

На правах рукописи

ЧЕПЕЛЕВА ЕЛЕНА ВАСИЛЬЕВНА

**ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГЕНЕРАТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА
КАРДИАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И КАРДИАЛЬНЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН) в лаборатории эпигенетики развития, г.Новосибирск.

**Научный
руководитель:**

Павлова Софья Викторовна
кандидат биологических наук, научный сотрудник
лаборатории эпигенетики развития
Института цитологии и генетики СО РАН

**Официальные
оппоненты:**

Амстиславская Тамара Геннадьевна
доктор биологических наук, заведующий лабораторией
трансляционной биопсихиатрии отдела
экспериментальной и клинической нейронауки
Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Научно-исследовательский институт
нейронаук и медицины», г. Новосибирск

Афанасьев Сергей Александрович
доктор медицинских наук, профессор, заведующий
лабораторией молекулярно-клеточной патологии и
генодиагностики Научно-исследовательского института
кардиологии Федерального государственного
бюджетного научного учреждения «Томский
национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук», г. Томск

**Ведущее
учреждение:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр
имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, г.Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. на утреннем заседании
диссертационного совета 24.1.239.01 (Д 003.011.01) на базе ФГБНУ «Федеральный
исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук» в конференц-зале Института
по адресу: пр. ак. Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090
тел +7 (383) 3634906, факс +7 (383) 3331278. e-mail:
dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института
www.bionet.nsc.ru

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности. В настоящее время актуальной проблемой научной медицины практического здравоохранения является ишемическая болезнь сердца (ИБС) [Benjamin et al., 2018; Roth et al., 2020]. Инфаркт миокарда (ИМ) – опасное осложнение этой болезни и одна из основных причин смертности и утраты трудоспособности населения. При нарушении кровоснабжения и развитии ишемического поражения миокарда происходит утрата здоровых кардиомиоцитов путем апоптоза и/или некроза [Marin-Garcia and Goldenthal, 2006]. В связи с этим разработка эффективных методов лечения ИБС является актуальной задачей современной медицины [Arjmand et al., 2021].

Большие перспективы в восстановлении функции миокарда открывают методы клеточной терапии, предлагающие пациентам возможность восстановительного лечения в дополнение к используемым в настоящее время хирургическим и фармакологическим методам. Первые клинические испытания клеточной терапии заболеваний сердца были проведены почти 20 лет назад, когда преимущественно использовали трансплантацию гетерогенных популяций клеток взрослого организма: миобластов из скелетной мускулатуры [Menasche et al., 2003; Menasche et al., 2008], мезенхимальных стромальных клеток костного мозга [Hare et al., 2009; Hare et al., 2012], гемопоэтических стволовых клеток [Clifford et al., 2012; Perin et al., 2012], эндотелиальных прогениторных клеток [Friis et al., 2011].

В начале 2000-х годов в качестве перспективного варианта для возможного применения в терапии ИБС начали изучать c-Kit позитивные клетки сердца, открытые группой ученых под руководством Пьеро Анверса [Beltrami et al., 2003]. Предполагалось, что кардиальные c-Kit позитивные клетки являются региональными стволовыми и могут дифференцироваться в кардиомиоциты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки, однако данная гипотеза не нашла подтверждения [Bollí et al., 2013; Van Berlo et al., 2014; Davis, 2019]. В настоящее время c-Kit позитивные клетки сердца на основании иммунофенотипа относят к региональным мезенхимальным стромальным клеткам, так же, как и клетки, полученные методом кардиосфер [Fathi et al., 2020; Kang et al., 2020]. Регенеративный эффект c-Kit позитивных клеток и клеток кардиосфер при трансплантации остается не изучен до конца, считается, что он может быть обусловлен секрецией паракринных факторов и стимуляцией терапевтического ангиогенеза [Davis, 2019].

Успех клеточной терапии напрямую зависит от эффективного способа доставки и приживления трансплантируемых клеток [Nakamura and Murry, 2019]. Использование трансгенных клеток, несущих ген люциферазы, позволяет провести количественную оценку эффективности трансплантации как биохимическими методами, так и с помощью методов прижизненной визуализации. Для повышения приживаемости клеток в организме реципиента разрабатываются способы трансплантации в составе различных матриксов или тканеинженерных конструкций. Наиболее доступным матриксом является аутологичный фибриновый гель, который может быть получен из крови пациента. Кроме того, в фибриновом геле содержится большое количество противовоспалительных и ангиогенных факторов [Cheng et al., 2012].

Для восстановления утраченной ткани миокарда при заместительной клеточной терапии может применяться трансплантация кардиомиоцитов, полученных с помощью дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) [Funakoshi et al., 2016; Kolanowski et al., 2017]. В связи с этим актуальной задачей является разработка оптимальной технологии формирования функциональной ткани сердца, способной к генерации ритмической активности и синхронным сокращениям, из полученных *in vitro* клеток [Menasche, 2018]. Для функционального созревания кардиомиоцитов применяют активацию биохимических путей, создание клеточно-инженерных пластов с использованием матриксов, электромагнитную стимуляцию, а также персистенцию незрелых кардиомиоцитов *in vivo* [Masuda and Shimizu, 2016; Funakoshi et al., 2016; Shadrin et al., 2017; Kolanowski et al., 2017].

В настоящее время проведено более 100 клинических испытаний клеточной терапии при остром ИМ и более 90 – при хронической ишемической кардиомиопатии [Fernández-Avilés et al., 2017; Nakamura and Murry, 2019]. В большинстве данных исследований была показана безопасность данного типа терапии независимо от конкретного исследуемого клеточного продукта, способа трансплантации, протокола дозирования или характеристик пациентов. Однако, на сегодняшний день остается нерешенным ряд вопросов, связанных с выбором источника клеток и способа их доставки в организм для достижения максимального эффекта в клинической практике, что делает актуальным дальнейшее проведение экспериментальных и доклинических исследований в этом направлении.

Цель исследования: Морфофункциональная характеристика кардиальных стромальных клеток и кардиальных производных ИПСК с последующей оценкой их выживаемости и сохранения функциональной активности после трансплантации в организм экспериментальных животных.

Задачи исследования:

1. Провести иммунофенотипическую характеристику полученных из фрагментов предсердия человека и крысы кардиальных стромальных клеток, оценить их ангиогенный потенциал.
2. Оценить влияние интрамиокардиальной трансплантации кардиальных стромальных клеток на функциональные и морфологические характеристики сердца на модели постинфарктного кардиосклероза у крыс линии WAG.
3. Провести количественную оценку выживаемости кардиальных стромальных клеток, трансплантированных в периинфарктную зону на модели острого инфаркта миокарда у крыс линии WAG.
4. Оценить выживаемость и функциональную активность кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека, после подкожной трансплантации в составе сформированного матрикса на основе матригеля в организм мышей иммунодефицитной линии SCID.
5. Оценить выживаемость и функциональную активность кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека, после почечной субкапсулярной трансплантации в составе сформированных клеточных пластов в организм мышей иммунодефицитной линии SCID.

Научная новизна работы. Показано, что клеточные культуры, полученные из фрагментов предсердия, гетерогенны по составу (в них присутствуют клетки, экспрессирующие маркеры мезенхимальных клеток, эндотелиальных клеток и перицитов), способны формировать капилляроподобные структуры *in vitro* и синтезировать ангиогенные ростовые факторы и рецепторы. Также показано, что способ получения клеточных культур фрагментов предсердия в составе кардиосфер в бессывороточной среде способствует поддержанию ангиогенного потенциала в условиях *in vitro*. В экспериментах на крысах с экспериментальным ишемическим повреждением миокарда было показано, что аутологичная клеточная культура, содержащая кардиальные стромальные клетки, может оказывать регенеративный эффект и не обладает способностью к длительной персистенции в сердце после трансплантации. Показано, что использование аутологичного фибринового геля в качестве матрикса для введения повышает эффективность трансплантации кардиальных стромальных клеток в периинфарктную зону. Показано, что трансплантированные под фиброзную капсулу почки мышей SCID (на срок до 6-ти недель) клеточные пласты кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека, начинают формировать упорядоченный сократительный аппарат и после эксплантации из организма сохраняют функциональную активность и способность к согласованному сокращению.

Теоретическая и практическая значимость работы. Данные, полученные в работе, целесообразно использовать для оптимизации методов получения клеточных культур, их предтрансплантационной подготовки и последующей трансплантации с целью лечения ишемических заболеваний сердца. Результаты могут быть включены в факультативные курсы лекций по регенеративной медицине для студентов вузов биологического и медицинского профилей, а также для слушателей курсов повышения квалификации в области регенеративных технологий.

Методология и методы исследования. Диссертационная работа представляет собой экспериментальное исследование, выполненное на клеточных культурах и лабораторных животных. Методологическую основу данного исследования составляют методы молекулярной и клеточной биологии, морфометрии, маркерной гисто- и иммуноцитохимии, экспериментального моделирования на животных, статистики, а также анализа данных отечественной и зарубежной литературы. При выполнении исследования и оформлении материала были применены общенаучные методы: теоретический и методологический анализ источников литературы, экспериментальные методы исследования и сравнительный анализ полученных данных.

Степень достоверности полученных результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала и использованием современных методов, соответствующих поставленным задачам. Выводы, сформулированные в диссертации, подтверждены фактическими данными, представленными в таблицах и рисунках, анализом литературы, точностью статистической обработки полученных результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Кардиальные стромальные клетки обладают регенеративным потенциалом за счет паракринной активности – при интрамиокардиальной трансплантации крысам линии WAG на стадии развития хронического кардиосклероза приводят к уменьшению площади постинфарктного фиброза миокарда.
2. Клетки, полученные при кардиальной дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, имеют фенотипические признаки различных типов кардиомиоцитов (атриальных, вентрикулярных и проводящих), сохраняют способность к спонтанному и синхронному сокращению после трансплантации в организм иммунодефицитных мышей SCID на срок до 42-х дней и могут быть использованы для разработки технологий заместительной клеточной терапии ишемической болезни сердца.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на четырех российских научных конференциях с международным участием. По теме диссертации опубликованы 8 статей в рецензируемых научных журналах, в том числе 5 статей в журналах, входящих в международные базы цитирования (WoS, Scopus).

Вклад автора. Основные результаты работы были получены автором самостоятельно. Эксперимент по моделированию инфаркта миокарда проводился совместно с Русаковой Я.Л. (ФГБУ НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина МЗ РФ, г. Новосибирск). Эхо-КГ исследование сердца у крыс проводилось ветеринарным врачом Шехтман Ю.Б. (КДЦ «Евровет», г. Новосибирск). Эксперимент по электрофизиологической характеристике клеток методом локальной фиксации потенциала проводился Сорокоумовым Е.Д. (ФИЦ ИВТ СО РАН, г. Новосибирск). Исследование методом электронной микроскопии проводилось совместно с д.б.н. Бгатовой Н.П. (НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего в себя 278 источников, в том числе 18 отечественных и 260 зарубежных авторов. Работа изложена на 172 страницах, содержит 46 рисунков и 6 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение клеточных культур. Первичные культуры клеток получали из фрагментов предсердий человека и крыс линии WAG методом механического измельчения и ферментативного гидролиза 0,2%-м раствором коллагеназы NB4 (Serva) [Павлова и др., 2013; Чепелева и др., 2015].

Выделение РНК. РНК выделяли с помощью TRI Reagent (Sigma) согласно протоколу производителя.

Синтез кДНК методом обратной транскрипции. Синтез кДНК проводили с помощью обратной транскриптазы M-MLV (Promega) согласно протоколу производителя.

Полимеразная цепная реакция. ОТ-ПЦР проводили с помощью Taq-полимеразы (Медиген) по стандартному протоколу. Количественная оценка экспрессии генов проводилась с помощью ПЦР в реальном времени с использованием смеси БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (Биолабмикс) по стандартному протоколу.

Выявление активности щелочной фосфатазы. Для выявления активности эндогенной щелочной фосфатазы использовали Naphtol phosphate (Sigma) и Fast Violet B Salt (Sigma) согласно протоколу производителя.

Иммунофлюоресцентное окрашивание. Иммунофлюоресцентное окрашивание осуществляли по протоколам производителей антител.

Проточная цитофлюориметрия. Культуры клеток анализировали на приборе FACS Canto II (BD Biosciences) согласно протоколам производителей антител.

Тест на способность клеточных культур к поглощению ацетилированного липопротеина низкой плотности. Тест проводили с помощью AcLDL (Invitrogene) согласно протоколу производителя.

Тест на способность клеточных культур к связыванию изолектина В4. Тест проводили с помощью Isolectin GS-IB4 From *Griffonia simplicifolia*, Alexa Fluor® 594 Conjugate (Sigma) согласно протоколу производителя.

Оценка ангиогенного потенциала *in vitro*. Исследование ангиогенной активности культур клеток проводили с помощью стандартного теста в тонком слое матригеля с пониженным содержанием ростовых факторов (Matrigel™, BD Biosciences) [Staton et al., 2009].

Получение GFP-позитивных культур клеток. Для маркирования клеточной культуры, полученной из предсердия крысы, конститутивной экспрессией зеленого флюоресцентного белка (GFP) использовали плазмиду рGpnr, несущую ген GFP.

Моделирование экспериментального инфаркта миокарда и интрамиокардиальная трансплантация клеточной культуры, полученной из предсердия крысы. Манипуляции с животными были одобрены биоэтической комиссией ФИЦ ИЦиГ СО РАН, протокол № 23.4 от 04.07.2014 г. Моделирование инфаркта у крыс линии WAG проводили по опубликованному протоколу [Pei et al., 2014]. Через 6 недель после моделирования ИМ животным из опытной группы (6 крыс) делали инъекции GFP-позитивных клеток (10^6 клеток), растворенных в 100 мкл PBS, животным из контрольной группы (5 крыс) делали инъекции 100 мкл PBS.

Эхо-КГ исследование функционального состояния сердца. Для проведения Эхо-КГ использовали ультразвуковой сканер SonoAce X8 (Samsung Medison), полученные данные обрабатывали по методу Тейхольца и методу Симпсона.

Прижизненная визуализация. Прижизненная визуализация трансплантированных клеток проводилась на приборе In-vivo Multispectral Imaging System FX (Kodak). Для визуализации клеток использовали прижизненный митохондриальный краситель MitoTracker® Red FM (Invitrogen).

Криофиксация и гистологическое окрашивание. Криосрезы делали с использованием криостата Microm HM-550 (Thermo Fisher Scientific). Окрашивание гематоксилин-эозином и пикро-Маллори проводили по общепринятым методикам.

Морфометрический анализ. Анализ производился с помощью программы ImageJ.

Модификация клеточной культуры, полученной из предсердия крысы, экзогенной экспрессией люциферазы. Культура клеток, экспрессирующих люциферазу, была получена с помощью лентивирусной трансдукции плазмидой рLenti PGK V5-Luc Neo.

Получение фибринового геля из крови крыс. Фибриновый гель получали из крови крыс линии WAG по опубликованному протоколу [Cheng et al., 2012].

Определение активности люциферазы в белковых экстрактах. Люминесценция регистрировалась на приборе Wallac 1420 Multilabel Counter Victor-3 (Perkin-Elmer) с использованием набора Luciferase Assay Reporter System (Promega) согласно протоколу производителя с модификациями [Павлова и др., 2017].

Трансплантация модифицированной экзогенной экспрессией люциферазы клеточной культуры, полученной из предсердия крысы, в миокард крыс линии WAG. Моделирование инфаркта у крыс линии WAG проводили по опубликованному протоколу [Pei et al., 2014]. Через 30 мин после моделирования ИМ животным из контрольной группы делали инъекции клеток в количестве 10^6 в 100 мкл среды DMEM, животным из опытной группы - 10^6 клеток в 100 мкл смеси DMEM/ фибриновый гель. Интенсивность люминесценции оценивали через 1 ч, 48 ч, 72 ч, 5 дней, 8 дней, 10 дней и 14 дней после инъекции (3 крысы в каждой точке). **Направленная дифференцировка ИПСК в кардиомиоциты.** Кардиальную дифференцировку ИПСК человека осуществляли по опубликованному протоколу [Burridge et al., 2014]. Для формирования клеточных пластов кардиомиоциты рассаживали в плотности 250000 клеток на 1 см^2 на термочувствительный пластик Nunc UpCell (Thermo Fisher Scientific).

Визуализация потоков кальция в кардиомиоцитах. Потоки кальция визуализировали с помощью красителя Fluo8 (Abcam) согласно протоколу производителя и документировали с помощью флюоресцентного микроскопа Eclipse Ti-E (Nikon). Полученные видео обрабатывали в программе ImageJ.

Электрофизиологическая характеристика кардиомиоцитов. Регистрация потенциала действия проводилась на отдельных сокращающихся клетках методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) на аппаратном комплексе в который входят усилитель Multiclamp 700B (Molecular Devices) и система сбора данных Digidata 1550 (Axon Instruments). Оцифровка сигнала проводилась с частотой 10 кГц.

Трансплантация кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека, в организм мышей линии SCID. Исследования выполняли на базе ЦКП «SPF-виварий» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, разрешение биоэтической комиссии № 22.4 от 30.05.2014 г. Трансплантацию кардиомиоцитов человека в сердце мыши проводили с помощью инъекции 3×10^5 клеток в 20 мкл смеси RPMI/Матригель. Для формирования подкожного матригельного трансплантата мышам вводили 2×10^6 кардиомиоцитов в 200 мкл смеси RPMI/Матригель. Сформированные клеточные пласты кардиомиоцитов трансплантировали под фиброзную капсулу почки мышей. Для контроля использовали кардиомиоциты, которые культивировались в слое Матригеля *in vitro* весь срок эксперимента.

Просвечивающая электронная микроскопия. Из фрагментов клеточных пластов кардиомиоцитов делали полутонкие и ультратонкие срезы по стандартной методике [Савченко и др., 2021]. Ультратонкие срезы анализировали при помощи электронного микроскопа Libra 120 (Zeiss).

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc). Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для выявления различий между группами использовали t-критерий Стьюдента. Отличия между группами считали достоверными при $P < 0,05$. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характеристика клеточных культур фрагментов предсердия человека

В данной работе в качестве источника для получения кардиальных стромальных клеток человека были выбраны фрагменты ушка правого предсердия, иссекаемые в ходе стандартного этапа операции аортокоронарного шунтирования. Материал был предоставлен НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина, все пациенты подписывали информированное согласие на участие в научном исследовании. В качестве способа культивирования клеток использовали стандартный метод получения кардиосфер, основанный на процессе формирования сферических структур в низкоадгезивных условиях [Li et al., 2010; Павлова и др., 2013]. Состав полученной клеточной культуры на 3-м пассаже охарактеризовали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания: было показано, что практически все клетки имеют мезенхимальные маркеры CD29, CD44, CD90 и CD105, в культуре присутствуют клетки, экспрессирующие маркеры эндотелиальных клеток и перицитов CD31, α SMA, VEGFR2, нестин, белки внеклеточного матрикса коллаген I типа, фибронектин и фактор фон Виллебранда, также было показано наличие c-Kit, регионального маркера кардиальных стромальных клеток (Рис. 1).

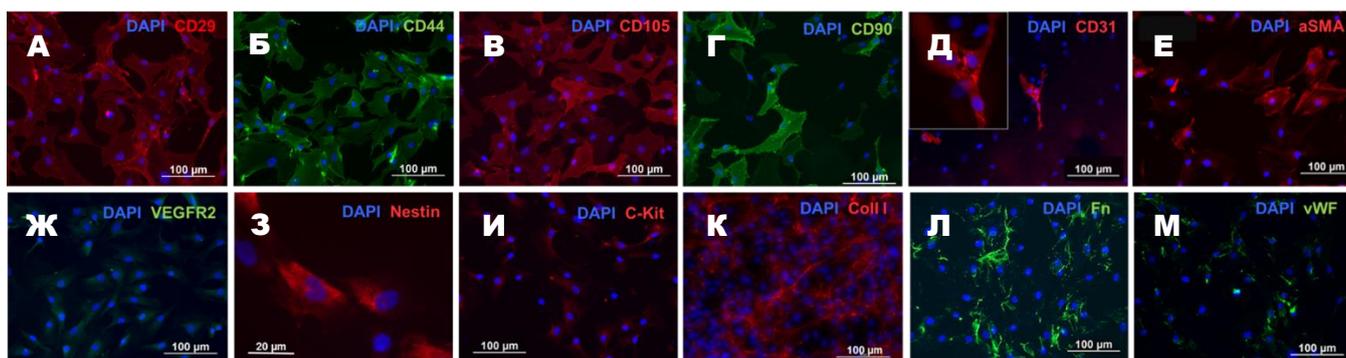


Рисунок 1. Культура клеток предсердия человека (3 пассаж), окрашивание антителами к белкам: А – CD29; Б – CD44; В – CD105; Г – CD90; Д – CD31; Е – α SMA; Ж – VEGFR2; З – нестин; И – c-Kit; К – коллаген I; Л – фибронектин; М – фактор фон Виллебранда. Ядра окрашены DAPI (синий). Шкала – 100 мкм

Для изучения экспрессии ростовых факторов клеточная культура предсердия человека была проанализирована методом ОТ-ПЦР на 3-м пассаже. В культуре выявляется наличие мРНК генов эндотелиальных факторов роста *PDGFb*, *Ang1*, *Ang2*, *VEGF*, *TGFb1* (и их рецепторов *PDGFRb*, *Tie2*, *VEGFR2*, *TGFb1R*), а также маркеров перицитов (клеток, участвующих в образовании стенки сосудов) *NG2* и *Nestin*. С помощью метода ПЦР в режиме реального времени в нескольких культурах клеток, полученных от разных пациентов, на 3-м пассаже была произведена количественная оценка экспрессии генов ангиогенных факторов и рецепторов: *Ang1*, *FGF2*, *VEGF*, *VEGFR2*, *CXCR4*, *SDF1* (Рис. 2). Можно сделать вывод, что количественная экспрессия генов, принимающих участие в ангиогенезе, в клеточных культурах, полученных от разных пациентов, может варьировать и, по-видимому, отражает гетерогенный состав популяции, состоящей из различных типов клеток, одни из которых могут производить ангиогенные факторы, в то время как другие могут их воспринимать через соответствующие рецепторы.

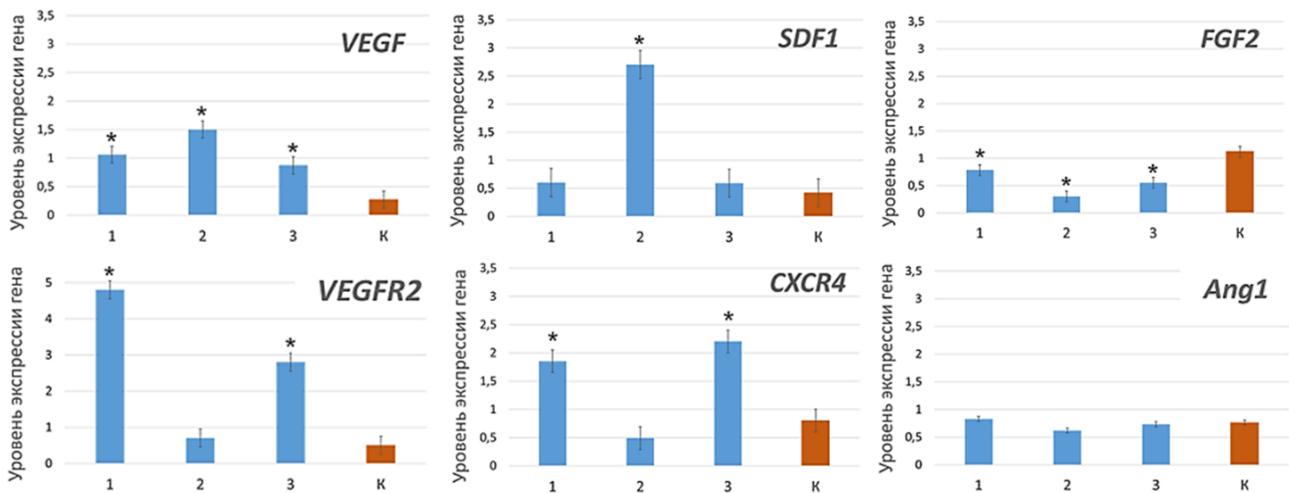


Рисунок 2. Анализ экспрессии генов ангиогенных факторов и рецепторов в клеточных культурах, полученных из предсердия человека (1,2,3). К – культура эндотелиальных клеток EA.hy926.* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем

В функциональном тесте при культивировании на Matrigel™ (экстракт компонентов базальной мембраны) клеточная культура предсердия человека формирует капилляроподобные структуры, что свидетельствует об определенном ангиогенном потенциале культуры (Рис. 3). Морфометрический анализ сформированных структур показал, что общая длина и количество точек ветвления в культуре предсердия человека были достоверно выше, чем у культуры мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга человека.

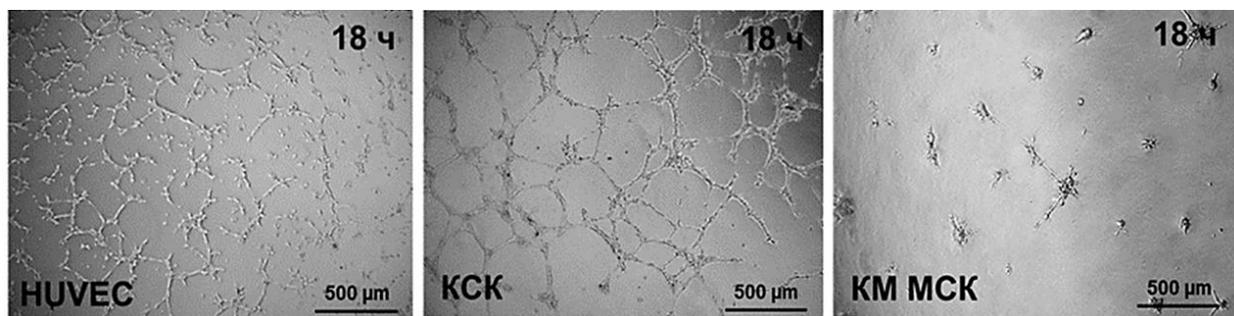


Рисунок 3. Формирование капилляроподобных структур при культивировании на Matrigel™ в течение 18 ч. HUVEC – клетки эндотелия пупочной вены человека, КСК – кардиальные стромальные клетки предсердия человека, KM МСК – мезенхимальные стромальные клетки костного мозга человека. Шкала – 500 мкм

Таким образом было показано, что клеточная культура, полученная из ушка правого предсердия человека, является гетерогенной по составу: в ней присутствуют клетки, экспрессирующие маркеры мезенхимальных клеток, эндотелиальных клеток и перицитов. Полученная нами культура способна к формированию капилляроподобных структур в функциональном тесте на ангиогенность, кроме это в ней показана экспрессия ангиогенных ростовых факторов и их рецепторов. Можно предположить, что данная клеточная культура может оказывать регенеративный эффект при трансплантации в ишемизированный миокард за счет секреции цитокинов и ростовых факторов, а также стимуляции терапевтического ангиогенеза в зоне повреждения.

2. Характеристика клеточных культур фрагментов предсердия крысы

При получении клеточных культур из фрагментов предсердия крысы для исключения влияния состава сыворотки животного происхождения на конечный результат эксперимента использовали культивирование клеток в виде первичных кардиосфер в бессывороточной среде с добавлением заменителя сыворотки Knockout™ Serum Replacement. Клетки полученной культуры имели округлую или овальную форму, росли группами во взвешенном состоянии, не прикрепляясь к поверхности культурального пластика (Рис. 4 А). Для проведения анализа клетки суспензионной культуры переводили на ростовую среду, содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), с целью прикрепления к поверхности культурального пластика или предметного стекла.

Клетки в культуре, полученной из предсердия крысы, окрашивались антителами к CD31, нестину и нарабатывали коллаген I типа и фибронектин (Рис. 4 Б, В, Е, Ж). Также клетки полученной культуры характеризовались способностью связывать изолектин В4 и поглощать ацетилированный липопротеин низкой плотности, что свойственно эндотелиальным клеткам [Liew et al., 2006; Mieno et al., 2008] (Рис. 4 Г, З). Кроме этого клетки формировали капилляроподобные структуры в функциональном тесте на ангиогенность *in vitro* (Рис. 4 Д).

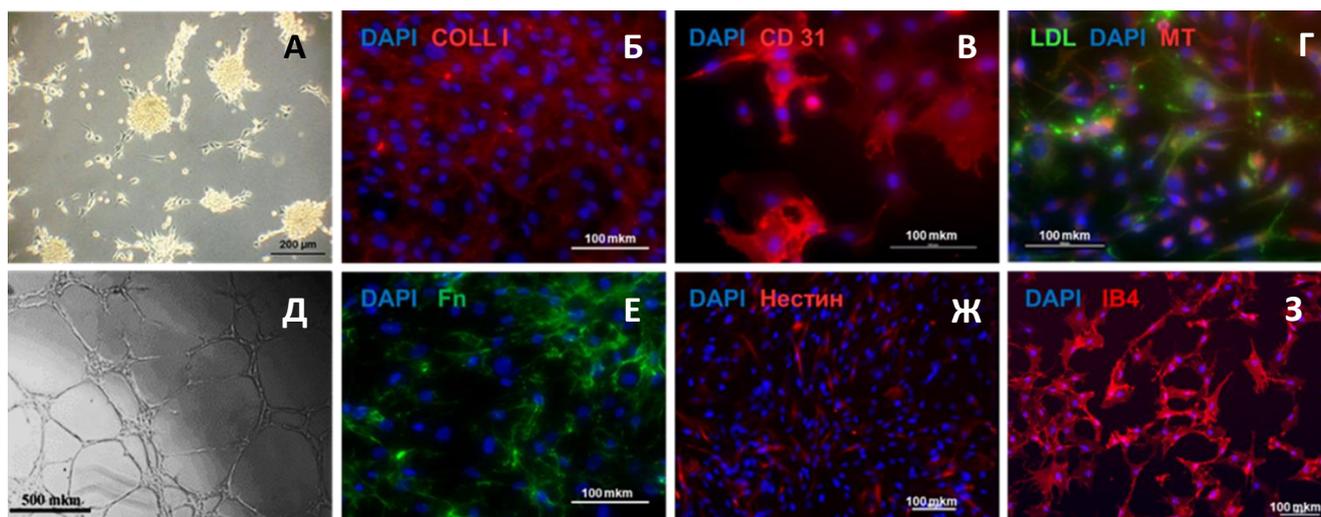


Рисунок 4. Культура клеток предсердия крысы. А – Общий вид, фазовый контраст. Окрашивание антителами к белкам (3 пассаж): Б – коллаген I; В – CD31; Е – фибронектин; Ж – нестин. Д – Формирование капилляроподобных структур при культивировании в течение 18 ч на Matrigel™, фазовый контраст. Г – Поглощение ацетилированного липопротеина низкой плотности (зеленый), MitoTracker® Red FM (красный). З – Связывание изолектина В4. Ядра окрашены DAPI (синий). Шкала – 200 мкм (А), 100 мкм (Б, В, Г, Е, Ж, З), 500 мкм (Д)

В культуре клеток из предсердия крысы была показана экспрессия гена рецептора эндотелиального фактора роста сосудов *VEGFR2* и ряда генов характерных для перицитов (клеток, регулирующих образование стенки сосудов) – *αSMA*, *NG2*, *Nestin*, *PDGFRb*. Таким образом, предложенный нами способ получения клеточных культур фрагментов предсердия на среде с низким содержанием сыворотки способствует поддержанию ангиогенного потенциала в условиях *in vitro*.

3. Моделирование инфаркта миокарда и трансплантация аутологичных клеток, полученных из фрагментов предсердия, на модели постинфарктного кардиосклероза у крыс

Для изучения терапевтического потенциала клеточной культуры, полученной из фрагментов предсердия, в лечении ишемических поражений миокарда, была использована модель экспериментального инфаркта у крыс линии WAG с последующей трансплантацией GFP-позитивных клеток на стадии развития хронического кардиосклероза, в качестве контроля использовалось введение фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) равного объема. Через 6 недель после трансплантации клеток проводилось ультразвуковое сканирование сердца, однако относительного улучшения сократительной функции левого желудочка у крыс опытной группы по сравнению с контролем обнаружено не было. При морфометрическом анализе криосрезов сердца было показано, что у крыс, получивших инъекции клеток, относительный периметр и относительная площадь зоны кардиосклероза были меньше, чем у получивших инъекции PBS (Рис. 5). Присутствия GFP-позитивных клеток через 6 недель после интрамиокардиального введения ни на одном препарате обнаружено не было.

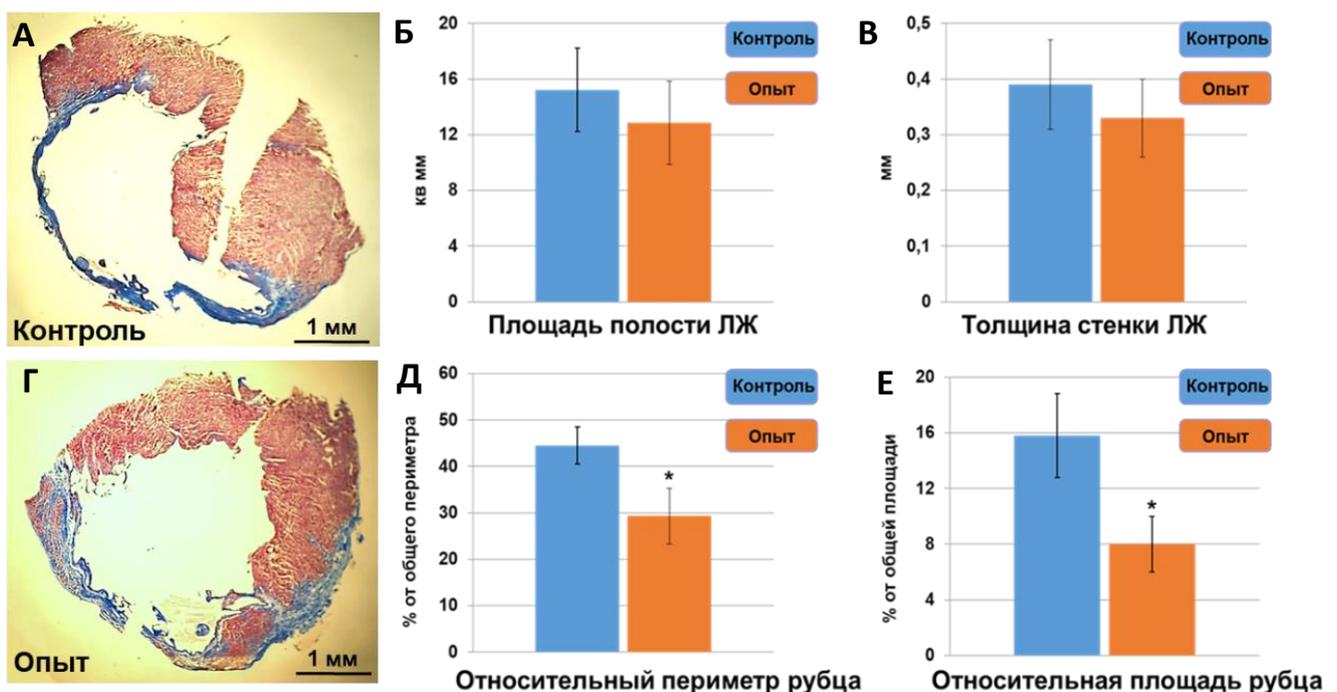


Рисунок 5. Криосрезы сердца крысы: А – через 6 недель после инъекции PBS (контроль); Г – через 6 недель после инъекции клеток (опыт). Пикро-Маллори. Шкала – 1 мм. Сравнение основных морфометрических параметров левого желудочка (ЛЖ) у опытной и контрольной группы: Б – площадь полости ЛЖ; В – толщина стенки ЛЖ; Д – относительный периметр рубца; Е – относительная площадь рубца. * – $p < 0,05$

Таким образом можно сделать вывод, что в данной работе относительное восстановление морфометрических параметров сердца крыс могло происходить вследствие поддержки жизнедеятельности клеток миокарда за счет паракринного взаимодействия между клетками донора и реципиента.

4. Оценка эффективности интрамиокардиальной трансплантации клеток на модели острого инфаркта миокарда у крыс

Для количественной оценки эффективности трансплантации аутологичных клеток, полученных из фрагментов предсердия крысы, в периинфарктную зону была проведена серия экспериментов по интрамиокардиальной трансплантации клеток, экспрессирующих люциферазу, при моделировании острого инфаркта миокарда у крыс линии WAG. Было показано, что аутологичные клетки предсердия, трансплантируемые интрамиокардиально с использованием фибринового геля в качестве матрикса, сохраняют жизнеспособность и могут быть обнаружены в течение как минимум 10 дней после трансплантации в периинфарктную зону (Рис. 6). Поскольку на 14-е сутки после интрамиокардиальной инъекции клеток ни в одной из групп люминесценция не определялась, можно сделать вывод, что клеточная культура, полученная из фрагментов предсердия, не обладает способностью к длительной персистенции в миокарде при данных условиях трансплантации. Таким образом подтверждается, что показанная эффективность трансплантированных кардиальных стромальных клеток, не обладающих кардиомиогенным потенциалом, на регенеративные процессы в ишемизированном миокарде может быть обусловлена паракринным эффектом.

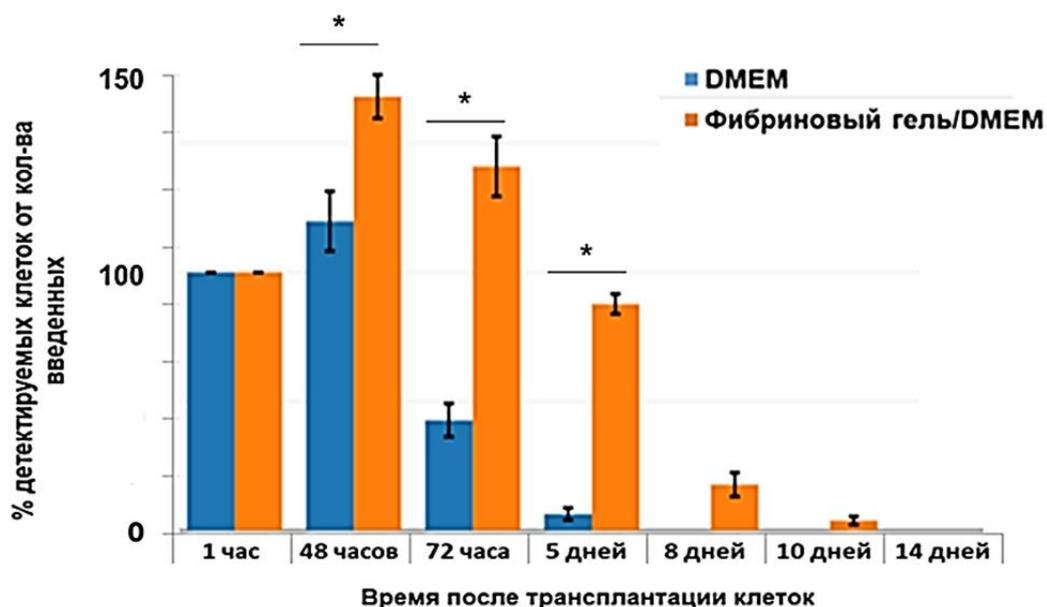


Рисунок 6. Динамика жизнеспособности кардиальных стромальных клеток крысы в миокарде, трансплантированных в среде DMEM и в смеси DMEM/фибриновый гель (1:1). Приведен процент трансплантированных клеток, обнаруживаемых в миокарде через разные промежутки времени после инъекции, от исходного количества клеток. * – $p < 0,05$

5. Получение и характеристика кардиомиоцитов из ИПСК человека

Протокол дифференцировки ИПСК человека в кардиальном направлении заключался в активации сигнального пути Wnt для формирования мезодермальных предшественников и терминальной дифференцировки в кардиомиоциты при последующем ингибировании пути Wnt. Начиная с 10-го дня дифференцировки проводили метаболическую селекцию кардиомиоцитов с использованием среды, содержащей лактат вместо глюкозы.

Иммунофлюоресцентный анализ полученной культуры выявил присутствие клеток, экспрессирующих сократительные белки кардиомиоцитов TnT и MLC2, а также транскрипционный фактор Nkx2.5 и субъединицу потенциал-зависимого калиевого канала HCN4 (маркер пейсмейкерных кардиомиоцитов) (Рис. 7 А, Б, В). Методом локальной фиксации потенциала в полученной культуре были выявлены клетки с электрофизиологическими фенотипами вентрикулярных, атриальных, а также пейсмейкерных кардиомиоцитов (Рис. 7 Г).

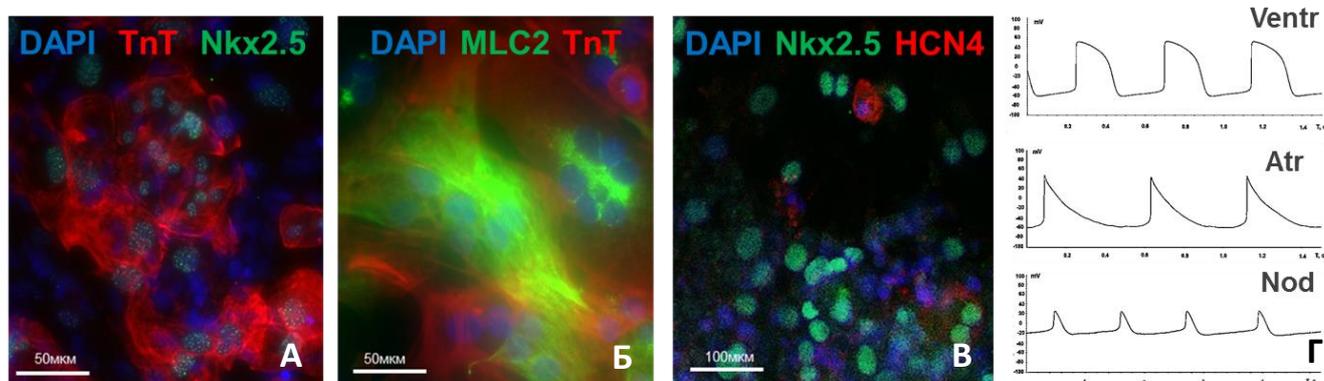


Рисунок 7. Характеристика кардиомиоцитов, полученных в ходе направленной дифференцировки ИПСК человека. Окрашивание антителами к белкам: А – TnT (красный), Nkx2.5 (зеленый); Б – TnT (красный), MLC2 (зеленый); В – HCN4 (красный), Nkx2.5 (зеленый). Ядра окрашены DAPI (синий). Шкала – 50 мкм (А, Б), 100 мкм (В). Г – Электрофизиологическая характеристика методом локальной фиксации потенциала: Ventr – вентрикулярные кардиомиоциты, Atr – атриальные кардиомиоциты, Nod – пейсмейкерные кардиомиоциты

6. Трансплантация кардиомиоцитов, полученных в ходе направленной дифференцировки ИПСК человека, в организм иммунодефицитных мышей

Для экспериментов по трансплантации использовали полученные в ходе направленной дифференцировки ИПСК человека кардиомиоциты (иКМ) после метаболической селекции на 20–24-й день после начала дифференцировки. В качестве биосовместимого носителя для клеток использовали Matrigel™ (смесь компонентов внеклеточного матрикса). Несмотря на то, что получилось показать присутствие иКМ человека в сердце иммунодефицитной мыши в течение по крайней мере 5 недель после интрамиокардиальной инъекции, данный способ введения оказался неудобен для оценки сохранения функциональной активности клеток, поскольку введенные иКМ оказываются окружены фиброзными клетками, что препятствует развитию полноценных межклеточных контактов.

В связи с этим на следующем этапе работы для трансплантации иКМ были выбраны подкожный и почечный субкапсулярный способы, которые широко используются в экспериментальных исследованиях в связи с относительной доступностью места введения и простотой проведения хирургической процедуры. Для формирования подкожного матригелевого трансплантата иКМ инъецировали под кожу 15 мышам линии SCID с использованием Matrigel™ в качестве носителя (Рис. 8 А, Б, В). Методом иммунофлюоресцентного окрашивания с помощью антител к aSA, SIRPa, Nkx2.5, HNA было показано наличие иКМ человека в трансплантатах после их извлечения из организма животного (Рис. 8 Г, Д).

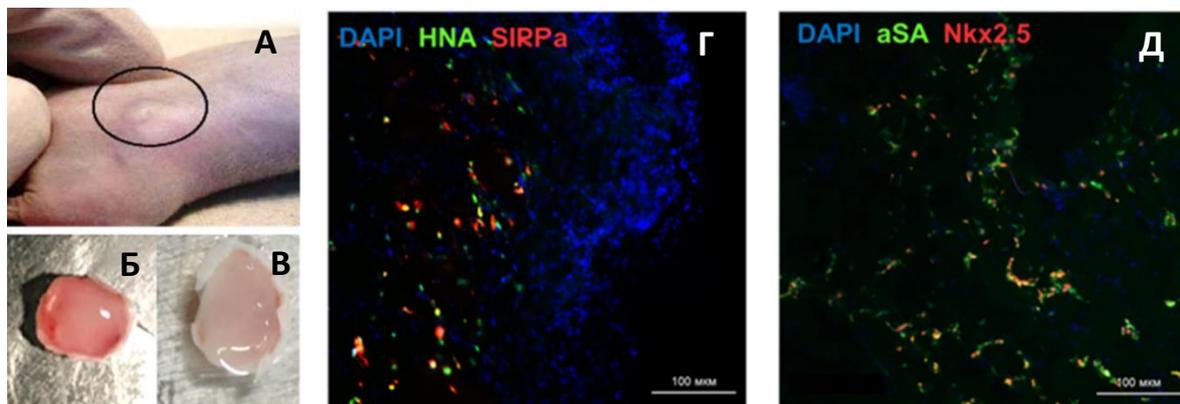


Рисунок 8. А – Мышь линии SCID с подкожным матригельным трансплантатом. Б, В – Извлеченные матригельные трансплантаты после 28 дней наблюдения. Иммунофлюоресцентное окрашивание криосрезов подкожных трансплантатов на 28-й день после культивирования *in vivo*: Г – SIRPa (красный), HNA (зеленый); Д – Nkx2.5 (красный), aSA (зеленый). Ядра окрашены DAPI (синий). Шкала – 100 мкм

При проведении оптического картирования потоков ионов кальция спонтанное регулярное изменение свечения Fluo8 было обнаружено в каждом образце культивировавшихся *in vivo* трансплантатов, однако количество таких областей было единичным. В контрольных образцах иКМ, культивировавшихся *in vitro* в слое матригеля, клетки, демонстрирующие изменение потоков кальция, выявлялись по всему образцу. Таким образом, несмотря на хорошую выживаемость, лишь малая часть кардиомиоцитов оказалась способной к спонтанным сокращениям после культивирования *in vivo*. Возможно, это связано с особенностями формирования матригельного трансплантата, плотность кардиомиоцитов в котором получается низкой, что приводит к невозможности образовывать межклеточные контакты и формировать функциональные связи.

С целью сохранения контактов между трансплантированными клетками могут применяться различные подходы, основанные на введении клеток в составе функциональных пластов, сформированных клетками и внеклеточным или экзогенным матриксом. Для изучения структурных и функциональных особенностей пластов иКМ после трансплантации в организм иммунодефицитных мышей был проведен эксперимент по введению сформированных клеточных пластов иКМ под капсулу почки на срок до 42 дней (Рис. 9 А, Б). После эксплантации из организма животного у всех образцов выявлялась осцилляция потоков ионов кальция, у части образцов наблюдались спонтанные согласованные сокращения. С помощью окрашивания препаратов криосрезов пластов иКМ, извлеченных из-под капсулы почки, антителами к человеческому ядерному антигену HNA, саркомерному актину (α SA), транскрипционному фактору кардиомиоцитов Nkx2.5 было показано, что трансплантированные в составе клеточного пласта кардиомиоциты сохранялись в организме мышей линии SCID в течение всего срока эксперимента, также на препаратах выявлялись CD31+ капилляры мышиноного происхождения (Рис. 9 В, Д, Г, Е). Клетки из извлеченных из-под капсулы почки мышцы трансплантатов имели вытянутую форму и упорядоченную саркомерную организацию, в отличие от клеток в контрольных образцах (клеточные пласты, культивировавшиеся *in vitro*).

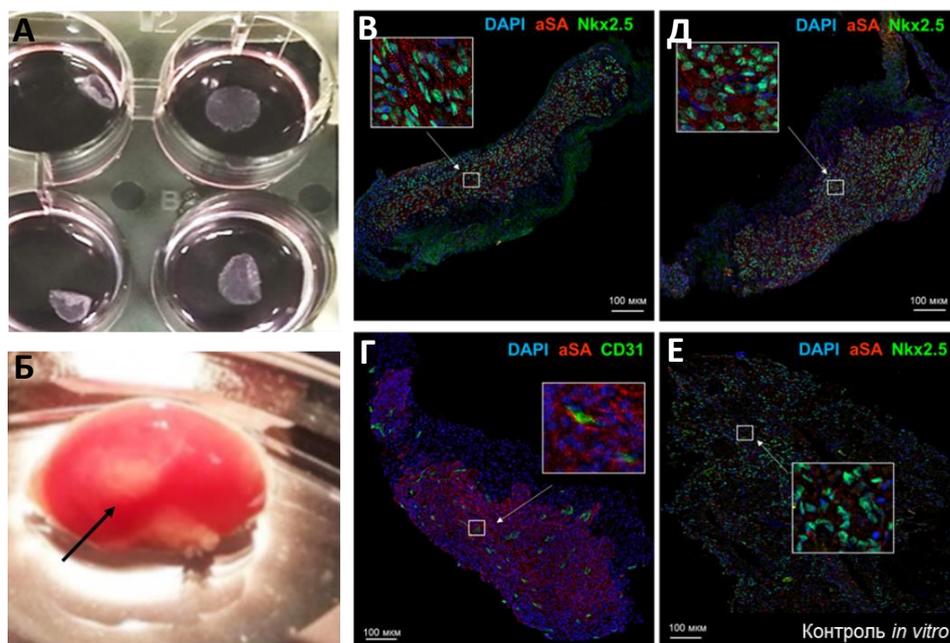


Рисунок 9. А – Сформированные клеточные пласты кардиомиоцитов. Б – Общий вид почки мыши с трансплантированным клеточным пластом через 42 дня. Иммунофлюоресцентное окрашивание криосрезов клеточных пластов кардиомиоцитов, препарированных из-под капсулы почки на 42-й день: В, Д – aSA (красный), Nkx2.5 (зеленый); Г – aSA (красный), CD31 (зеленый); Е – контроль (клеточные пласты кардиомиоцитов, культивировавшиеся *in vitro*): aSA (красный), Nkx2.5 (зеленый). Ядра окрашены DAPI (синий). Шкала – 100 мкм

Для оценки изменений ультраструктуры иКМ после культивирования *in vivo* в организме иммунодефицитной мыши несколько экспериментальных и контрольных образцов были исследованы методом электронной микроскопии (Рис. 10).

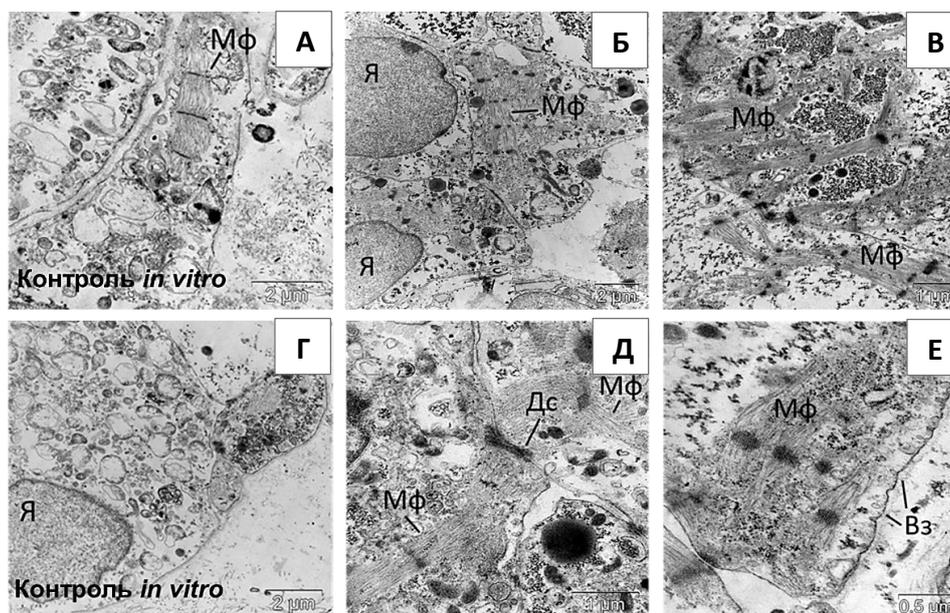


Рисунок 10. Просвечивающая электронная микроскопия. А, Г – Клеточные пласты кардиомиоцитов, культивировавшиеся 42 дня *in vitro*; Б, В, Д, Е – Клеточные пласты кардиомиоцитов, культивировавшиеся 42 дня *in vivo* под капсулой почки мыши. Я – ядро, Мф – миофибриллы, Дс – десмосомы, ВЗ – везикулы. Шкала – 2 мкм (А, Б, Г), 1 мкм (В, Д), 0,5 мкм (Е)

Кардиомиоциты из контрольных образцов в большинстве случаев представляли собой клетки без выраженных фенотипических признаков зрелого кардиомиоцита. Клетки имели, как правило, округлую форму и ядро с неконденсированным хроматином. В единичных случаях отмечалось формирование миофибрилл, имеющих саркомерное строение, но упаковка волокон в них оставалась неплотной. Кардиомиоциты располагались изолированно друг от друга и не образовывали функциональных контактов. В клеточных пластах, извлеченных из-под капсулы почки, ультраструктура кардиомиоцитов заметно отличалась от контроля. Клетки располагались более плотно, кроме того, поперечные участки выступов отдельных клеток соединялись друг с другом посредством десмосом. Клеточные ядра имели более плотную конденсацию хроматина. В клетках было обнаружено значительно большее количество поперечно исчерченных миофибрилл, имеющих саркомерное строение с упорядоченными миофиламенатами. На части препаратов была отмечена тенденция к параллельному выстраиванию миофибрилл. Данные признаки свидетельствуют о процессе созревания клеток и началу перехода от фетального фенотипа к фенотипу зрелого кардиомиоцита [Funakoshi et al., 2016].

Таким образом было показано, что при трансплантации кардиомиоцитов в составе функционального клеточного пласта, способность к координированному сокращению сохраняется после персистенции в организме мыши как минимум 6 недель. Также было показано, что в процессе нахождения в условиях живого организма кардиомиоциты, полученные из ИПСК человека, приобретают более организованную саркомерную структуру сократительного аппарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование посвящено разработке протоколов получения, предтрансплантационной подготовки и последующей трансплантации клеточного материала на примере кардиальных стромальных клеток, полученных из предсердий человека и крысы, и кардиальных производных ИПСК человека.

Клеточные культуры, полученные из фрагментов предсердия, являются гетерогенными по составу: в них присутствуют клетки, экспрессирующие маркеры мезенхимальных клеток, эндотелиальных клеток и перицитов. Полученные культуры способны к формированию капилляроподобных структур в функциональном тесте на ангиогенность, кроме этого в них показана экспрессия ангиогенных ростовых факторов и их рецепторов. В данной работе показано, что способ получения клеточных культур фрагментов предсердия в составе кардиосфер в бессывороточной среде способствует поддержанию ангиогенного потенциала в условиях *in vitro*. В экспериментах на крысах линии WAG было показано, что при трансплантации в ишемизированный миокард аутологичная клеточная культура, содержащая кардиальные стромальные клетки, может оказывать регенеративный эффект предположительно за счет паракринного механизма действия и не обладает способностью к длительной персистенции в миокарде.

Также в данной работе был создан методический подход для интрамиокардиальной трансплантации биоматериалов на примере кардиальных стромальных клеток крысы с применением аутологичного фибринового геля, который может быть в дальнейшем полезен для повышения эффективности методов

клеточной терапии. Фибриновый гель, как было показано в данной работе, является подходящим кандидатом на эту роль, а репортерная система, экспрессирующая люциферазу, может быть эффективна для мониторинга выживаемости клеток.

Для замещения утраченных сократительных элементов при лечении ишемических поражений сердца наиболее перспективными являются подходы получения кардиомиоцитов с помощью кардиальной дифференцировки плюрипотентных клеток. В данной работе при направленной кардиальной дифференцировке ИПСК человека были получены клетки, демонстрирующие спонтанную сократительную активность и экспрессирующие маркеры различных типов кардиомиоцитов (атриальных, вентрикулярных и пейсмейкерных). С целью изучения выживаемости и сохранения функциональной активности *in vivo* полученные кардиомиоциты трансплантировали в суспензии или в составе минимальных тканеинженерных конструкций (матригельные трансплантаты / клеточные пласты) в организм иммунодефицитных мышей линии SCID. Было показано, что в процессе нахождения в условиях живого организма индуцированные кардиомиоциты, трансплантированные в составе сформированного клеточного пласта, начинают формировать упорядоченный сократительный аппарат, а также сохраняют способность к спонтанному и синхронному сокращению.

Таким образом, данные полученные в работе, могут быть использованы для подбора условий культивирования и способа трансплантации кардиальных стромальных клеток и кардиальных производных ИПСК при использовании их в клеточной терапии, а также для более глубокого понимания процессов, происходящих с трансплантированными клетками в организме реципиента.

ВЫВОДЫ

1. Культуры стромальных клеток, полученные из фрагментов предсердия человека и крысы, гетерогенны по составу (содержат клетки, имеющие маркеры мезенхимальных клеток, эндотелиальных клеток и перицитов), способны формировать капилляроподобные структуры *in vitro* и экспрессировать ангиогенные ростовые факторы и рецепторы.
2. Аутологичная трансплантация кардиальных стромальных клеток в ишемизированный миокард области левого желудочка у крыс линии WAG снижает объем рубцовой ткани, но не способствует восстановлению сократительной функции сердца.
3. Кардиальные стромальные клетки после трансплантации в ишемизированный миокард крысы выживают непродолжительное время: в суспензии – не более 8 дней, в составе фибринового геля – не более 14 дней.
4. Кардиомиоциты, полученные из ИПСК человека, трансплантированные подкожно в организм иммунодефицитных мышей линии SCID, сохраняют жизнеспособность как минимум 28 дней.
5. Кардиомиоциты, полученные из ИПСК человека, трансплантированные в составе клеточных пластов под фиброзную капсулу почки иммунодефицитных мышей линии SCID, сохраняют жизнеспособность как минимум 42 дня и способны к спонтанному и синхронному сокращению после трансплантации из организма животного.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Павлова С.В., Перовский П.П., **Чепелева Е.В.**, Малахова А.А., Дементьева Е.В., Покушалов Е.А., Сухих Г.Т., Закиян С.М. Характеристика кардиальных культур клеток, полученных из экспланта сердечной мышцы человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2013. – №4. – С.132-141.
doi:10.1007/s10517-013-2295-x.
2. **Чепелева Е.В.**, Павлова С.В., Малахова А.А., Милевская Е.А., Русакова Я.Л., Подхватилина Н.А., Сергеевичев Д.С., Покушалов Е.А., Караськов А.М., Сухих Г.Т., Закиян С.М. Терапия хронического кардиосклероза у крыс линии WAG культурами кардиоваскулярных клеток, обогащенными стволовыми клетками сердца // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2015. – №3. – С.191-201.
doi:10.1007/s10517-015-3119-y.
3. Павлова С.В., Сергеевичев Д.С., **Чепелева Е.В.**, Козырева В.С., Малахова А.А., Захарова И.С., Григорьева Е.В., Покушалов Е.А., Закиян С.М. Сравнение мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и региональных стволовых клеток сердца и фибробластов кожи человека // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19. – № 4-2. – С. 12-19.
doi:10.21688/1681-3472-2015-4-2-12-19.
4. Милевская Е.А., Немудрый А.А., **Чепелева Е.В.**, Малахова А.А., Павлова С.В., Докучаева А.А., Сергеевичев Д.С., Закиян С.М. Оптимизация протокола интрамиокардиальной трансплантации с использованием люминесценции кардиальных мезенхимальных клеток, маркированных экспрессией люциферазы // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19. – № 4-2. – С. 69-76.
doi:10.21688/1681-3472-2015-4-2-69-76.
5. Павлова С.В., Розанова И.А., **Чепелева Е.В.**, Малахова А.А., Лыков А.П., Покушалов Е.А., Закиян С.М. Ангиогенный потенциал кардиальных стволовых и мезенхимальных стромальных клеток костного мозга крысы // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19. – № 4-2. – С. 77-84.
doi:10.21688/1681-3472-2015-4-2-77-84.
6. Павлова С.В., Леонова Е.А., **Чепелева Е.В.**, Докучаева А.А., Сергеевичев Д.С., Покушалов Е.А. Мониторинг трансплантации кардиальных клеток в зону ишемического поражения миокарда с использованием люциферазной репортерной системы // Гены и клетки. – 2017. – Т. 12. – №4. – С.69-75.
doi: 10.23868/201707032.
7. Павлова С.В., **Чепелева Е.В.**, Дементьева Е.В., Григорьева Е.В., Сорокоумов Е.Д., Слотвицкий М.М., Пономаренко А.В., Малахова А.А., Докучаева А.А., Сергеевичев Д.С., Покушалов Е.А., Закиян С.М. Исследование выживаемости и функциональной активности кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК человека, при трансплантации в мышечной линии SCID // Гены и клетки. – 2018. – Т. 13. – №. 4. – С. 51-60.
doi: 10.23868/201812047.
8. Павлова С.В., **Чепелева Е.В.**, Дементьева Е.В., Закиян С.М. Перспективы использования кардиомиоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, в заместительной терапии повреждений миокарда // Гены и клетки. – 2019. – Т. 14. – № 4-1. – С. 175-176.