

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

«Идентификация уникальной клеточной популяции в типичных местах
развития атеросклеротических поражений»

(промежуточный, 1 этап)

Москва 2019

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

С.н.с. отдела лабораторной
диагностики медицинского
научно-образовательного
центра МГУ имени М.В.
Ломоносова

_____ Балацкий А.В.

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение.....	4
2. Материалы и методы	5
3. Результаты и обсуждение.....	7
4. Заключение	8
Список использованных источников	9

1. Введение

Несмотря на огромную медицинскую значимость атеросклероза его молекулярные и клеточные механизмы до конца не ясны. Хорошо известно, что атеросклероз чаще всего развивается в типичных местах – изгибах и бифуркациях артериального русла (Fernandez-Friera, Penalvo et al. 2015). Однако подавляющее большинство атерогенных факторов, таких как возраст, гиперлипидемия, ожирение и курение действуют системно, и, следовательно, существует механизм индукции формирования атеросклеротического поражения. Современные представления об атерогенезе значительную роль в формировании атеросклеротических бляшек в конкретных местах отводят напряжению сдвига, меняющемуся при переходе ламинарного потока крови в турбулентный изгибах и разветвлениях сосудов. Действительно, при изменении напряжения сдвига меняется уровень экспрессии различных генов в сосудистой стенке (Steffensen, Mortensen et al. 2015), однако в организме человека существуют относительно прямые участки артерий, где атеросклеротические поражения возникают достаточно часто – например, средний сегмент передней нисходящей коронарной артерии. Примечательно, что у ApoE-дефицитных мышей (модель атеросклероза у животных) коронарный атеросклероз не развивается, хотя анатомия их коронарного русла принципиально не отличается от таковой у человека (Andrés and Dorado 2015). По всей видимости, в типичных местах развития атеросклеротических поражений располагаются клетки, оказывающие существенное влияние на начальные стадии этого процесса.

Это предположение подтвердилось, когда появились сообщения о том, что в типичных местах атерогенеза располагаются прогениторные клетки мезинхимного происхождения, несущие маркеры CD146 и NG2 (Roostalu, Aldeiri et al. 2018). Авторы этой работы считают данные клетки незрелыми гладкомышечными клетками. Однако ранее в литературе встречались сообщения о том, что в субэндотелиальном слое крупных артерий располагаются перициты, также являющиеся прогениторными клетками

мезенхимного происхождения (Andreeva, Pugach et al. 1998), поэтому обнаруженные Roostalu и соавт. клетки могут являться перицитами.

Для дальнейшего изучения роли данных клеток в развитии атеросклероза необходима их более точная идентификация по поверхностным маркерам. Мы предположили, что эти клетки могут экспрессировать рецептор лептина, являющийся одним из маркеров перицитов.

В *задачи первого этапа* выполнения НИР входила подготовка и отбор экспериментальных животных, а также изготовление препаратов аорты.

2. Материалы и методы

В работе использовались мыши C57BL/6, полученные из вивария НМИЦ Кардиологии Минздрава РФ. Животные содержались в виварии факультета фундаментальной медицины МГУ со свободным доступом к воде и пище и с 12-часовыми периодами светлого и тёмного времени.

Для получения препаратов аорты животные подвергались эвтаназии при помощи углекислого газа, после чего фиксировались на столике для препарирования. Животное вскрывалось продольным разрезом вдоль тела и поперечными разрезами по направлению к конечностям. Удалялись желудочно-кишечный тракт и печень, после чего отсекались почки. Грудная клетка вскрывалась разрезами с двух сторон, и передняя часть рёбер удалялась. В левый желудочек сердца вводилась игла 26G, присоединённая к 20 мл шприцу с фосфатно-солевым буфером (PBS). Левый желудочек и аорта перфузировались 5 мл PBS для удаления крови. В случае формалиновой фиксации левый желудочек и аорта дополнительно перфузировались 4% формалином на PBS. Далее аорта выделялась вместе с сердцем до почечных артерий. Последующие действия зависели от типа изготавливаемого препарата и способа фиксации.

Для изготовления криосрезов аорта переносилась в чашку Петри с PBS. Под стереомикроскопом аорта отделялась от сердца максимально близко к

последнему, удалялся периваскулярный жир и окружающие аорту ткани. Очищенная аорта заливалась средой для заморозки Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura) и замораживалась в парах жидкого азота. Полученные блоки хранились при -80°C . Далее из блоков при помощи криостата Leica CM1860 UV изготавливались криосрезы толщиной 10 мкм на стеклах Superfrost Plus Slides (Thermo). Срезы на стеклах высушивались в течение 1 часа, просматривались при помощи светового микроскопа для определения качества срезов, заворачивались в полиэтиленовую плёнку и хранились при температуре -20°C для дальнейшего окрашивания антителами.

Для изготовления препаратов аорты целиком (whole mount) с фиксацией формалином аорта после извлечения помещалась в 4% формалин на PBS на 40-60 минут. После этого производилась описанная выше очистка от периваскулярного жира и тканей, а также изготовление препарата анфас. Для этого аорта разрезалась вдоль по всей длине по малой кривизне, а по большой кривизне – до конца дуги аорты. При этом устья сосудов, отходящих от дуги аорты, также разрезались вдоль (рисунок 1). После этого аорта помещалась обратно в 4% формалин на PBS на 2-4 часа. После фиксации аорта хранилась в PBS с добавлением 0,02% азиды натрия при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.

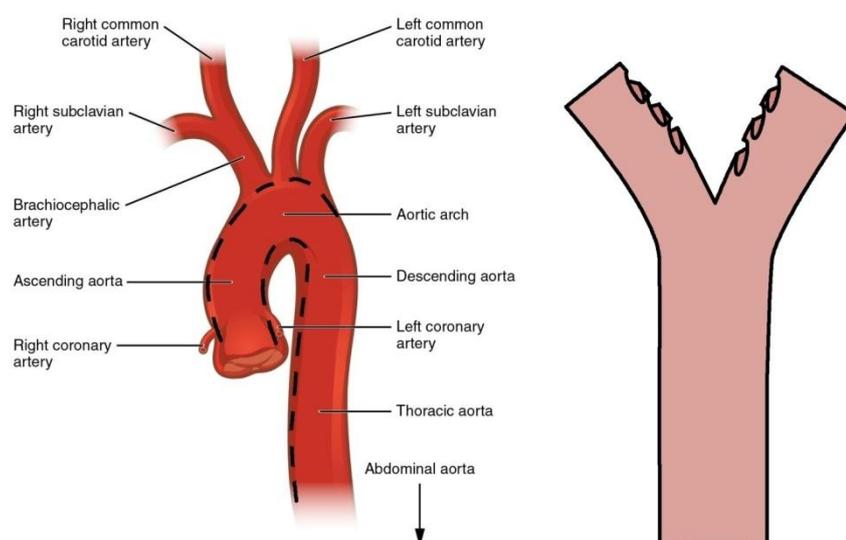


Рисунок 1 – изготовление препарата аорты анфас.

Для изготовления препаратов аорты целиком с фиксацией ацетоном очистка от периваскулярного жира и тканей, а также разрезание для изготовления препарата анфас, производились сразу после выделения. Затем аорта погружалась в ацетон при температуре -20°C на 20 минут. Далее аорта высушивалась на воздухе и хранилась в герметично закрытой пластиковой пробирке при комнатной температуре.

3. Результаты и обсуждение

Первой задачей в рамках настоящей НИР был отбор и подготовка экспериментальных животных. Исследования атеросклероза проводятся обычно на мышах, крысах или кроликах. Наиболее часто используются мыши, как более дешёвые и удобные для работы животные.

Мыши были использованы и в работе Roostalu и соавт., в которой было показано наличие в бифуркациях крупных сосудов прогениторных клеток мезенхимного происхождения. Кроме того, для дальнейшего изучения роли этих клеток в развитии атеросклероза в будущем понадобятся животные модели атеросклероза, а в этом качестве чаще всего используются трансгенные мыши (дефицитные по ApoE или рецептору ЛПНП). Большинство трансгенов используют в качестве бэкграунда линию мышей C57BL/6. Именно поэтому данные животные были выбраны нами для дальнейшей работы.

Важным моментом в подготовке животных являлся выбор способа эвтаназии. Часто используемый метод перелома шейного отдела позвоночника приводит к разрыву аорты, что в нашем случае неприемлемо. Нами был использован более гуманный способ, сохраняющий целостность сосудистого русла – ингаляция углекислого газа.

Для идентификации клеток в бифуркациях сосудистого русла может быть использовано как иммуногистохимическое окрашивание срезов сосудов, так и окрашивание сосудов целиком. Окрашивание срезов позволяет лучше изучить морфологию сосуда, однако с учётом того, что

прогениторные клетки интимы встречаются довольно редко, изучение окрашенной целиком аорты при помощи конфокальной микроскопии может дать лучший результат. Поэтому в ходе выполнения НИР были изготовлены как криосрезы, так и препараты аорты целиком.

Выбор метода фиксации также очень важен для успешной иммуногистохимической окраски. Чаще всего используется фиксация формалином, однако ранее мы показали, что используемые нами антитела против NG2 и CD146 лучше работают при использовании ацетоновой фиксации. Поэтому для дальнейшей работы было изготовлено четыре фиксированных формалином и четыре фиксированных ацетоном препарата аорты.

Фиксация криосрезов проводится непосредственно перед началом процедуры окраски, поэтому на данном этапе криосрезы по методам фиксации не разделяли. Всего было изготовлено 4 криоблока, из которых было получено 80 стёкол с криосрезами. Не менее 20 из этих стёкол содержат срезы бифуркаций крупных сосудов, а также места отхождения мелких сосудов (межрёберных артерий) от аорты. Эти срезы будут использованы для иммуногистохимической окраски.

4. Заключение

В ходе выполнения первого этапа НИР отобраны экспериментальные животные, отработаны методы изготовления и фиксации препаратов. Изготовлены препараты, которые будут использованы на следующих этапах работы. Задачи первого этапа НИР выполнены полностью.

Список использованных источников

1. Andreeva, E. R., I. M. Pugach, et al. (1998). "Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed." *Tissue Cell* 30(1): 127-135.
2. Andrés, V. and B. Dorado (2015). *Methods in Mouse Atherosclerosis*, Springer New York.
3. Fernandez-Friera, L., J. L. Penalvo, et al. (2015). "Prevalence, Vascular Distribution, and Multiterritorial Extent of Subclinical Atherosclerosis in a Middle-Aged Cohort: The PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) Study." *Circulation* 131(24): 2104-2113.
4. Roostalu, U., B. Aldeiri, et al. (2018). "Distinct Cellular Mechanisms Underlie Smooth Muscle Turnover in Vascular Development and Repair." *Circ Res* 122(2): 267-281.
5. Steffensen, L. B., M. B. Mortensen, et al. (2015). "Disturbed Laminar Blood Flow Vastly Augments Lipoprotein Retention in the Artery Wall: A Key Mechanism Distinguishing Susceptible From Resistant Sites." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35(9): 1928-1935.