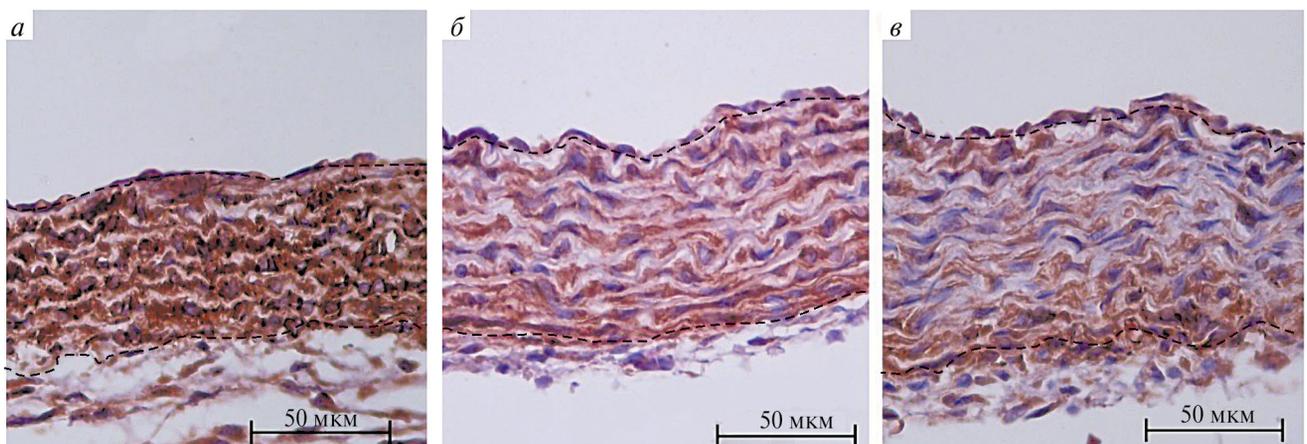


Рис. 3. Стенка восходящей части аорты на 1 нед. эксперимента. *a* — Контрольная группа (доношенные особи); *б* — 1-я группа (животные недоношенные на 12 ч); *в* — 2-я группа (животные недоношенные на 24 ч). α -гладкомышечный актин-положительное окрашивание гладких миоцитов средней оболочки и интерстициальных клеток наружной оболочки стенки восходящей части аорты крыс. Оболочки стенки аорты разделены штриховой линией. В клетках средней оболочки доношенных животных наблюдается выраженная иммуногистохимическая реакция, в клетках преждевременно рожденных крыс обнаруживается менее интенсивная иммуногистохимическая реакция. Иммуногистохимическая реакция на α -гладкомышечный актин с докраской гематоксилином Джилла.

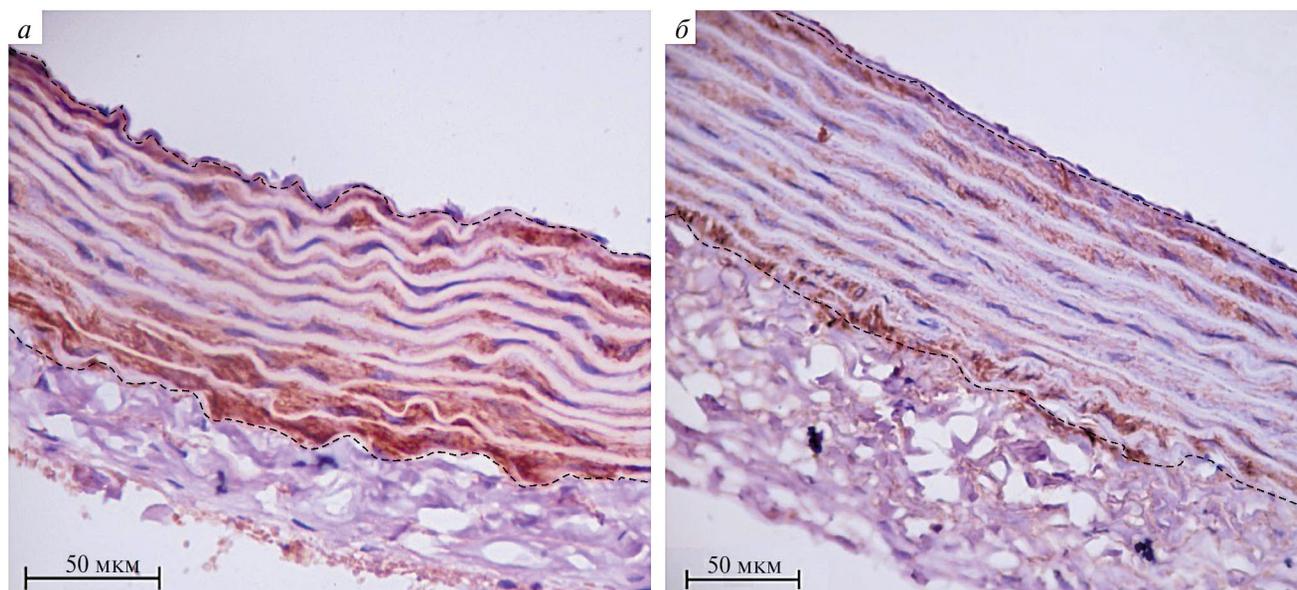


Рис. 4. Стенка восходящей части аорты на 24 неделю эксперимента: *а* — контрольная группа (доношенные особи); *б* — 1-я группа (животные недоношенные на 12 ч). α -Гладкомышечный актин-позитивное окрашивание гладких миоцитов средней оболочки стенки восходящей части аорты крыс. Оболочки стенки аорты разделены штриховой линией. В средней оболочке доношенных животных преобладают клетки с выраженной интенсивностью, у преждевременно рожденных крыс — с умеренной интенсивностью иммунной реакции. Иммуногистохимическая реакция на α -гладкомышечный актин с докраской гематоксилином Джилла.

В 1-ю неделю эксперимента в средней оболочке стенки восходящей части аорты крыс 1-й и 2-й групп определяются гладкие миоциты преимущественно со слабой и умеренной интенсивностью иммуногистохимической реакции, к 8-й неделе эксперимента интенсивность α -гладкомышечный актин-позитивного окрашивания вырастает до преимущественно выраженной и умеренной. На 24-ю нед. эксперимента в средней оболочке стенки аорты крыс 1-й группы преобладают клетки с умеренной интенсивностью иммуногистохимической реакции на α -гладкомышечный актин в сравнении с доношенными особями в стенке аорты которых преобладают клетки с выраженной интенсивностью (рис. 4).

Ультраструктурный анализ гладких миоцитов средней оболочки стенки восходящей части аорты. Средняя оболочка стенки восходящей части аорты крыс всех групп состоит из эластических мембран, разделенных слоями гладких миоцитов. На 1-й нед. эксперимента клетки средней оболочки стенки восходящей части аорты доношенных крыс представлены гладкими миоцитами с синтетическим фенотипом, которые характеризуются округлой или отростчатой формой, овальным ядром с 1—2 ядрышками и умеренным содержанием гетерохроматина. Цитоплазма этих гладких миоцитов имеет развитый синтетический аппарат: крупные цистерны гранулярной эндоплазматической

сети, большое количество рибосом, а также выраженный пластинчатый комплекс и большое количество транспортных везикул (рис. 5). Энергетический аппарат представлен многочисленными митохондриями с ламеллярными кристами. Сократительный аппарат слабо выражен, миофиламенты определяются на периферии цитоплазмы, под плазматической мембраной. На 24-й нед. эксперимента гладкие миоциты средней оболочки стенки восходящей части аорты доношенных крыс представлены гладкими миоцитами с сократительным фенотипом, имеющими вытянутую веретеновидную форму и крупные сигарообразные ядра. Сократительный аппарат в этих клетках хорошо выражен и занимает всю цитоплазму клеток. Определяется небольшое количество митохондрий и единичные компоненты синтетического аппарата.

Гладкие миоциты средней оболочки стенки восходящей части аорты крыс, недоношенных на 12 и 24 ч, на 1 неделе эксперимента имеют выраженный синтетический фенотип: неправильная форма и крупные ядра с 1—2 ядрышками. Всю площадь цитоплазмы занимает синтетический аппарат, представленный гранулярной эндоплазматической сетью, множеством рибосом и пластинчатым комплексом (рис. 6). Также в цитоплазме определяется большое количество мелких митохондрий и транспортных везикул. На 24-й неделе эксперимента гладкие миоциты средней

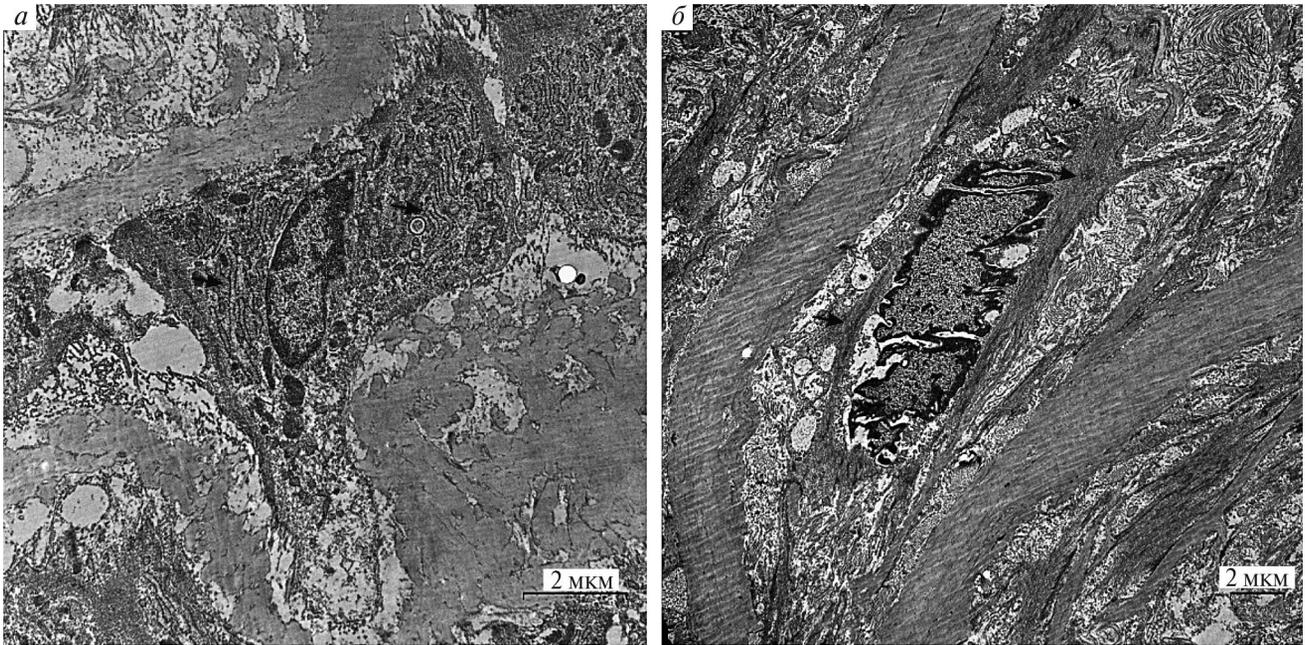


Рис. 5. Фрагмент средней оболочки стенки восходящей части аорты доношенных крыс: *a* — 1-я неделя эксперимента (черными стрелками отмечен синтетический аппарат, представленный цистернами гранулярной эндоплазматической сети); *б* — 24-я нед. эксперимента (черными стрелками отмечен сократительный аппарат, представленный миофиламентами). Трансмиссионная электронная микроскопия.

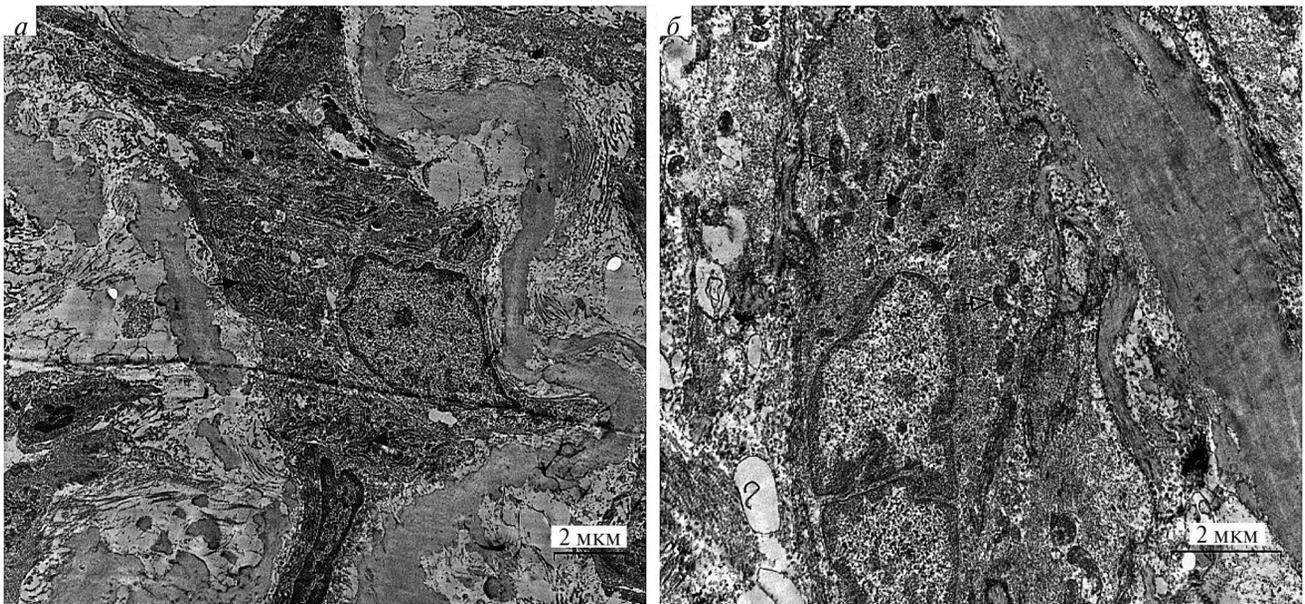


Рис. 6. Фрагмент средней оболочки стенки восходящей части аорты недоношенных на 12 ч крыс. *a* — 1-я нед. эксперимента (черная стрелка указывает на развитую гранулярную эндоплазматическую сеть); *б* — 24-я нед. эксперимента (черная стрелка указывает на гранулярную эндоплазматическую сеть, стрелка с черным контуром на митохондрии). Трансмиссионная электронная микроскопия.

оболочки стенки восходящей части аорты недоношенных на 12 и 24 ч крыс имеют синтетический фенотип и представлены вытянутыми овальными клетками, содержащими округлые ядра с 1 крупным ядрышком.

В перинуклеарной области цитоплазма этих клеток содержит развитый синтетический аппарат и большое количество крупных митохондрий, периферию цитоплазмы клеток занимают миофиламенты.

ОБСУЖДЕНИЕ

Гладкие миоциты являются основными продуцентами коллагена и эластина в средней оболочке стенки аорты. Эластогенез в стенке аорты крыс начинается с 15—17 сут пренатального периода онтогенеза и заканчивается к 7—14 сут постнатального периода развития (Berry et al., 1992). Коллагеногенез в стенке аорты крыс также начинается в пренатальном периоде онтогенеза и продолжается в течение всего постнатального периода онтогенеза с низкой интенсивностью (Looker, Berry, 1997). Таким образом, наиболее выраженная синтетическая активность гладких миоцитов в стенке аорты наблюдается в пренатальном периоде, а также в первые недели постнатального периода онтогенеза. Позднее гладкие миоциты меняют свой фенотип с синтетического на сократительный и выполняют сократительную функцию. При повреждении стенки сосуда, либо недостаточности какого-либо компонента внеклеточного матрикса гладкие миоциты способны дедифференцироваться и изменять свой фенотип с сократительного на синтетический или же сохранять преимущественно синтетический фенотип без дальнейшей дифференцировки (Tang et al., 2022).

Эластичность стенки артерий обуславливается сокращением гладких миоцитов и упругостью эластических мембран, состоящих из эластических волокон и связанных с ними коллагеновых волокон. Сокращение гладких миоцитов в стенке сосудов позволяет регулировать их диаметр, величину артериального давления и распределение кровотока. Снижение количества миофиламентов в гладких миоцитах стенки аорты приводит к их неспособности обеспечить достаточную сократительную силу, чтобы восстановить первоначальный диаметр сосуда после прохождения пульсовой волны. В результате иммуногистохимического и электронномикроскопического исследований нами показано, что гладкие миоциты средней оболочки стенки аорты преждевременно рожденных крыс имеют менее выраженный сократительный аппарат, чем у доношенных особей.

Синтетический фенотип гладких миоцитов характеризуется пролиферативной и секреторной активностью, а также выраженной способностью к миграции (Johnson et al., 2021). Вследствие измененного фенотипа гладкие миоциты с синтетическим фенотипом имеют слабую связь с компонентами внеклеточного матрикса, а значит в меньшей степени распределяют нагрузку при прохождении пульсовой волны, что отражается на функционировании сердечно-сосудистой системы (Сао et al., 2022). При расслоении аорты, гладкие миоциты с синтетическим

фенотипом увеличивают синтез коллагена и матриксной металлопротеиназы-2, что способствует отложению коллагена и деградации эластина, влияя на структуру и функции сосудистой стенки (Wang et al., 2012). В настоящем исследовании показано, что у недоношенных особей в позднем постнатальном периоде онтогенеза гладкие миоциты с синтетическим фенотипом в средней оболочке стенки восходящей части аорты определяются в большом количестве, чем у доношенных крыс.

Ремоделирование стенки артерий является основой патогенеза некоторых сердечно-сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз, сосудистый рестеноз, артериальная гипертензия, лёгочная гипертензия, расслоение аорты и аневризма (Zhang et al., 2013). Дедифференцированные гладкие миоциты теряют свои сократительные свойства и приобретают синтетический (секреторный, пролиферативный и мигрирующий) фенотип, играя ключевую роль в патогенезе ремоделирования стенки артерий (Ye et al., 2014; Petsophonakul et al., 2019). Васкулярные гладкие миоциты с синтетическим фенотипом секретируют во внеклеточное пространство большое количество компонентов внеклеточного матрикса, включая белки (например, коллаген I, III, IV, ламинин), а также протеогликаны (например, перликан) и гликозаминогликаны (например, гиалуронан) (Merrilees et al., 1990; Figueroa et al., 2004). Показано, что гладкие миоциты с синтетическим фенотипом секретируют или связывают с поверхностью плазматической мембраны несколько матриксных металлопротеиназ (ММП) и соответствующих им тканевых ингибиторов матриксных металлопротеаз (ТИМП), чтобы обеспечить правильное восстановление и ремоделирование растущих или повреждённых кровеносных сосудов. Выявлено, что хронический избыток провоспалительных цитокинов и факторов роста может вызывать нарушение регуляции активности как ММП, так и ТИМП, что может способствовать неадекватному ремоделированию сосудов (Wilson, 2011). Имеются данные о влиянии митохондриальной дисфункции и окислительного стресса как триггеров трансформации фенотипа гладких миоцитов, приводящие к инициации и развитию ремоделирования артерий (Qin et al., 2023). Ранее нами было показано, что в средней оболочке стенки восходящей части аорты недоношенных крыс определяется дисбаланс компонентов внеклеточного матрикса с преобладанием коллагенового компонента над эластическим, что согласуется с обнаруженным большим количеством синтетически активных гладких миоцитов, как основных продуцентов коллагена (Серебрякова и др., 2023).

При анализе ультраструктурной организации гладких миоцитов с синтетическим фенотипом выявлено, что они имеют неправильную форму, крупные округлые ядра с 1–2 ядрышками и развитый синтетический аппарат, в то время как гладкие миоциты с сократительным фенотипом имеют веретеновидную форму с вытянутым овальным ядром без ядрышек и развитым сократительным аппаратом (Thyberg et al., 1985; Kanda, Matsuda, 1994; Sweeney et al., 2006). Ультраструктурный анализ гладких миоцитов средней оболочки стенки восходящей части аорты преждевременно рожденных крыс 1-я и 2-я групп подтверждает наличие синтетически активных гладких миоцитов с малым количеством миофиламентов в позднем постнатальном периоде онтогенеза, в то время как в контрольной группе на аналогичные сроки ведущим является сократительный фенотип гладких миоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате настоящего исследования было обнаружено большое количество гладких миоцитов с синтетическим фенотипом в средней оболочке стенки восходящей части аорты преждевременно рожденных крыс на поздних этапах постнатального периода онтогенеза, что может способствовать ремоделированию стенки сосуда и служить предиктором развития широкого круга сердечно-сосудистых заболеваний.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 24-25-0001.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание, питание, уход и выведение животных из эксперимента осуществляли в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ № 755 от 12.08.1987) и Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997. Протокол исследования (№ 8473/1 от 30.11.2020) одобрен этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета Минздрава России, Томск.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Серебрякова О.Н., Иванова В.В., Мильто И.В.* 2023. Особенности строения стенки восходящей части аорты преждевременно рожденных крыс. Цитология. Т. 65. № 6. С. 593. (*Serebryakova O.N., Ivanova V.V., Milto I.V.* 2023. Structural features of ascending aorta wall in premature born rats. Tsitologiya. V. 65. P. 593–600.)
- Balint B., Bernstorff I.G., Schwab T., Schäfers H.J.* 2023. Age-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells in the normal ascending aorta. Front. Cardiovasc. Med. V. 10: 1114355. doi: 10.3389/fcvm.2023.1114355
- Barnard C., Peters M., Sindler A., Farrell E., Baker K., Palta M., Stauss H., Dagle J., Segar J., Pierce G., Eldridge M., Bates M.* 2020. Increased aortic stiffness and elevated blood pressure in response to exercise in adult survivors of prematurity. Physiol. Rep. V. 8: e14462. doi: 10.14814/phy2.14462
- Bensley J., De Matteo R., Harding R., Black M.* 2016. The effects of preterm birth and its antecedents on the cardiovascular system. Acta Obstet. Gynecol. Scand. V. 95. P. 652.
- Berry C., Looker T., Germain J.* 1992. The growth and development of the rat aorta. J. Anat. V. 113. P. 1.
- Cao G., Xuan X., Hu J., Zhang R., Jin H., Dong H.* 2022. How vascular smooth muscle cell phenotype switching contributes to vascular disease. Cell Commun. Signal. V. 20: 180. doi: 10.1186/s12964-022-00993-2
- Figuroa J., Oubre J., Vijayagopal P.* 2004. Modulation of vascular smooth muscle cells proteoglycan synthesis by the extracellular matrix. J. Cell Physiol. V. 198. P. 302.
- Fujimoto T., Tokuyasu K.T., Singer S.J.* Direct morphological demonstration of the coexistence of vimentin and desmin in the same intermediate filaments of vascular smooth muscle cells. J. Submicrosc. Cytol. 1987. V. 19. P. 1.
- Gabbiani G., Schmid E., Winter S., Chaponnier C., de Chastonay C., Vandekerckhove J., Weber K., Franke W.W.* Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 298.
- Halayko A., Salari H., Ma X., Stephens N.* 1996. Markers of airway smooth muscle cell phenotype. Am. J. Physiol. V. 270. P. 1040.
- Johnson R., Solanki R., Warren D.* 2021. Mechanical programming of arterial smooth muscle cells in health and ageing. Biophys. Rev. V. 13. P. 757.
- Kanda K., Matsuda T.* Mechanical stress-induced orientation and ultrastructural change of smooth muscle cells cultured in three-dimensional collagen lattices. 1994. Cell Transplant. V. 3. P. 481.
- Lesauskaite V., Tanganelli P., Sassi C., Neri E., Diciolla F., Ivanoviene L., Epistolato M.C., Lalinga A.V., Alessandrini C., Spina D.* 2001. Smooth muscle cells of the media in the dilatative pathology of ascending thoracic aorta: morphology, immunoreactivity for osteopontin, matrix metalloproteinases, and their inhibitors. Hum. Pathol. V. 32. P. 1003.
- Looker T., Berry C.* 1997. The growth and development of rat aorta. J. Anat. V. 113. P. 17.

- Merrilees M., Campbell J., Spanidis E., Campbell G.* 1990. Glycosaminoglycan synthesis by smooth muscle cells of differing phenotype and their response to endothelial cell conditioned medium. *Atherosclerosis*. V. 81. P. 245.
- Osborn M., Caselitz J., Puschel K., Weber K.* 1987. Intermediate filament expression in human vascular smooth muscle and in arteriosclerotic plaques. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* V. 411. P. 449.
- Petsophonsakul P., Furmanik M., Forsythe R., Dweck M., Schurink G. W., Natour E., Reutelingsperger C., Jacobs M., Mees B., Schurgers L.* 2019. Role of vascular smooth muscle cell phenotypic switching and calcification in aortic aneurysm formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* V. 39. P. 1351.
- Qin H., Bao J., Tang J., Xu D., Shen L.* 2023. Arterial remodeling: the role of mitochondrial metabolism in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* V. 324. P. 183.
- Rensen S., Doevendans P., van Eys G.* 2007. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth. Heart J. V.* 15. P. 100.
- Schmid E., Osborn M., Runger-Brändle E., Gabbiani G., Weber K., Franke W.* 1982. Distribution of vimentin and desmin filaments in smooth muscle tissue of mammalian and avian aorta. *Exp. Cell Res.* V. 137. P. 329.
- Shi J., Yang Y., Cheng A., Xu G., He F.* 2020. Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* V. 319. P. 613.
- Sweeney M., Jones C., Greenwood S., Baker P., Taggart M.* 2006. Ultrastructural features of smooth muscle and endothelial cells of isolated isobaric human placental and maternal arteries. *Placenta*. V. 27. P. 635.
- Tang H., Chen A., Zhang H., Gao X., Kong X., Zhang J.* 2022. Vascular smooth muscle cells phenotypic switching in cardiovascular diseases. *Cells*. V. 11: 4060. doi: 10.3390/cells11244060
- Thyberg J., Nilsson J., Palmberg L., Sjölund M.* 1985. Adult human arterial smooth muscle cells in primary culture. Modulation from contractile to synthetic phenotype. *Cell Tissue Res.* V. 239. P. 69.
- Wagenseil J., Mecham R.* Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. 2009. *Physiol. Rev.* V. 89. P. 957.
- Wang G., Jacquet L., Karamariti E., Xu Q.* 2015. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *J. Physiol.* V. 14. P. 3013.
- Wang L., Zhang J., Fu W., Guo D., Jiang J., Wang Y.* 2012. Association of smooth muscle cell phenotypes with extracellular matrix disorders in thoracic aortic dissection. *J. Vasc. Surg.* V. 56. P. 1698.
- Wilson D.* 2011. Vascular smooth muscle structure and function. In: *Mechanisms of vascular disease: A reference book for vascular specialists.* University of Adelaide Press. P. 13.
- Ye G., Nesmith A., Parker K.* 2014. The role of mechanotransduction on vascular smooth muscle myocytes cytoskeleton and contractile function. *Anat. Rec.* V. 297. P. 1758.
- Zhang J., Wang L., Fu W., Wang C., Guo D., Jiang J., Wang Y.* 2013. Smooth muscle cell phenotypic diversity between dissected and unaffected thoracic aortic media. *J. Cardiovasc. Surg.* V. 54. P. 511.

FEATURES OF MOLECULAR PHENOTYPE AND ULTRASTRUCTURE OF SMOOTH MUSCLE CELLS IN ASCENDING AORTA IN PREMATURE BORN RATS

O. N. Serebryakova^{a, *}, V. V. Ivanova^a, I. V. Milto^{a, b}

^aDepartment of Morphology and General Pathology of the Siberian State Medical University, Tomsk, 634050, Russia

^bDepartment of Molecular and Cellular Radiobiology of the Seversk Biophysical Research Center of the FMBA of Russia, Seversk, 636013, Russia

*e-mail: oserebryakovan@gmail.com

Preterm birth can contribute to the development of diseases of circulatory system in adulthood due to the incompleteness of the morphogenesis of the blood vessels wall. Smooth muscle cells are the leading cell population in the middle shell of the aortic wall and are plastic in nature, i. e. they are able to change their phenotype depending on the conditions of their environment. The presence of synthetically active smooth muscle cells in the aortic wall of an adult individual is a predictor of the formation of a wide range of cardiovascular diseases. The aim of our study is to identify the morphofunctional features of molecular phenotype and ultrastructure of smooth muscle cells of ascending aorta wall in rats born 12 and 24 hours prematurely. The paper presents the results of immunohistochemical and morphometric, as well as ultrastructural analysis of ascending aorta wall in Wistar rats born 12 and 24 hours prematurely. It has been shown that preterm birth leads to a later change in the phenotype of smooth muscle cells from synthetic to contractile, which can negatively affect the morphofunctional state of the cardiovascular system.

Keywords: aorta, preterm birth, rats, phenotype, smooth muscle cells