Дергилев К. В.¹, Цоколаева З. И.¹, Белоглазова И. Б.¹, Ратнер Е. И.¹, Парфенова Е. В.^{1, 2} ¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия ² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», Москва, Россия

Сравнительная эффективность эпикардиальной трансплантации прогениторных клеток сердца в виде клеточных пластов и интрамиокардиальных инъекций при стимуляции регенеративных процессов в постинфарктном сердце

Ключевые слова: прогениторные клетки сердца, инфаркт миокарда, васкуляризация, тканеинженерная конструкция на основе пласта клеток.

Ссылка для цитирования: Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б., Ратнер Е.И., Парфенова Е.В. Сравнительная эффективность эпикардиальной трансплантации прогениторных клеток сердца в виде клеточных пластов и интрамиокардиальных инъекций при стимуляции регенеративных процессов в постинфарктном сердце. Кардиология. 2019;59(5):53–60.

Резюме

В настоящее время трансплантация стволовых/прогениторных клеток является перспективным направлением в лечении пациентов с заболеваниями сердца. Терапевтический потенциал трансплантированных клеток напрямую зависит от способа их доставки в миокард, что определяет регенеративные свойства этих клеток и важно для разработки эффективных методов клеточной терапии. В данной работе проведена сравнительная оценка эффективности трансплантации прогениторных клеток сердца (ПКС) в виде интрамиокардиальных инъекций и тканеинженерных конструкций (ТИК), состоящих из сформированных *in vitro* пластов клеток и наработанного ими внеклеточного матрикса. Показано, что трансплантация ТИК на основе ПКС по сравнению с интрамиокардиальным способом доставки обеспечивает более общирное распределение и сохранение значительно большего числа пролиферирующих клеточных элементов в поврежденном миокарде, замедляет негативное ремоделирование левого желудочка и способствует его васкуляризации.

Dergilev K. V.¹, Tsokolayeva Z. I.¹, Beloglazova I. B.¹, Ratner E. I.¹, Parfyonova E. V.^{1, 2}

¹ National Medical Research Center for Cardiology, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Epicardial Transplantation of Cardiac Progenitor Cells Based Cells Sheets is More Promising Method for Stimulation of Myocardial Regeneration, Than Conventional Cell Injections

Keywords: cardiac progenitor cells; myocardial infarction; vascularization; cell sheet For citation: Dergilev K.V., Tsokolayeva Z. I., Beloglazova I. B., Ratner E. I., Parfyonova E. V. Epicardial Transplantation of Cardiac Progenitor Cells Based Cells Sheets is More Promising Method for Stimulation of Myocardial Regeneration, Than Conventional Cell Injections. Kardiologiia. 2019;59(5):53–60.

SUMMARY

Today, transplantation of stem/progenitor cells is a promising approach for the treatment of heart diseases. The therapeutic potential of transplanted cells directly depends on the method of delivery to the myocardium, which determines their regenerative properties. It is important for the development of effective methods of cell therapy. In this paper, we performed a comparative study of efficacy of cardiac progenitor cell (CPC) transplantation by intramyocardial needle injections and by tissue engineering constructs (TEC) – "cell sheets" consisting of cells and their extracellular matrix. It has been shown, that transplantation of TEC in comparison with the intramyocardial delivery provides more extensive distribution and retains more proliferating cellular elements in the damaged myocardium, attenuates the negative cardiac remodeling of the left ventricle and promotes its vascularization.

Information about the corresponding author:

Dergilev Konstantin V. – MD, PhD, leading researcher. E-mail: doctorkote@gmail.com

тердечно-сосудистые заболевания на протяжении нескольких десятилетий лидируют в списке причин смертности населения в мире, опережая значительно все другие болезни [1]. Одной из важнейших проблем в этой области является сердечная недостаточность, увеличение распространенности которой в последние годы приобретает характер эпидемии [2]. В настоящее время кардиология столкнулась с исчерпанием возможностей современной терапии существенно улучшить прогноз у этих больных. Отчасти проблема решается пересадкой сердца, но она ограничена недостатком доноров и необходимостью длительной иммуносупрессии. Поэтому современная медицина оказалась перед серьезным вызовом, а именно необходимостью разработки средств, позволяющих восстанавливать необратимо утраченные клетки миокарда. Определенные надежды в этой области возлагаются на клеточную терапию. Однако ее эффективность напрямую зависит от способа доставки клеточного материала – чаще всего в виде локального инъекционного введения суспензии клеток, что приводит к их повреждению и снижению выживаемости после трансплантации. Возможной альтернативой в этой ситуации может являться трансплантация клеток в виде сформированных тканеинженерных конструкций (ТИК), состоящих из пластов клеток и наработанного внеклеточного матрикса, которые широко используются в различных областях медицины [3]. Особый интерес для создания ТИК представляют прогениторные клетки сердца (ПКС), которые участвуют в поддержании клеточного гомеостаза сердца в норме и после повреждения [4-7]. Эти клетки могут быть выделены из образцов миокарда, культивированы in vitro и после трансплантации осуществлять функции индуктора регенеративных процессов при повреждении сердца ишемической и неишемической природы [8-11].

Целью данного исследования была сравнительная оценка эффективности трансплантации ПКС после инфаркта миокарда (ИМ) в виде клеточной суспензии и ТИК на основе пластов клеток.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на крысах линии Wistar, приобретенных в питомнике лабораторных животных «Пущино» (Пущино, Россия). Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде в соответствии с требованиями ГОСТ. Эвтаназию крыс проводили после ингаляционной наркотизации изофлюраном с помощью метода дислокации шейного отдела позвоночника. Все необходимые манипуляции, которые выполняли в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/ЕС по экспериментам на животных, были одобрены этическим комитетом института (ФГБУ «Национальный центр медицинских исследований кардиологии» МЗ РФ).

Получение и культивирование резидентных ПКС. Получение культуры C-kit+ ПКС крысы проводили в соответствии с методом, описанным ранее [12]. Сердца самцов крыс измельчали с помощью ножниц до получения кусочков размером 2-3 мм³, промывали раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ) и обрабатывали ферментативным раствором, 0,1% коллагеназы А, и 0,2% трипсина в течение 15 мин. После этого к смеси добавляли тройной объем среды DMEM/F12 с 10% фетальной бычьей сывороткой и центрифугировали в течение 3 мин при 50g. Обработанные кусочки миокарда промывали ФСБ и высаживали на культуральные чашки, покрытые фибронектином, для получения эксплантной культуры. Через 2 нед клетки экспланта использовали для иммуномагнитной селекции с помощью первичных антител к маркерам c-kit, CD 45 и вторичных антител, конъюгированных с магнитными бусинами. Иммуномагнитную селекцию проводили в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя реагентов. Культивирование с-kit+CD45-ПКС проводили в среде DMEM/F12, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой, 100 ед/мл пенициллина/стрептомицина, 2 мМ L-глутамина, 2% В27, раствором инсулинтрансферринселината и факторами роста: 20 нг/мл bFGF, 20 нг/мл EGF, 10 нг/мл LIF.

Получение ТИК на основе пластов ПКС. Получение ТИК на основе пластов ПКС проводили с использованием культуральных чашек, покрытых термочувствительным полимером, в соответствии с методом, описанным ранее [12]. Клетки высаживали на 12-луночные культуральные чашки Nunc[™] Dishes с термочувствительным покрытием (100·10⁴ клеток/лунку) и культивировали в течение 72 ч в инкубаторе при 5% CO₂ и температуре 37 °C. Затем температуру культуральной чашки с клетками понижали до менее 37 °C, что приводило к спонтанному откреплению сформированной ТИК.

Моделирование ИМ и трансплантация клеток. ИМ индуцировали путем перевязки передней нисходящей коронарной артерии крыс Wistar [13]. Перед трансплантацией ПКС метили флуоресцентным красителем CM-Dil в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя реагента. Экспериментальных животных разделяли на 3 группы по 24 особи в каждой: контрольная группа (интрамиокардиально выполняли 4 инъекции среды М199 без добавок по 50 мкл каждая), группа интрамиокардиального способа доставки клеток (клеточный препарат ПКС трансплантировали с помощью интрамиокардиального способа введения – 4 инъекции по 25·10⁴ клеток/50 мкл среды М199) и группа эпикардиальной трансплантации ПКС (ТИК, сформированную из 100-10⁴ клеток, накладывали на эпикардиальную поверхность сердца над областью повреждения). Забой животных выполняли через 14 дней после трансплантации клеточного препарата.

Оценка миграции ПКС из области трансплантации. Забой животных выполняли через 7 и 14 дней после трансплантации клеток в виде инъекции или в составе ТИК. Перед забором сердец в полость миокарда левого желудочка (ЛЖ) вводили 0,1 мл насыщенного раствора КСl, что приводило к остановке сокращений в диастолу. Предсердия и крупные сосуды иссекали, сердца промывали изотоническим раствором натрия хлорида, помещали в криосреду ОСТ и замораживали в жидком азоте. Криосрезы сердец (7 мкм толщина каждого, порезанные с интервалом 300 мкм между срезами поперек от верхушки до основания ЛЖ) хранили при температуре –70°С.

Площадь миокарда, содержащую ПКС с флуоресцентной меткой CM-Dil, оценивали на криосрезах сердца с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 200 M и обсчитывали программой Imaje J.

Морфометрический анализ. Все полученные криосрезы сердец окрашивали с помощью метода Мэллори с использованием следующих растворов: А (1% кислый фуксин), В (1% фосфомолибденовая кислота) и С (2% оранжевый G, 0,5% метиловый синий, 2% щавелевая кислота). Зафиксированные криосрезы инкубировали последовательно в растворе А (2 мин), растворе В (4 мин) и растворе С (15 мин). Слайды промывали дистиллированной водой между окрашиванием красителями, обезвоживали и монтировали, используя среду на основе ксилола.

Количественный анализ размеров рубца и других морфометрических параметров выполняли с помощью пакета программ MetaMorph Microscopy Automation & Image Analysis Software. Размер инфаркта оценивали на основании подсчета площади рубца по отношению к площади ЛЖ и выражали в процентах.

Для количественного определения степени дилатации ЛЖ использовали модифицированный метод Хохмана:

Индекс дилатации = (площадь полости ЛЖ/общая площадь ЛЖ) × (средняя толщина неповрежденной области ЛЖ/средняя толщина стенки ЛЖ в зонах риска).

Для расчета индекса трансмурального поражения использовали следующую формулу [14]:

(Индекс трансмурального поражения (%) = длина трансмурального инфаркта, затрагивающая эпикард/общая длина инфаркта)х100).

Гистологическая оценка состояния клеток имплантата и васкуляризации. Замороженные криосрезы миокарда фиксировали 3,7% параформальдегидом (20 мин) и промывали ФСБ (5 мин). Срезы миокарда блокировали раствором, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина, 10% сыворотки донора вторых антител в ФСБ (30 мин). После этого криосрезы окрашивали антителами к маркерам Ki67, cleavedcaspase-3, CD31, α-SMA в течение 1 ч, затем промывали и окрашивали вторичными антителами, конъюгированными с AlexaFluor 488 (1:800, 1 ч при температуре 37 °C).

Анализ плотности сосудистой сети в периинфарктной области включал подсчет CD31+-капилляров без просвета, CD31+-структур с просветом и количество а-SMA+ CD31+-артериол. Подсчет проводили в программе Imaje J software. Данные представлены в формате количество сосудов на 1 мм² площади стенки ЛЖ.

Количество сохранившихся после трансплантации ПКС, содержащих флуоресцентную метку Cell Tracker CM-Dil, оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 200 М и ручного подсчета в программе Imaje J software.

Отслеживание «судьбы» трансплантированных ПКС. Для отслеживания дифференцировочной способности ПКС после трансплантации проводили доставку клеток крыс-самцов в миокард самок-реципиентов (n=15). Экспериментальных животных разделили на 3 группы по 5 в каждой: контрольная группа (интрамиокардиально выполняли 4 инъекции среды М199 без добавок, по 50 мкл каждая), группа интрамиокардиального способа доставки клеток (клеточный препарат ПКС трансплантировали с помощью интрамиокардиального способа введения (4 инъекции по 25.10⁴ клеток/50 мкл среды М199) и группа эпикардиальной трансплантации ПКС (ТИК, сформированную из 100.10⁴ клеток, накладывали на эпикардиальную поверхность сердца над областью повреждения). Животных забивали через 14 дней после трансплантации клеточного препарата. Детекцию Y-хромосомы в трансплантированных ПКС проводили с помощью набора Mouse & Rat IDetect Chromosome Paint Probes FISH. Дифференцировку трансплантированных ПКС в эндотелиальном направлении оценивали на основании наличия У-хромосомы и одновременного окрашивания на маркер клеток эндотелия CD31.

Микроскопия и анализ изображений. Анализ клеток и криосрезов миокарда проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 200 М и программного обеспечения Axiovision 3.1.

Статистический анализ данных. Данные представлены в формате среднее ±SD. Статистическую оценку достоверности различий проводили с использованием теста Манна–Уитни и программного пакета Statistica 8.0.

Результаты

В данной работе было проведено сравнение эффективности трансплантации ПКС в виде клеточной суспензии и в составе ТИК на модели ИМ у крысы. Было показано, что оба способа трансплантации обеспечивают сохранение ПКС в миокарде на протяжении всего периода наблюдения. При эпикардиальной трансплантации наблюдалась выраженная миграция ПКС, мечен**Рисунок 1.** Миграция ПКС из трансплантированной ТИК в поврежденный миокард: через 7 (А) и 14 (Б) дней после эпикардиальной трансплантации ТИК.



ПКС помечены Cell Tracker CM–Dil (красный), стрелки указывают на мигрирующие клетки. Здесь и на рис. 2, 3: ТИК – тканеинженерные конструкции; ПКС – прогениторные клетки сердца.

ных флуоресцентным красителем Cell Tracker CM-Dil, из ТИК в подлежащие слои миокарда ЛЖ (рис. 1). При интрамиокардиальном способе трансплантации

ПКС локализовались исключительно в виде обширных скоплений и практически не мигрировали из зоны первичного введения. Площадь ЛЖ, содержащая трансплантированные ПКС, при эпикардиальной трансплантации была в 2,7 раза больше, чем при введении суспензии. Использование ТИК по сравнению с интрамиокардиальным способом доставки способствовало более выраженной интеграции в миокард и сохранению значительно большего количества трансплантированных клеток (128±43 и 38±16 клеток/мм² соответственно; p<0,05).

Для оценки жизнеспособности ПКС мы провели сравнение пролиферации и уровня гибели ПКС, трансплантированных с помощью двух способов. Результаты количественного подсчета показали, что число меченых ПКС, экспрессирующих маркер пролиферации Кі67 после эпикардиальной трансплантации, было существенно больше, чем при интрамиокардиальном способе введения клеток (26±4 и 8±3 клетки/мм² соответственно; р<0,05). Достоверных различий по количеству трансплантированных ПКС, содержащих маркер апоптоза (cleavaedcaspase-3), выявлено не было.

Результаты гистоморфометрических исследований срезов сердца указывали на существенные изменения структуры и архитектоники миокарда во всех исследуемых группах, что отражает глубокие тканевые изменения, возникающие после ИМ. Выраженные нарушения перфузии миокарда явились причиной развития обшир-

Рисунок 2. Морфометрическая оценка ремоделирования и васкуляризации в стенке левого желудочка сердца крысы через 14 дней после инфаркта миокарда и трансплантации ПКС в виде суспензии или в виде ТИК.



На гистограммах суммированы количественные данные: А – о размере инфаркта, распространенности трансмурального поражения, дилатации полости ЛЖ; Б – о плотности капилляров, сосудов с просветом и артериол в периинфарктной области.

Данные представлены в виде среднего значения ± SD. * – p<0,05. $\Lambda {\rm W}$ – левый желудочек. **Рисунок 3.** Формирование CD31+-сосудистых структур в стенке левого желудочка сердца после инфаркта миокарда и трансплантации ПКС в виде суспензии или в виде ТИК.



Иммунофлуоресцентное окрашивание ткани миокарда антителами к маркеру сосудов CD31: А – трансплантированные в виде суспензии ПКС помечены флуоресцентным красителем Cell Tracker CM–Dil (красный), стрелки указывают на CM–Dil+ ПКС, интегрированные в состав новообразованных сосудов; Б – трансплантированные в виде ТИК ПКС помечены флуоресцентным красителем Cell Tracker CM–Dil (красный), стрелки указывают на CM–Dil + ПКС, интегрированные в состав новообразованных сосудов; В – иммунофлуоресцентное окрашивание ткани миокарда антителами к маркеру сосудов CD31 и У-хромосоме, позволяющих подтвердить ангиогенный потенциал трансплантированных клеток; стрелки указывают на CD31 + Y-хромосома + ПКС формирующие сосуды.

ных полей фиброза в сердечной мышце. Количественные исследования показали, что достоверных различий по площади рубцовой ткани между контрольной группой и у животных после интрамиокардиальной трансплантации ПКС не было. Между тем трансплантация ТИК вызывала статистически значимое уменьшение размера рубцовой ткани, а также выраженности трансмурального поражения стенки ЛЖ (рис. 2, А). Другим важным показателем, коррелирующим с риском внезапной сердечной смерти и систолической дисфункции [15], является степень дилатации полости ЛЖ. Расширение полости ЛЖ в раннем периоде после ИМ относится к компенсаторному механизму, поддерживающему систолический объем ЛЖ. В работе показано, что оба способа трансплантации ПКС ограничивали развитие дилатации полости ЛЖ, а это является важнейшим индикатором уменьшения негативного ремоделирования и снижения риска развития сердечной недостаточности (см. рис. 2, А).

Возможным механизмом снижения уровня дилатации АЖ и трансмурального поражения является раннее восстановление сосудистой сети и микроциркуляции в зоне повреждения. Хотя достоверных различий по количеству капилляров между группами выявлено не было, после трансплантации ТИК и клеточной суспензии наблюдалось значительное увеличение числа артериол в зоне повреждения по сравнению с контрольной группой (рис. 2, Б). Кроме того, количество CD31+-сосудов с просветом на 1 мм² площади ткани после трансплантации клеточной накладки в периинфарктной зоне было значительно больше, чем в группе контроля и группе введения клеточной суспензии. Это позволило предположить, что трансплантированные клетки могут принимать участие в формировании новой сосудистой сети в области повреждения. Для подтверждения этой гипотезы было проведено окрашивание срезов миокарда антителами к маркеру эндотелиальных клеток CD31, позволяющее визуализировать новообразованные сосуды (рис. 3). Было показано, что через 2 нед после трансплантации ТИК хорошо интегрируется с тканью ЛЖ и в ней формируется большое количество сосудов разного калибра. Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов миокарда позволило также выявить сформированные сосуды в области клеточного графта после интрамиокардиального способа доставки клеток (см. рис. 3, А). Для подтверждения возможности дифференцировки трансплантированных клеток ПКС, полученные от самцов, были трансплантированы в сердце самок, после чего была выполнена детекция У-хромосомы и маркера эндотелиальных клеток (см. рис. 3, В). У-хромосома выявлялась в составе CD31+-клеток, формирующих эндотелиальную выстилку сосудов. Однако лишь 1,1±0,4% эндотелиальных клеток в составе сформированных сосудов после трансплантации ТИК и 0,3±0,1% в случае интрамиокардиального введения несли Ү-хромосому. Эти данные позволяют утверждать, что большинство сосудов в составе трансплантированных клеточных графтов формируется из клеток животного-реципиента.

Обсуждение

Гибель большинства клеток после трансплантации является важнейшей причиной недостаточной эффективности клеточной терапии заболеваний сердца, при которой трансплантация клеток осуществлялась путем вну-

трикоронарного или внутримиокардиального введения клеточной суспензии через иглу. Подавляющее большинство клеток, использованных для трансплантации, включая эмбриональные стволовые клетки [16], кардиомиоциты, полученных из iPSCs [17], мезенхимальные стволовые клетки [18], мезенхимальные стволовые клетки костного мозга [19, 20], скелетные миобласты [21], эндотелиальные клетки [22], мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани [23] и кардиомиоциты [24] в значительной степени гибнут в первые дни после трансплантации. Попав в чужеродную среду, клетки теряют способность к пролиферации, установлению связей с клетками миокарда, что определяет низкую эффективность клеточной терапии и в ряде случаев приводит к появлению угрожающих жизни нарушений ритма. Кроме того, определенные сложности вызывает технология введения клеточного препарата. Было показано, что доставка клеток в виде суспензии приводит к гибели до 90% их количества как за счет механической травматизации при введении через иглу, так и путем апоптоза клеток, которые после снятия с культуральной посуды находятся в состоянии аноикиса [25]. В дополнение к этому существуют ограничения, связанные с объемом каждой инъекции, количеством трансплантированных клеток, а также с невозможностью точно установить зону введения и регулировать распределение клеток в поврежденной ткани.

Для преодоления этих ограничений были разработаны ТИК, состоящие из пластов клеток и наработанного ими внеклеточного матрикса. В составе таких конструкций прогениторные клетки формируют определенное микроокружение путем взаимодействия с соседними клетками и компонентами внеклеточного матрикса. Исследования показали, что трансплантация в поврежденный миокард ПКС в виде как суспензии, так и ТИК, обеспечивает сохранение клеток в миокарде и способствует поддержанию их высокой пролиферативной активности. При этом только эпикардиальный способ доставки клеток в миокард обеспечивал трехкратное увеличение количества пролиферирующих клеток в сравнении с интрамиокардиальным введением. Другим косвенным показателем жизнеспособности трансплантированных клеток является миграционная активность ПКС в ткани. Этот показатель оказался значительно выше при использовании ТИК, что может быть обусловлено формированием градиента хемоаттрактанта между имплантатом и зоной инфаркта, что и способствует более выраженной миграции. Высокая миграционная активность после эпикардиального способа доставки обеспечила значительное распределение клеток в зоне повреждения по сравнению с инъекционным методом введения, что являнесомненным достоинством предложенного ется

ствует уменьшению выраженности постинфарктного ремоделирования ЛЖ после трансплантации, проявляющегося в уменьшении размеров постинфарктного рубца, дилатации полости ЛЖ и распространенности трансмурального поражения. Уменьшение степени ремоделирования после ИМ коррелирует с тяжестью течения заболевания, так как изменение геометрии АЖ, его дилатация, увеличение напряжения в стенке ведут к систолической дисфункции, снижению микроциркуляции, повышению потребности миокарда в кислороде и возникновению нарушений ритма. Вероятно, эти эффекты достигаются за счет механического противодействия току крови и укреплению акинетичной стенки ЛЖ за счет трансплантированной ТИК. В работе продемонстрировано, что интрамиокардиальные инъекции ПКС существенно не влияют на размер рубцовой ткани и выраженность трансмурального поражения. Вероятно, эти эффекты обусловлены низким уровнем выживаемости и функциональной интеграции трансплантированных клеток. Оказалось, что ТИК обеспечивают статистически значимое увеличение количества сохранившихся в миокарде клеток после трансплантации и значительное распределение меченых клеток в области поврежденного миокарда. Сохранение клеток в составе ТИК может быть объяснено состоянием внеклеточного матрикса, в составе которого трансплантированы клетки. Белки внеклеточного матрикса, наработанного ПКС, формируют оптимальные механические и биологические характеристики, обеспечивая выживаемость клеток после трансплантации. Например, фибронектин способен активировать пролиферацию ПКС, способствовать запуску дифференцировки клеток в эндотелиальном и кардиомиоцитарном направлениях in vivo путем активации сигнализации через интегриновые рецепторы а5β1 26. Кроме того, именно состояние белков матрикса определяет регенеративные свойства ПКС. Культивирование ПКС на матриксе, наработанном клетками пациентов с хронической сердечной недостаточностью, вызывает подавление их паракринной активности по сравнению с матриксом от здоровых доноров [27]. Более того, в нескольких исследованиях продемонстрировано, что соотношение компонентов внеклеточного матрикса и их модификация являются определяющим фактором для запуска регенеративной программы в прогениторных клетках [28, 29]. Попадание ПКС в «чужеродное» микроокружение

подхода. Возможно, именно степень распределения

клеток в миокарде способствует комплексному воз-

действию на регенеративные процессы, в первую оче-

редь на постинфарктное ремоделирование. В данной

работе мы показали, что трансплантация ТИК способ-

с дисбалансом в компонентах матрикса предотвращает интеграцию и выживаемость трансплантированных интрамиокардиально клеток. Вероятно, сохранение жизнеспособности трансплантированных клеток в составе ТИК, действие компонентов микроокружения способны индуцировать в них дифференцировку в эндотелиальном направлении. В данной работе было продемонстрировано, что наряду с васкулогенным потенциалом трансплантированных клеток значительно увеличивалась васкуляризация поврежденного миокарда после трансплантации ПКС. Ранее было показано, что ПКС способны продуцировать значительное количество различных цитокинов, включая хемокины (TCA-3, SDF-1), факторы роста сосудов (VEGF, HGF эритропоэтин, bFGF, остеопонтин, SCF) и факторы – регуляторы дифференцировки сердца (Activin A, Dkk homolog-1, TGF- β). Они секретируются в виде белков или упакованы в экзосомы/микровезикулы, за счет которых может реализоваться терапевтическое действие ПКС [8, 30, 31]. Следовательно, сочетание этих двух механизмов может быть основой выраженного ангиогенного потенциала ПКС, который определяется способом трансплантации.

Заключение

Эпикардиальная трансплантация тканеинженерных конструкций, состоящих из пластов прогениторных клеток сердца и наработанного ими внеклеточного матрикса, может рассматриваться как перспективный подход для активации регенеративных процессов в постинфарктном сердце. Тканеинженерные конструкции обеспечивают обширное распределение и сохранение значительно большего, чем интрамиокардиальный способ доставки, числа пролиферирующих клеточных элементов в поврежденном миокарде. Вероятно, это является причиной замедления процессов негативного ремоделирования сердца и повышения его васкуляризации путем дифференцировки клеток в эндотелиальном направлении и паракринных эффектов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда №17-15-01368 (исследование ТИК) и гранта Российского фонда фундаментальных исследований №18-015-00430 (исследование интрамиокардиальной трансплантации ПКС).

Конфликт интересов не заявлен.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Prabhakaran D, Singh K, Roth GA, Banerjee A, Pagidipati NJ, Huffman MD. Cardiovascular Diseases in India Compared With the United States. Journal of the American College of Cardiology. 2018;72(1):79–95. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.04.042
- McAllister DA, Read SH, Kerssens J, Livingstone S, McGurnaghan S, Jhund P et al. Incidence of Hospitalization for Heart Failure and Case-Fatality Among 3.25 Million People With and Without Diabetes Mellitus. Circulation. 2018;138(24):2774–86. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034986
- Dergilev K. V., Makarevich P. I., Menshikov M. Yu., Parfyonova Ye. V. Application of tissue engineered constructs on the basis of cell sheets for restoration of tissues and organs. Genes and Cells. 2016;11(3):23–32. [Russian: Дергилев К.В., Макаревич П.И., Меньшиков М.Ю., Парфенова Е. В. Применение тканеинженерных конструкций на основе пластов клеток для восстановления тканей и органов. Гены и клетки. 2016;11(3):23–32]
- Dergilev K. V., Rubina K. A., Parfyonova Ye. V. Resident cardiac stem cells. Kardiologiia. 2011;51(4):84–92. [Russian: Дергилев К. В., Рубина К. А., Парфенова Е. В. Резидентные стволовые клетки сердца. Кардиология. 2011;51(4):84–92]
- Mauretti A, Spaans S, Bax NAM, Sahlgren C, Bouten CVC. Cardiac Progenitor Cells and the Interplay with Their Microenvironment. Stem Cells International. 2017;2017:1–20. DOI: 10.1155/2017/7471582
- Feng J, Li Y, Nie Y. Non-cardiomyocytes in Heart Regeneration. Current Drug Targets. 2018;19(9):1077–86. DOI: 10.2174/1389 450119666180518111931
- Leri A, Kajstura J, Anversa P. Role of Cardiac Stem Cells in Cardiac Pathophysiology: A Paradigm Shift in Human Myocardial Biology. Circulation Research. 2011;109(8):941–61. DOI: 10.1161/ CIRCRESAHA.111.243154
- Walravens A-S, Vanhaverbeke M, Ottaviani L, Gillijns H, Trenson S, Driessche NV et al. Molecular signature of progenitor cells isolated from young and adult human hearts. Scientific Reports. 2018;8(1):9266. DOI: 10.1038/s41598-018-26969-2

- Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A et al. Human cardiac stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007;104(35):14068–73. DOI: 10.1073/pnas.0706760104
- Dergilev K. V., Rubina K.A., Tsokolaeva Z. I., Sysoeva V. Yu., Gmyzina A. I., Kalinina N. I. et al. Left ventricular heart aneurism – a new source of resident cardiac stem cells. Tsitologiya. 2010;52(11):921–30. [Russian: Дергилев К. В., Рубина К. А., Цоколаева З. И., Сысоева В. Ю., Гмызина А. И., Калинина Н. И. и др. Аневризма левого желудочка – новый источник резидентных прогениторных клеток. Цитология. 2010;52(11):921–30]
- 11. Dergilev K. V., Tsokolaeva Z. I., Rubina K. A., Sysoeva V. Yu., Makarevich P. I., Boldyreva M. A. et al. Isolation and characterization of cardiac progenitor cells from myocardial right atrial appendage tissue. Tsitologiya. 2016;58(5):340–8. [Russian: Дергилев К. В., Цоколаева З. И., Рубина К. А., Сысоева В. Ю., Макаревич П. И., Болдырева М. А. и др. Получение и характеристика прогениторных клеток сердца из миокарда ушка правого предсердия. Цитология. 2016;58(5):340–8]
- 12. Dergilev KV, Makarevich PI, Tsokolaeva ZI, Boldyreva MA, Beloglazova IB, Zubkova ES et al. Comparison of cardiac stem cell sheets detached by Versene solution and from thermoresponsive dishes reveals similar properties of constructs. Tissue and Cell. 2017;49(1):64–71. DOI: 10.1016/j.tice.2016.12.001
- 13. Traktuev DO, Tsokolaeva ZI, Shevelev AA, Talitskiy KA, Stepanova VV, Johnstone BH et al. Urokinase Gene Transfer Augments Angiogenesis in Ischemic Skeletal and Myocardial Muscle. Molecular Therapy. 2007;15(11):1939–46. DOI: 10.1038/ sj.mt.6300262
- Hochman JS, Choo H. Limitation of myocardial infarct expansion by reperfusion independent of myocardial salvage. Circulation. 1987;75(1):299–306. PMID: 3791612
- Meizlish JL, Berger HJ, Plankey M, Errico D, Levy W, Zaret BL. Functional Left Ventricular Aneurysm Formation after Acute Anteri or Transmural Myocardial Infarction: Incidence, Natural History,

and Prognostic Implications. New England Journal of Medicine. 1984;311(16):1001-6. DOI: 10.1056/NEJM198410183111601

- 16. Yamada S, Nelson TJ, Crespo-Diaz RJ, Perez-Terzic C, Liu X-K, Miki T et al. Embryonic Stem Cell Therapy of Heart Failure in Genetic Cardiomyopathy. Stem Cells. 2008;26(10):2644–53. DOI: 10.1634/stemcells.2008-0187
- 17. Higuchi T, Miyagawa S, Pearson JT, Fukushima S, Saito A, Tsuchimochi H et al. Functional and Electrical Integration of Induced Phiripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Myocardial Infarction Rat Heart. Cell Transplantation. 2015;24(12):2479–89. DOI: 10.3727/096368914X685799
- Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St. John M, Xie J-S, Cattaneo S et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005;102(32):11474–9. DOI: 10.1073/pnas.0504388102
- Chen S, Fang W, Ye F, Liu Y-H, Qian J, Shan S et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. The American Journal of Cardiology. 2004;94(1):92–5. DOI: 10.1016/j.amjcard.2004.03.034
- Mykhaylichenko VY, Kubyshkin ÁV, Samarin SA, Fomochkina II, Anisimova LV. Experimental induction of reparative morphogenesis and adaptive reserves in the ischemic myocardium using multipotent mesenchymal bone marrow-derived stem cells. Pathophysiology. 2016;23(2):95–104. DOI: 10.1016/j.pathophys.2016.04.002
- 21. Ye L, Haider HK, Jiang S, Ling LH, Ge R, Law PK et al. Reversal of myocardial injury using genetically modulated human skeletal myoblasts in a rodent cryoinjured heart model. European Journal of Heart Failure. 2005;7(6):945–52. DOI: 10.1016/j. ejheart.2005.03.012
- 22. Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K et al. Repair of Infarcted Myocardium Mediated by Transplanted Bone Marrow-Derived CD34+ Stem Cells in a Nonhuman Primate Model. Stem Cells. 2005;23(3):355–64. DOI: 10.1634/stemcells.2004-0200
- 23. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Tan J, Fishbein MC, Chen P-S et al. IFATS Collection: Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells Induce Angiogenesis and Nerve Sprouting Following Myocardial Infarction, in Conjunction with Potent Preservation of Cardiac Function. Stem Cells. 2009;27(1):230–7. DOI: 10.1634/stemcells.2008-0273

- 24. Li T-S, Takahashi M, Ohshima M, Qin S-L, Kubo M, Muramatsu K et al. Myocardial repair achieved by the intramyocardial implantation of adult cardiomyocytes in combination with bone marrow cells. Cell Transplantation. 2008;17(6):695–703. PMID: 18819257
- 25. Hamdi H, Furuta A, Bellamy V, Bel A, Puymirat E, Peyrard S et al. Cell Delivery: Intramyocardial Injections or Epicardial Deposition? A Head-to-Head Comparison. The Annals of Thoracic Surgery. 2009;87(4):1196–203. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2008.12.074
- 26. Konstandin MH, Toko H, Gastelum GM, Quijada P, De La Torre A, Quintana M et al. Fibronectin Is Essential for Reparative Cardiac Progenitor Cell Response After Myocardial Infarction. Circulation Research. 2013;113(2):115–25. DOI: 10.1161/ CIRCRESAHA.113.301152
- 27. Pagano F, Angelini F, Castaldo C, Picchio V, Messina E, Sciarretta S et al. Normal versus Pathological Cardiac Fibroblast-Derived Extracellular Matrix Differentially Modulates Cardiosphere-Derived Cell Paracrine Properties and Commitment. Stem Cells International. 2017;2017:1–9. DOI: 10.1155/2017/7396462
- 28. Williams C, Budina E, Stoppel WL, Sullivan KE, Emani S, Emani SM et al. Cardiac extracellular matrix–fibrin hybrid scaffolds with tunable properties for cardiovascular tissue engineering. Acta Biomaterialia. 2015;14:84–95. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.11.035
- 29. Tallawi M, Rai R, Boccaccini AR, Aifantis KE. Effect of Substrate Mechanics on Cardiomyocyte Maturation and Growth. Tissue Engineering Part B: Reviews. 2015;21(1):157–65. DOI: 10.1089/ ten.teb.2014.0383
- 30. Iancu CB, Iancu D, Rențea I, Hostiuc S, Dermengiu D, Rusu MC. Molecular signatures of cardiac stem cells. Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie. 2015;56(4):1255–62. PMID: 26743269
- 31. Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Beloglazova I.B., Zubkova E.S., Boldyreva M.A., Ratner E.I. et al. Intramiocardial administration of resident C-kit+ cardiac progenital cells activates epicardial progenitor cells and promotes myocardial vascularation after the infarction. Genes and Cells. 2018;13(1):75–81. [Russian: Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б., Зубкова Е.С., Болдырева М.А., Ратнер Е.И. и др. Интрамиокардиальное введение резидентных C-kit+ прогениторных клеток сердца вызывает активацию прогениторных клеток эпикарда и стимулирует васкуляризацию миокарда после инфаркта. Гены и клетки. 2018;13(1):75–81]. DOI: 10.23868/201805009

Поступила 05.09.18 (Received 05.09.18)