

DOI:10.15360/1813-9779-2018-6-28-40

Experimental Studies

Трансплантация пластов мезенхимальных прогениторных клеток сердца для васкуляризации миокарда после инфаркта

К. В. Дергилев¹, З. И. Цоколаева^{1,2}, И. А. Рыжков², Е. В. Парфенова^{1,3}

¹ Институт экспериментальной кардиологии,
Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России,
Россия, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а.

² НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР,
Россия, 107031, Москва, ул. Петровка, д.25, стр. 2.

³ Факультет Фундаментальной медицины, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Россия, 119192, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 31-5

Transplantation of Cardiac Mesenchymal Progenitor Cell Sheets for Myocardial Vasculature after an Infarction (Experimental Study)

Konstantin V. Dergilev¹, Zoya I. Tsokolaeva^{1,2}, Ivan A. Ryzhkov², Elena V. Parfenova^{1,3}

¹ Institute of Experimental Cardiology,
National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Health of Russia,
15a 3rd Cherepkovskaya Str., 121552 Moscow, Russia

² V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation,
25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia

³ Laboratory of Postgenomic Technologies in Medicine, Department of Fundamental Medicine,
M. V. Lomonosov Moscow State University,
1 Universitetskaya Plaza, 119234 Moscow, Russia

Цель. Разработать способ получения тканеинженерных конструкций (ТИК), на основе резидентных мезенхимальных прогениторных клеток (МПК) сердца человека и оценить влияние трансплантации ТИК на регенеративные процессы в сердце на модели инфаркта миокарда крысы.

Материалы и методы. Резидентные МПК человека выделяли из ушка правого предсердия пациентов с ИБС. По аналогичному протоколу выделяли МПК крысы линии Wistar. Методом проточной цитофлуориметрии определяли иммунофенотип МПК. На основе пластов МПК сердца человека и крыс получали соответствующие ТИК. Инфаркт миокарда у крыс был индуцирован путем перевязки передней нисходящей коронарной артерии, после чего проводили трансплантацию ТИК. Через 30 дней после трансплантации выполняли эвтаназию. Проводили гистологическую оценку состояния клеток имплантата и васкуляризации, морфометрический анализ, трекинг дифференцировочной способности МПК, определение содержания ростовых факторов методом твердофазного ИФА. Статистическую оценку достоверности различий проводили с использованием программного пакета Statistica 8.0.

Результаты. Анализ полученных клеточных конструкций показал, что они состоят из нескольких слоев клеток, взаимодействующих между собой при помощи коннексин-43, и характеризуются хорошей жизнеспособностью клеток в составе ТИК. Количество сосудов в перинфарктной области под трансплантатом из МПК было значительно больше, чем в контрольной группе, с признаками дифференцировки трансплантированных МПК сердца в эндотелиальные клетки сосудов.

Увеличение васкуляризации сочеталось с увеличением площади участков жизнеспособного миокарда, уменьшением дилатации полости ЛЖ. Анализ продуктов секреции МПК сердца показал, что они продуцируют важнейшие факторы роста и цитокины, регулирующие ангиогенез и миграцию стволовых клеток.

Заключение. Стратегия использования эпикардальной трансплантации ТИК на основе пластов из МПК представляется рациональным подходом для эффективной доставки жизнеспособных стволовых/прогениторных клеток в поврежденный миокард. Применение ТИК способствует уменьшению или временному исключению действия факторов, способствующих прогрессирующей дисфункции сердца, путем локального паракринного воздействия и активации процессов реваскуляризации зоны повреждения.

Ключевые слова: мезенхимальные прогениторные клетки; инфаркт миокарда; васкуляризация; тканеинженерная конструкция из пласта клеток

Purpose. To develop a method of producing tissue-engineered constructs (TECs) on the basis of resident mesenchymal progenitor cells (MPC) of the human heart and to assess the effect of TECs transplantation on regenerative processes in the heart using a model of myocardial infarction in rats.

Адрес для корреспонденции:

Константин Дергилев
E-mail: doctorkote@gmail.com

Correspondence to:

Konstantin V. Dergilev
E-mail: doctorkote@gmail.com

Materials and methods. Human resident MPCs were isolated from the right atrial auricle of CAD patients. A similar protocol was used to obtain MPCs from Wistar rats. The MPC immunophenotype was determined by cytofluorometry. Corresponding TECs were obtained on the basis of MPC sheets of human and rats' hearts. Myocardial infarction in rats was induced by ligation of the anterior descending coronary artery followed by TEC transplantation. Euthanasia was performed 30 days after the transplantation. Histological examination of the implant and vascularization cells, morphometric analysis, tracking of the MPC differentiation ability, determination of the content of growth factors by solid-phase ELISA were carried out. Statistical evaluation of the significance of differences was performed using the Statistica 8.0 software package.

Results. The analysis of the obtained cell constructs showed that they consisted of several layers of cells interacting with each other by means of connexin 43 and were characterized by good cell viability as a part TECs. The number of vessels in the peri-infarction area under the transplant from the MPC was significantly higher than that in the reference group with signs of differentiation of cardiac MPCs transplanted into endothelial vascular cells.

The increased vascularization was combined with an increase in the area of viable myocardial sites and a decrease in LV cavity dilation. Analysis of the cardiac MPC secretion products showed that they produce the most important growth factors and cytokines that regulate angiogenesis and migration of stem cells.

Conclusion. The strategy of using epicardial TEC transplantation based on MPC sheets seems to be a rational approach for effective delivery of viable stem/progenitor cells to the damaged myocardium. The use of TEC helps to reduce or temporarily eliminate the effect of factors that contribute to progressive heart dysfunction by local paracrine exposure and activation of the revascularization processes in the affected zone.

Keywords: *mesenchymal progenitor cells; myocardial infarction; vascularization; tissue engineering constructs from a cell sheet*

DOI:10.15360/1813-9779-2018-6-28-40

Введение

За последние полвека методика пересадки сердца сохраняет свои позиции в качестве единственной возможности повышения качества жизни пациентов с тяжелой сердечной недостаточностью, возникшей вследствие ишемической болезни сердца или кардиомиопатий. Однако, выраженный дефицит донорских органов для проведения трансплантации существенно ограничивает ее широкое применение [1, 2]. Новым направлением исследований в этой области является регенеративная медицина, которая открывает альтернативные возможности для восстановления поврежденного сердца. Было показано, что интрамиокардиальные инъекции аутологичных мезенхимальных прогениторных клеток (МПК) могут активировать регенеративные процессы и способствовать восстановлению систолической функции сердца. Однако доставка клеток инъекцией в виде суспензии приводит к гибели значительного их числа (до 90%) как за счет механического повреждения при введении через иглу, так и за счет апоптоза (аноиксис), вызванного нарушением межклеточных контактов при переводе клеток из адгезионной культуры в суспензию. Это также создает сложности в плане дозирования, определения целевой области введения и распределения в миокарде. Альтернативой инъекциям клеточной суспензии может являться трансплантация клеток в виде уже сформированных различных тканеинженерных конструкций (ТИК). Особого внимания заслуживают наиболее простые ТИК, состоящие из пластов клеток (англ. *cell sheets*) – своеобразные «клеточные заплатки», представляющие собой одно- или многослойные структуры из одного или нескольких видов клеток

Introduction

Over the past fifty years, heart transplantation has maintained its position as the only option to improve the quality of life of patients with severe heart failure caused by coronary heart disease or cardiomyopathy. However, marked shortage of donor organs for transplantation significantly limits the wide use of this treatment method [1, 2]. The regenerative medicine is a new area of research in this area, which opens up alternative possibilities for the restoration of a damaged heart. It has been shown that intramyocardial injections of autologous mesenchymal progenitor cells (MPCs) can activate regenerative processes and contribute to the restoration of systolic heart function. However, the delivery of cells by injection in the form of a suspension leads to the death of a significant number of them (up to 90%) both due to mechanical damage when administered through a needle and due to apoptosis (anoikis) caused by impairment of intercellular contacts when transferring cells from the adhesive culture into the suspension. This also creates difficulties for dosing, determining the target area of administration and distribution in the myocardium. Transplantation of cells in the form of already generated various tissue-engineered constructs (TECs) may be an alternative to the injection of the cell suspension. Special attention should be paid to the most simple TECs consisting of cell sheets, a kind of «cell patches», which are single- or multi-layer structures of one or more cell types in combination with the accumulated extracellular matrix. The purpose of this study was to develop a method of producing such TECs on the basis of resident MPCs of the human heart, as well as to evaluate of the effect of transplantation of these TECs on regenerative processes in the heart using a model of myocardial infarction in rats.

в комплексе с наработанным ими же внеклеточным матриксом. Целью данного исследования была разработка способа получения подобных ТИК на основе резидентных МПК сердца человека, а также оценка влияния трансплантации таких ТИК на регенеративные процессы в сердце на модели инфаркта миокарда крысы.

Материал и методы

Выделение и культивирование резидентных МПК человека. Для выделения МПК сердца человека использовали образцы ушка правого предсердия, полученные от пациентов с ИБС, которым выполнили аорто–коронарное шунтирование в отделе сердечно–сосудистой хирургии Института клинической кардиологии им. А. Л. Мясникова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» МЗ РФ. Получение МПК сердца выполняли с использованием метода эксплантной культуры с последующей иммуномагнитной селекцией в соответствии с протоколом, описанным ранее [3, 4]. Культивирование МПК сердца проводили в среде Cardiac Cellutionstm Media («DV Biologics», США).

Выделение и культивирование резидентных МПК крысы. Для исследования регенеративных эффектов клеточных пластов на модели инфаркта миокарда получали МПК крысы с использованием метода эксплантной культуры и последующей иммуномагнитной селекцией в соответствии с протоколом, описанным ранее [5], аналогичным протоколу получения МПК человека. Культивирование клеток проводили в среде DMEM/F12, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой («ATCC», США), 100 ед/мл пенициллина/стрептомицина, 2 мМ L-глутамин, 2% B27, 1x инсулин-трансферин-селинат и факторами роста: 20 нг/мл bFGF, 20 нг/мл EGF, 10 нг/мл LIF.

Анализ иммунофенотипа ПКС методом проточной цитофлуориметрии. Для проведения анализа клетки центрифугировали (200 g, 5 мин), супернатант удаляли, осадок инкубировали в течение 30 мин при +4°C с первично мечеными антителами к маркерам CD 105 FITC («AbD Serotec», США), CD 73 FITC («Biolegend», США), CD90 PeCy5 («BD», США), c-kit PE («Myltenyi biotec», США), CD 45 FITC («Biolegend», США), CD 34 FITC («BD», США) или соответствующими контрольными антителами. После 30-минутной инкубации при +4°C клетки промывали 3 раза, ресуспендировали в фосфатно–солевом буфере (ФСБ) и анализировали с использованием проточного цитофлуориметра FACS Canto II (BD, США).

Получение ТИК на основе пластов МПК сердца человека. Для получения ТИК из МПК человека клетки 3-го пассажа высаживали на культуральные чашки Nunc™ Dishes, имеющих термочувствительное покрытие UpCell™ Surface («Thermo Scientific», США) (210 000/см² площади поверхности). Далее, МПК культивировали в течение 72 часов в среде Cardiac Cellutionstm Media («DV Biologics», США). При температуре 37°C поверхность культуральной чашки с UpCell™ Surface обладает гидрофобными свойствами, способствует адгезии и росту клеточной культуры. При понижении температуры ниже 32°C, поверхность становится гидрофильной, полимер связывает молекулы воды, «набухает», что приводит к откреплению клеточных пластов от поверхности. Перенос

Materials and Methods

Isolation and cultivation of human resident MPCs.

In order to isolate the human heart MPCs, samples of the right atrial auricle were obtained from CAD patients who underwent coronary artery bypass grafting in the department of cardiovascular surgery of the A. L. Myasnikov Institute of Clinical Cardiology in the National Medical Research Center of Cardiology under the Ministry of Health of the Russian Federation. Cardiac MPCs were obtained using the explant culture technique followed by immunomagnetic separation in accordance with the protocol described earlier [3, 4]. The cardiac MPCs was cultivated in the Cardiac Cellutionstm Media («DV Biologics», USA).

Isolation and cultivation of rat's resident MPCs.

In order to study the regenerative effects of cell sheets in a model of myocardial infarction, rat's MPCs were obtained in accordance with the protocol similar to that of obtaining the human MPCs. Rat's cardiac MPCs were obtained using the explant culture technique followed by immunomagnetic separation in accordance with the protocol described earlier [5]. Cells were cultivated in DMEM / F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS «ATCC», USA), 100 U/ml of penicillin / streptomycin, 2 mM of L-glutamine, 2% B27, 1x insulin-transferrin-selinate and the following growth factors: 20 ng/ml of bFGF, 20 ng/ml of EGF, and 10 ng/ml of LIF.

Analysis of the PCCs immunophenotype by flow cytometry.

In order to carry out the analysis, the cells were centrifuged (200 g, 5 min), the supernatant was removed, the precipitate was incubated for 30 min at +4°C with primary labeled antibodies against the following markers: CD 105 FITC («AbD Serotec», USA), CD73-FITC («Biolegend», USA), CD90-PeCy5 («BD», USA), c-kit-PE («Myltenyi Biotec», USA), CD45-FITC («Biolegend», USA), CD34-FITC («BD Pharmingen», USA) or appropriate reference antibodies. The cells were washed 3 times after a 30-minute incubation at +4°C; then they were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and analyzed using a flow cytometer FACS Canto II (BD, USA).

Obtaining TECs on the basis of human cardiac MPC sheets.

To obtain TECs from human MPC, cells harvested following the 3rd passage were inoculated into culture Nunc™ Dishes with a heat-sensitive coating UpCell™ Surface («Thermo Scientific», USA) (210 000/cm² surface area). Further, MPC was cultivated for 72 hours in the Cardiac Cellutionstm Media («DV Biologics», USA). At a temperature of 37°C, the surface of the culture dish with UpCell™ Surface possessed hydrophobic properties, promoted adhesion and growth of cell culture. When the temperature dropped below 32°C, the surface became hydrophilic, the polymer bound water molecules and begun to «swell», which resulted in detachment of cell sheets from the surface. The detached cell layer was transferred to the epicardial surface of the heart using a low adhesion membrane («Thermo Scientific», USA).

Obtaining TECs on the basis of rat's cardiac MPC sheets.

In order to obtain TECs from the rat's MPC sheets, a protocol developed for TEC production from human MPCs was applied. Nunc™ Dishes with a heat-sensitive coating UpCell™ Surface («Thermo Scientific», USA) were used for assembling and detaching of TECs.

Characteristics of MPC-based TECs. Frozen TEC cryosections were fixed with 3.7% paraformaldehyde (5 min) and then washed with PBS 3 times (5 min). Myocar-

открепленной клеточной накладки на эпикардиальную поверхность сердца осуществляли с помощью низко-адгезионной мембраны («Thermo Scientific», США).

Получение ТИК на основе пластов МПК крысы

Для получения ТИК из пластов МПК крысы использовали протокол, разработанный для ТИК из пластов МПК человека. Для сборки и открепления ТИК использовали культуральные чашки Nunc™ Dishes, имеющих термочувствительное покрытие UpCell™ Surface («Thermo Scientific», США).

Характеристика ТИК на основе МПК. Замороженные криосрезы ТИК фиксировали 3,7% параформальдегидом (5 мин) и затем промывали ФСБ 3 раза по (5 мин). Срезы миокарда блокировали раствором, содержащим 1% БСА, 10% сыворотки донора вторых антител в ФСБ (30 мин). После этого, криосрезы покрывали раствором поликлональных кроличьих антител к маркерам Ki-67 («Abcam», США), cleaved caspase-3 («Cell signaling», США), Connexin43 («ThermoFisher Scientific», USA), коллагену I («Bio-Rad», USA), коллагену 3 («Bio-Rad», USA) и фибронектину («Abcam», USA) в течение 1 часа, затем промывали и покрывали антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой AlexaFluor488 («Invitrogen», США, 1: 800, 1 ч при 37°C).

Оценку диаметра и толщины ТИК проводили с помощью микроскопа Zeiss Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения Axiovision 3.1 (Carl Zeiss, Германия)

Моделирование инфаркта миокарда и трансплантация ТИК. Эксперименты по трансплантации ТИК проводили на крысах линии Wistar, приобретенных в питомнике лабораторных животных «Пушино» (Пушино, Россия). Эвтаназию крыс проводили после ингаляционной наркотизации Изофлюраном с помощью метода дислокации шейного отдела позвоночника. Все необходимые манипуляции выполняли в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/ЕС по экспериментам на животных и были одобрены этическим комитетом института (Национальный центр медицинских исследований кардиологии, разрешение № 385.06.2009). Инфаркт миокарда был индуцирован путем перевязки передней нисходящей коронарной артерии крыс Wistar с помощью способа, описанного ранее [6]. Перед трансплантацией МПК метили флуоресцентным красителем CM DIL («Invitrogen», США) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя реагента. Экспериментальных животных разделили на 2 группы: контрольную ($n=25$) и группу с эпикардиальной трансплантацией МПК ($n=25$). Эвтаназию животных выполнили через 30 дней после трансплантации клеточного пласта.

Морфометрический анализ. Перед забором сердца в полость миокарда ЛЖ вводили 0,1 мл насыщенного раствора KCl, что приводило к остановке сокращений в диастолу. Предсердия и крупные сосуды иссекали, сердца промывали нормальным физиологическим раствором, помещали в криосреду ОСТ и замораживали в жидком азоте. Криосрезы сердец (7 мкм толщина каждого, резали с интервалом 300 мкм между срезами, поперек от верхушки до основания левого желудочка) хранили при -70°C . Все полученные криосрезы окрашивали с помощью метода Маллори с использованием следующих растворов: раствор А (1%-ный кислый фуксин), В (1% фосфомолибденовая кислота) и С (2% оранжевый G, 0,5% метиловый синий, 2% щавелевая кислота). Зафиксированные криосрезы инку-

dial sections were blocked with a solution containing 1% BSA, 10% serum of a donor of second antibodies in the PBS (30 min). After that, cryosections were coated with a solution of polyclonal rabbit antibodies against the following markers: Ki-67 («Abcam», USA), cleaved caspase-3 («Cell signaling», USA), Connexin43 («ThermoFisher Scientific», USA), collagen I («Bio-Rad», USA), collagen 3 («Bio-Rad», USA) and fibronectin («Abcam», USA) for 1 hour, then they were washed and coated with antibodies conjugated with the fluorescent AlexaFluor488 label («Invitrogen», USA, 1: 800, 1 h at 37°C).

The diameter and thickness of TECs were estimated using a Zeiss Axiovert 200 M microscope (Carl Zeiss, Germany) and Axiovision 3.1 software (Carl Zeiss, Germany)

Modeling of myocardial infarction and TEC transplantation.

Experiments on the TECs transplantation were performed on Wistar rats purchased in the nursery farm of laboratory animals «Pushchino» (Pushchino, Russia). Rats were euthanized after inhalation anesthesia with Isoflurane by means of cervical spine dislocation. All necessary manipulations were performed in accordance with the EU Directive 2010/63/EC on animal experiments and were approved by the Institutional Ethical Committee (National Center for Medical Research in Cardiology, permission No. 385.06.2009). Myocardial infarction was induced by ligation of the anterior descending coronary artery in Wistar rats using a technique described earlier [6]. MPCs were labeled with fluorescent CM-DIL stain («Invitrogen», USA) in accordance with manufacturer's guidelines prior to the transplantation. Experimental animals were divided into 2 groups: the reference group ($n=25$) and the group with epicardial MPC transplantation ($n=25$). The animals were euthanized 30 days after transplantation of cell sheets.

Morphometric analysis. 0.1 ml of KCl saturated solution was injected in the cavity of the LV myocardium before explantation of hearts, which led to diastolic arrest. Atria and large vessels were excised; the hearts were washed with normal saline solution, placed in the OST cryo-medium and frozen in liquid nitrogen. Heart cryosections (each 7 μm thick) were cut with an interval of 300 μm between sections, crosswise from the top to the bottom of the left ventricle) were stored at -70°C . All cryosections were stained by means of the Mallory technique using the following solutions: solution A (1% fuchsin), B (1% phosphomolybdic acid) and C (2% orange G, 0.5% methylene blue, 2% oxalic acid). The fixed cryosections were sequentially incubated in solution A (2 min), solution B (4 min) and solution C (15 min). The slides were washed with distilled water between staining, dehydrated and mounted using a xylene-based medium.

Quantitative analysis of the scar size and other morphometric parameters was performed using MetaMorph® Microscopy Automation & Image Analysis Software (USA). The size of the infarction was estimated based on calculations of the scar area relative to the area of the left ventricle expressed as a percentage.

The modified Hochman method was used for quantification of the LV dilatation degree: dilatation index = (LV cavity area/total LV area) / Ч (average thickness of LV unaffected area/average LV wall thickness at risk zones). LV wall thickness after the infarction was measured in 3 equidistant sections using MetaMorph® Microscopy Automation & Image Analysis Software (USA). The resulting value was averaged.

Histological assessment of implant and vascularization cells. Frozen myocardial cryosections were fixed with 3.7% paraformaldehyde (5 min) and then washed with PBS

бировавали 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 (США). Размер инфаркта оценивали на основании подсчета площади рубца по отношению к площади левого желудочка, выраженного 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). Толщину стенки ЛЖ после инфаркта измеряли в 3-х равноудаленных отделах с помощью программы MetaMorph® Microscopy Automation & Image Analysis Software (США). Полученное значение усредняли.

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% БСА, 10% сывороткой донора вторых антител в ФСБ (30 мин). После этого криосрезы покрывали раствором антител к маркерам Ki-67 («Abcam», США), cleaved caspase-3 («Cell signaling», США), Pecam (CD31) («Becton Dickinson», США), в течение 1 часа, затем промывали и покрывали антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой, AlexaFluor488 (кат # A11001 и A11008, Invitrogen, США, 1: 800, 1 ч при 37°C).

Анализ плотности сосудистой сети в перинфарктной области включал подсчет CD31-позитивных капилляров без просвета и CD31-позитивных структур с просветом. Подсчет проводили в программе Image J software («National Institute of health», США). Данные представлены в формате количество сосудов на мм² площади стенки левого желудочка.

Количество сохранившихся после трансплантации МПК, содержащих флуоресцентную метку Cell Tracker CM-DIL, оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 200 M («Carl Zeiss», Германия) и ручного подсчета в программе Image J software («National Institute of health», США).

Отслеживание «судьбы» трансплантированных МПК. Для трекинга (отслеживания) дифференцировочной способности МПК после трансплантации доставляли клетки крыс-самцов в миокард самок-реципиентов. Экспериментальных животных разделили на 2 группы: контрольную ($n=10$) и группу с эпикардальной трансплантацией МПК ($n=12$) (ГИК, сформированная из 100×10^4 клеток, накладывалась на эпикардальную поверхность сердца, над областью повреждения). Эвтаназию животных выполняли через 30 дней после трансплантации клеточного препарата. Детектировали Y-хромосомы в трансплантированных МПК с помощью набора Mouse & Rat IDetect™ Chromosome Paint Probes FISH («Cambio», США) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Дифференцировка трансплантированных МПК в эндотелиальном направлении оценивалась на основании наличия Y-хромосомы и одновременного

(5 min). Myocardial sections were blocked with a solution containing 1% BSA, 10% serum of a donor of second antibodies in the PBS (30 min). After that, cryosections were coated with a solution of antibodies against the following markers: Ki-67 («Abcam», USA), cleaved caspase-3 («Cell signaling», USA), and Pecam (CD31) («Becton Dickinson», USA) for 1 hour, then they were washed and coated with antibodies conjugated with the fluorescent AlexaFluor488 label (cat. # A11001 and A11008, «Invitrogen», USA, 1 800, 1 h at 37°C).

The analysis of vascular network density in the perinfarction area included the count of CD31-positive capillaries out of the lumen and CD31-positive structures within the lumen. The counting was carried out using the Image J software (National Institutes of Health, USA). The data are presented as the number of vessels per mm² of the LV wall area.

The number of MPCs remaining after transplantation to contain the Cell Tracker CM-DIL fluorescent label was assessed using the Zeiss Axiovert 200 M fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany) and manual counting in the Image J software (National Institute of health, USA).

Tracking the «fate» of transplanted MPCs. Cells of male rats were transferred to the myocardium of female recipients for tracking the differentiation ability of MPCs after the transplantation. Experimental animals were divided into 2 groups: the reference group ($n=10$) and the group with epicardial MPC transplantation ($n=12$) (TEC formed of 100×10^4 cells was placed onto the epicardial surface of the heart, over the affected area). The animals were euthanized 30 days after transplantation of cell sheets. Y-chromosomes were detected in the transplanted MPCs using the Mouse & Rat IDetect™ Chromosome Paint Probes FISH kit («Cambio», USA) in accordance with manufacturer's guidelines. Differentiation of transplanted MPCs in the endothelial direction was assessed on the basis of the presence of the Y-chromosome and simultaneous staining for the PECAM (CD31) endothelial cells marker («Becton Dickinson», USA).

The content of growth factors was determined by solid-phase enzyme immunoassay (ELISA). The quantitative analysis of the accumulation of HGF, VEGF, angiopoietin-1, PDGF BB, TGFβ and uPa in conditioned media obtained during the cultivation of human MPCs was carried out using the corresponding reagent kits: Human VEGF Quantikine Kit («R&D Systems», USA), Human HGF Immunoassay («R&D Systems», USA), Human Angiopoietin-1 Immunoassay («R&D Systems», USA), Human PDGF-BB Immunoassay («R&d systems», USA), Human TGF-β1 Immunoassay («R&D Systems», USA), Human u-Plasminogen Activator/Urokinase Immunoassay («R&d Systems», USA) in strict compliance with manufacturer's protocol.

Microscopy and image analysis. Myocardial cells and cryosections were analyzed using a Zeiss Axiovert 200 M microscope (Carl Zeiss, Germany) and Axiovision 3.1 software (Carl Zeiss, Germany).

The data are presented in the form of mean ± SD. Statistical analysis of the significance of differences was performed using the Mann-Whitney test and Statistica 8.0 software package (Statsoft, USA).

Results and Discussion

The choice of the optimal method of cell transplantation is the most important factor determining

окрашивания на маркер клеток эндотелия PECAM (CD31) («Becton Dickinson», USA).

Определение содержания ростовых факторов методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Количественный анализ накопления HGF, VEGF, ангиопоэтина-1, PDGF BB, TGF β и uPa в кондиционированных средах, полученных при культивировании МПК человека, проводили с использованием соответствующих наборов реагентов Human VEGF Quantikine Kit («R&D Systems», США), Human HGF Immunoassay («R&D Systems», США), Human Angiopoietin-1 Immunoassay («R&D Systems», США), Human PDGF-BB Immunoassay («R&D Systems», США), Human TGF- β 1 Immunoassay («R&D Systems», США), Human u-Plasminogen Activator/Urokinase Immunoassay («R&D Systems», США) в строгом соответствии с протоколом фирмы-производителя.

Микроскопия и анализ изображений. Анализ клеток и криосрезов миокарда проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения Axiovision 3.1 (Carl Zeiss, Германия).

Статистический анализ данных. Данные представлены в формате среднее \pm SD. Статистическую оценку достоверности различий проводили с использованием теста Манна–Уитни и программного пакета Statistica 8.0 (Statsoft, США).

Результаты и обсуждение

Наиболее важным фактором, определяющим эффективность клеточной терапии заболеваний сердца, является выбор оптимального способа их трансплантации, что обеспечивает их выживаемость (способность к поддержанию соответствующего фенотипа и выполнению их биологических функций), и регенеративные свойства. Для обеспечения этих характеристик мы разработали ТИК на основе пластов из МПК сердца, выделенных из образцов ушка правого предсердия сердца, полученных во время АКШ. Полученные МПК человека характеризовались присутствием на клеточной поверхности маркеров CD105, CD90, CD73, отсутствием маркеров клеток гематопоэтического ряда и способностью к мультипотентной дифференцировке, что соответствует свойствам резидентных прогениторных клеток сердца мезенхимального ряда [7–9]. Мы показали, что культивирование МПК на чашках с термочувствительным покрытием UpCell™ Surface™, способствует сборке ТИК и ее последующему откреплению без нарушения ее структурной целостности.

Анализ полученных клеточных конструкций с помощью гистологического и иммунофлуоресцентного окрашивания срезов показали, что они состоят из нескольких слоев клеток, взаимодействующих между собой при помощи коннексин-43 содержащих щелевых контактов. Часть клеток в составе ТИК экспрессировала маркер пролиферации Ki-67 ($84,7 \pm 32$ на 1000 клеток), что в совокупности с отсутствием маркеров апоптоза (активированная каспаза 3), указывает на хорошее поддержание жизнеспособности.

the effectiveness of cell therapy of heart disease, which ensures cell survival (ability to maintain the corresponding phenotype and perform their biological functions) and regenerative properties. To ensure these parameters to be included, we developed TEC based on sheets from the cardiac MPC isolated from the samples of the right atrial auricle obtained during CABG. The obtained human MPCs were characterized by the presence of CD105, CD90, CD73 markers on the cell surface, the absence of hematopoietic cell markers and the ability to multipotent differentiation, which corresponds to the characteristics of resident cardiac mesenchymal progenitor cells [7–9]. We have demonstrated that the cultivation of MPCs in dishes with heat-sensitive coating UpCell™ Surface™ contributes to TEC production and its subsequent detachment without impairing its structural integrity.

Analysis of the obtained cell structures by histological and immunofluorescent staining of sections showed that they consisted of several layers of cells interacting with each other by means of connexin-43-containing gap junctions). Some of the cells in the TEC expressed Ki-67 proliferation marker (84.7 ± 32 per 1000 cells), which together with the absence of apoptosis markers (activated caspase 3), indicated good maintenance of viability of cells in the TEC (Fig. 1). Extracellular matrix proteins (fibronectin, collagen 1 and collagen 3) produced by cells (fig. 1 c, d, e) were in the TEC composition. The diameter of the obtained TEC was 0.99 ± 0.24 cm². The average TEC thickness was 101.9 ± 17 μ m.

Since the obtained TEC was made of human cells, thus making it very difficult to test it *in vivo*, the strategy of «homologous tissue engineering design» was used. It is based on the use of MPCs obtained in the same way as human cells to produce TEC by cultivation in culture dishes Nunc™ Dishes with heat-sensitive coating. The TECs obtained from rat and human cells had similar size, thickness, and proliferation/apoptosis levels. In addition, they included components of ECM (fibronectin, collagen 1, and collagen 3), which were contained in the constructs of human cells. To assess the state of TEC cells after transplantation, they were labeled with the vital membrane Cell Tracker CM-DIL stain («Invitrogen») (fig. 2 a, b, c). It was found that the number of proliferating cells (CM-DIL+ Ki67+ cells) was 521.3 ± 112 per mm² of the TEC area 30 days after TEC transplantation onto the infarction zone; at that, only a few CM-DIL+ cells containing the apoptosis marker (activated caspase 3) were found in the composition of the graft, thus indicating a low level of apoptosis in the cell graft with preserved ability to proliferation.

The number of vessels in the peri-infarction area under the transplant from MPCs was significantly higher than that in the reference group, thus indicating stimulation of vascularization under the cell graft (fig. 3 a, b). At that, a small number of vascular cells co-expressed two markers (CM Dil and CD31), which indi-

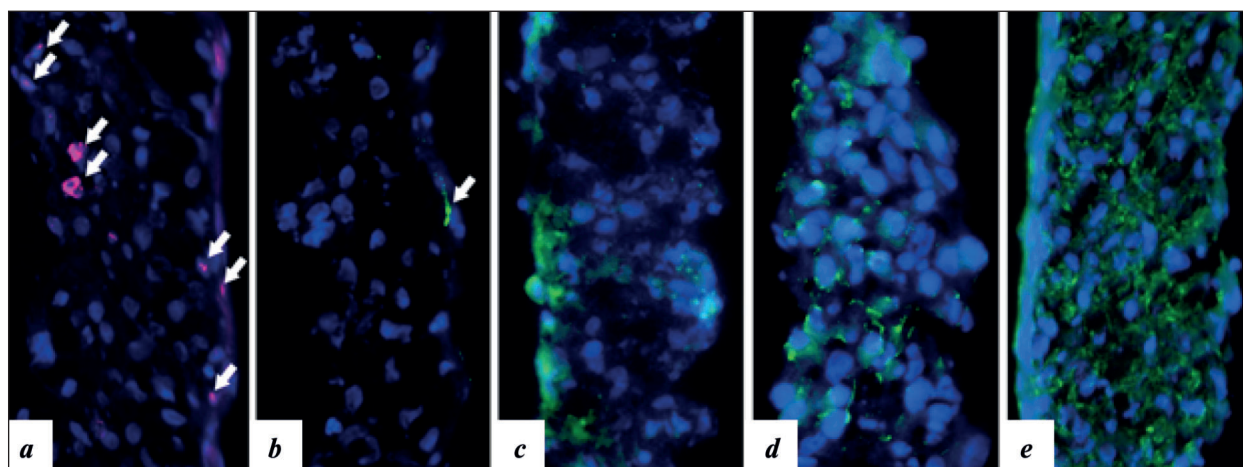


Рис. 1. Характеристика ТИК на основе МПК сердца человека.
Fig. 1. Parameters of TECs based on MPCs from the human heart.

Note. Representative images of TEC staining with antibodies against proliferation markers (Ki67 (*a*; red)), apoptosis (activated caspase 3 (*b*; green)), extracellular matrix proteins: collagen 1 (*c*; green), collagen 3 (*d*; green) and fibronectin (*e*; green). Arrows point to cells with positive staining for the respective markers. Cell nuclei are stained with DAPI. Magnification: *a, b, c, e* $\times 63$; *d* $\times 100$.

Примечание. Репрезентативные изображения окрашивания ТИК антителами к маркерам пролиферации (Ki67 (*a*; красный)), апоптоза (активированная каспаза 3 (*b*; зеленый)), белкам внеклеточного матрикса: коллаген 1 (*c*; зеленый), коллаген 3 (*d*; зеленый) и фибронектин (*e*; зеленый). Стрелки указывают на клетки, имеющие позитивное окрашивание на соответствующие маркеры. Ядра клеток окрашены DAPI. Увеличение: *a, b, c, e* $\times 63$; *d* $\times 100$.

неспособности клеток в составе ТИК (рис. 1). В состав ТИК входили белки внеклеточного матрикса (фибронектин, коллаген 1 и коллаген 3), наработанные клетками (рис. 1 *c, d, e*). Диаметр сформированной ТИК составлял $0,99 \pm 0,24$ см². Средняя толщина ТИК составляла $101,9 \pm 17$ мкм.

Учитывая, что разработанная ТИК изготовлена из клеток человека, что вызывает значительные трудности для ее тестирования *in vivo*, была использована стратегия «гомологичной тканеинженерной конструкции». В ее основе лежит использование МПК, полученных тем же способом, что и клетки человека, для сборки ТИК путем культивирования на культуральных чашках Nunc™ Dishes с термочувствительным покрытием. Полученные ТИК из клеток крысы и человека имели сходный размер, толщину и показатели уровня пролиферации/апоптоза. Кроме того, в их состав входили компоненты ВКМ (фибронектин, коллаген 1, коллаген 3), которые содержались в конструкциях из клеток человека. Для оценки состояния клеток ТИК после трансплантации они были помечены витальным мембранным красителем Cell Tracker CM-DIL («Invitrogen») (рис. 2 *a, b, c*). Было обнаружено, что через 30 дней после трансплантации ТИК на область инфаркта количество пролиферирующих клеток (CM-DIL+

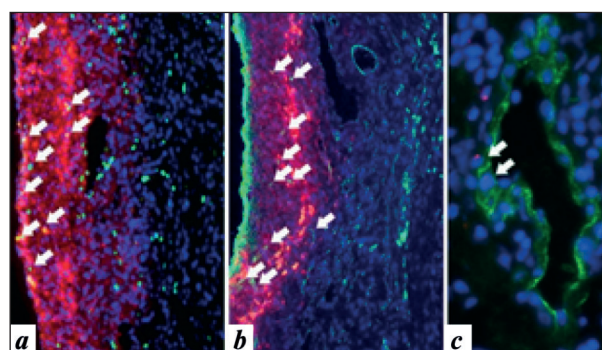


Рис. 2. Пролiferация МПК и формирование сосудистых структур в составе ТИК, трансплантированной на эпикардальную поверхность сердца через 30 дней после инфаркта миокарда.

Fig. 2. Proliferation of MPCs and formation of vascular structures in the composition of TECs transplanted onto the epicardial surface of the heart 30 days after myocardial infarction.

Note. *a* – Immunofluorescent staining of heart tissue with antibodies against Ki67 proliferation marker. MPCs marked with fluorescent Cell Tracker CM-DIL stain (red) transplanted as TECs. Arrows point to proliferating cells (Ki67+CM Dil+); *b* – Immunofluorescent staining of myocardial tissue with antibodies against the CD31 vascular marker. MPCs marked with fluorescent Cell Tracker CM-DIL stain (red) transplanted as TECs. Arrows point to CD31+CM Dil+ MPCs integrated in the composition of newly formed vessels; *c* – Immunofluorescent staining of heart tissue with antibodies against the CD31 vascular marker and Y-chromosome. Arrows point to CD31+Y chromosome+ cells in the vessels vascularizing the graft, which confirms the endothelial differentiation of transplanted MPCs. Magnification: *a, b* $\times 20$; *c* $\times 40$.

Примечание. *a* – иммунофлуоресцентное окрашивание ткани сердца антителами к маркеру пролиферации Ki67. Трансплантированные в виде ТИК МПК помечены флуоресцентным красителем Cell Tracker CM-DIL (красный). Стрелки указывают на пролиферирующие клетки (Ki67+CM Dil+); *b* – иммунофлуоресцентное окрашивание ткани миокарда антителами к маркеру сосудов CD31. Трансплантированные в виде ТИК МПК помечены флуоресцентным красителем Cell Tracker CM-DIL (красный). Стрелки указывают на CD31+CM Dil+ МПК, интегрированные в состав новообразованных сосудов; *c* – иммунофлуоресцентное окрашивание ткани сердца антителами к маркеру сосудов CD31 и Y-хромосоме. Стрелки указывают на CD31+Y-хромосома+ клетки в сосудах, васкуляризирующих трансплантат, что подтверждает эндотелиальную дифференцировку трансплантированных МПК. Увеличение: *a, b* $\times 20$; *c* $\times 40$.

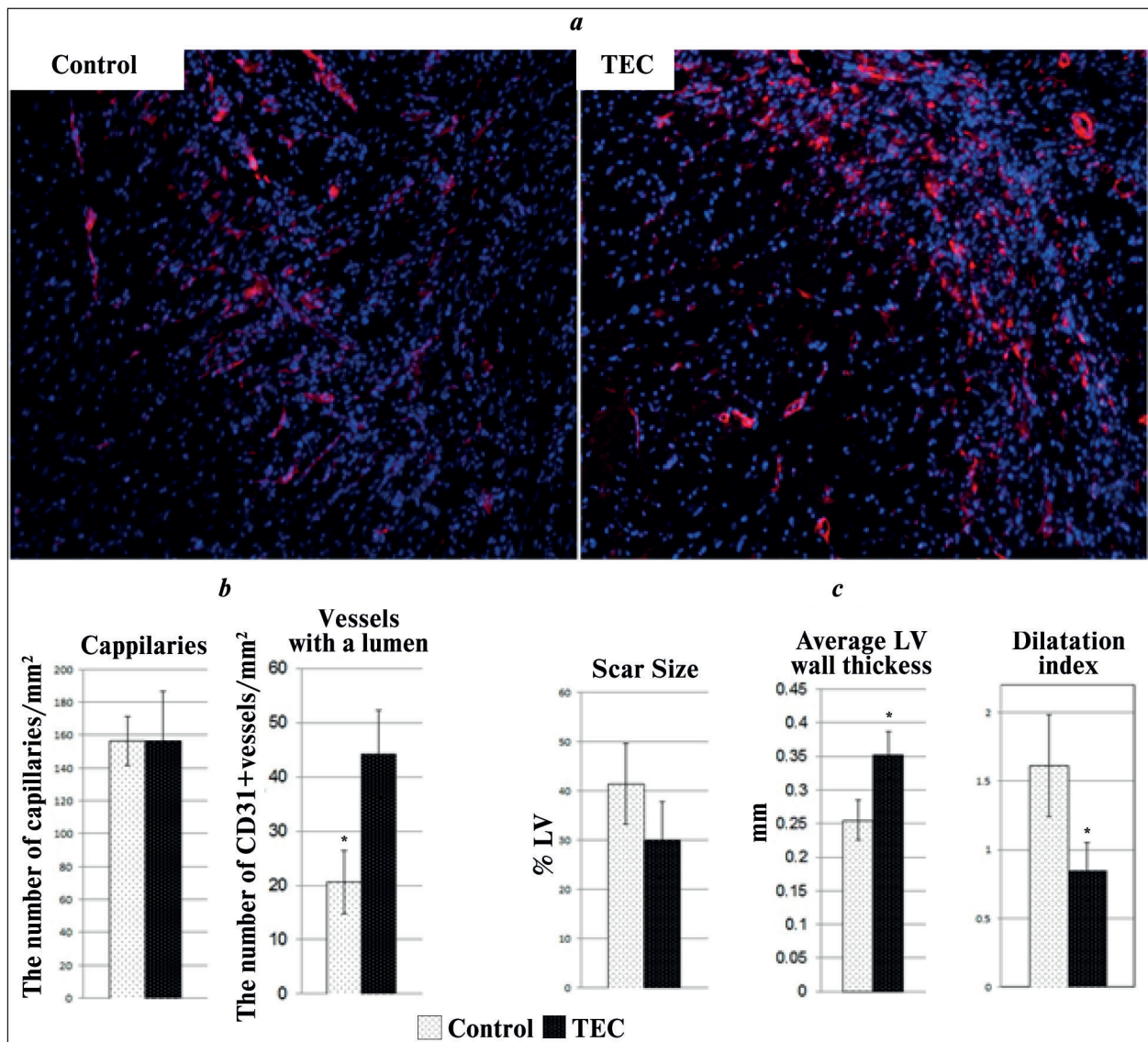


Рис. 3. Пролiferация МПК и формирование сосудистых структур в составе ТИК, трансплантированной на эпикардальную поверхность сердца через 30 дней после инфаркта миокарда.

Fig. 3. Proliferation of MPCs and formation of vascular structures in TEC' composition transplanted onto the epicardial surface of the heart 30 days after myocardial infarction.

Note. *a* – Immunofluorescent staining of heart tissue with antibodies against Ki67 proliferation marker. MPCs marked with fluorescent Cell Tracker CM-DIL stain (red) transplanted as TECs. Magnification: *a* ×10. *b*, *c* – study parameters. * – statistical significance in relation to the control, $P < 0.05$.

Примечание. ТЕС – ТИК; the number of capillaries – число капилляров; vessels with a lumen – сосуды с просветом; scar size – размер рубца; LV – ЛЖ; average LV wall thickness – средняя толщина стенки; dilatation index – индекс дилатации. *a* – иммунофлуоресцентное окрашивание ткани сердца антителами к маркеру пролиферации Ki67. Трансплантированные в виде ТИК МПК помечены флуоресцентным красителем Cell Tracker CM-DIL (красный). Увеличение: *a* ×10. *b*, *c* – исследуемые параметры. * – различия достоверны по сравнению с контролем, $p < 0.05$.

Ki67+клеток) составляло $521,3 \pm 112$ на мм² площади ТИК, при этом в составе трансплантата выявлялись лишь единичные CM-DIL+ клетки, содержащие маркер апоптоза – активированную каспазу 3, что указывает на низкий уровень апоптоза в клеточном графте при сохраненной способности к пролиферации.

Количество сосудов в периинфарктной области под трансплантатом из МПК было значительно большим, чем в контрольной группе, что указывало на стимуляцию васкуляризации под клеточным графтом (рис. 3 *a*, *b*). При этом небольшая часть

directly indicates the differentiation of the transplanted cardiac MPCs of the heart in endothelial cells of blood vessels. The possibility of endothelial differentiation of cardiac MPCs was also confirmed by transplantation TECs made of male cardiac MPCs to females with subsequent test for the Y-chromosome. It was found that $0.4 \pm 0.3\%$ of the total number of endothelial cells in the vessels carry the Y-chromosome in their nuclei, which indicates the differentiation of a number of transplanted MPCs in the endothelial direction.

The increase in vascularization of the post-infarction scar zone and the peri-infarction zone was

клеток сосудов коэкспрессировала два маркера CM Di1 и CD31, что косвенно указывает на дифференцировку трансплантированных МПК сердца в эндотелиальные клетки сосудов. Возможность эндотелиальной дифференцировки МПК сердца была подтверждена и с помощью трансплантации ТИК из МПК самцов в сердце самок с последующим анализом клеток на Y-хромосому. Оказалось, что $0,4 \pm 0,3\%$ от общего количества эндотелиальных клеток в сосудах несут Y-хромосому в ядре, что указывает на дифференцировку части трансплантированных МПК в эндотелиальном направлении.

Увеличение васкуляризации зоны постинфарктного рубца и перинфарктной зоны сочеталось с увеличением толщины стенки левого желудочка в области постинфарктного рубца и увеличением площади участков жизнеспособного миокарда в этой области, что, вероятно, является следствием улучшения тканевой перфузии. Хотя обнаружили тенденцию к уменьшению размера постинфарктного рубца, достоверных отличий этого показателя не выявили. Тем не менее, мы обнаружили статистически достоверное уменьшение дилатации полости ЛЖ, что является хорошим прогностическим маркером и может служить важным индикатором снижения риска прогрессирования сердечной недостаточности. Поскольку только ограниченное число трансплантированных МПК демонстрировало признаки дифференцировки в эндотелиальном направлении и большинство сосудов формировалось из клеток животного-реципиента, можно предположить, что благоприятное влияние трансплантата на постинфарктное ремоделирование сердца, скорее всего обусловлено паракринным действием трансплантированных клеток. Анализ продуктов секреции МПК сердца показал, что они продуцируют практически все важнейшие факторы роста и цитокины, регулирующие ангиогенез и миграцию стволовых клеток (VEGF, HGF, SDF1 и uPA), что может способствовать их привлечению из кровотока в зону повреждения (рис. 4). Следует также отметить, что урокиназа (uPA), секретируемая клетками ТИК,

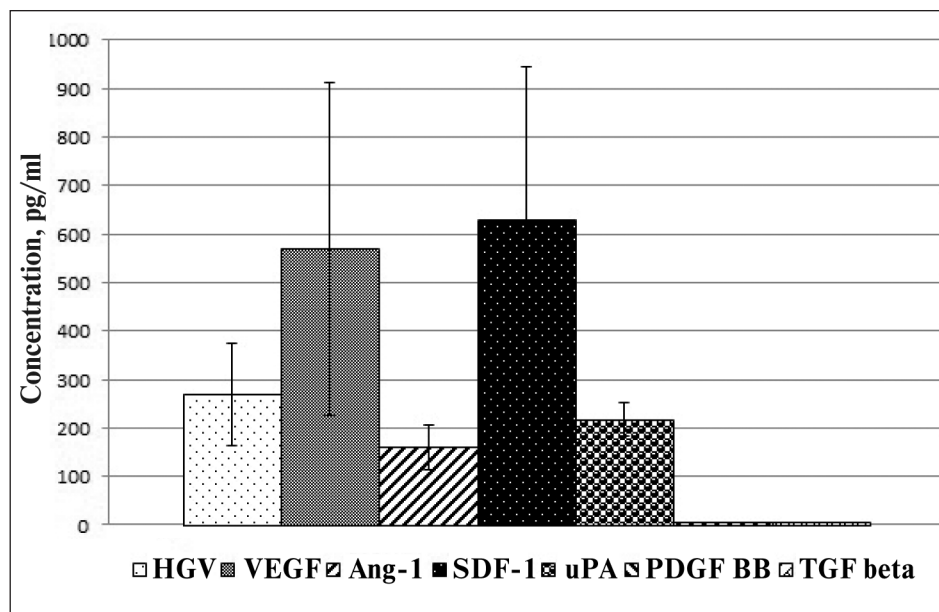


Рис. 4. Количественная оценка содержания ростовых факторов в среде культивирования МПК человек, определенная методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Fig. 4. Concentration of growth factors in the human MPC culture medium by solid-phase enzyme immunoassay.

Note. HGF – hepatocyte growth factor; VEGF – vascular endothelial growth factor; Ang-1 – angiopoietin 1; SDF-1 – stroma cell-derived factor 1; uPA – urokinase-type plasminogen activator.

Примечание. HGF – фактор роста гепатоцитов; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; Ang-1 – ангиопоэтин 1; SDF1 – фактор клеток стромы 1; uPA – активатор плазминогена урокиназного типа.

combined with an increase in the left ventricular wall thickness in the post-infarction scar zone and an increase in the area of viable myocardial sites in this zone, which is probably a result of improved tissue perfusion. Although there was a tendency toward reduction in the size of the post-infarction scar, there were no significant differences in this parameter. However, we found a statistically significant decrease in LV cavity dilation, which is a good prognostic marker and can serve as an important indicator of reducing the risk of heart failure progression. Since only a limited number of transplanted MPCs showed signs of differentiation in the endothelial direction and most vessels were formed from the cells of the recipient animal, it can be assumed that the favorable effect of the transplant on post-infarction cardiac remodeling is likely due to the paracrine effect of the transplanted cells. Analysis of cardiac MPC secretion products showed that they produce almost major growth factors and cytokines that regulate angiogenesis and migration of stem cells (VEGF, HGF, SDF1 and uPA), which can help to attract them from the circulation to the affected zone (fig. 4). It should also be noted that urokinase (uPA) secreted by TEC cells is a factor contributing to extracellular proteolysis facilitating cell migration, release/activation of growth factors and modulation of the status of extracellular matrix proteins, i.e. the main stages of regenerative processes. In addition, MPCs produced major proangiogenic growth factors (VEGF, HGF, angiopoietin-1), which are important both at the initiation stage and at the stage of maturation of

является фактором, обеспечивающим внеклеточный протеолиз, способствующий миграции клеток, высвобождению/активации факторов роста и модуляции состояния белков внеклеточного матрикса, т. е. основных этапов регенеративных процессов. В дополнении к этому, МПК продуцировали основные проангиогенные факторы роста (VEGF, HGF, ангиопоэтин-1), которые важны как на стадии инициации, так и на стадии созревания новообразованных сосудов. Устойчивая секреция этих факторов клетками ТИК, может способствовать формированию градиента, обеспечивающего направленное формирование новых компонентов сосудистой сети поврежденного сердца.

Острое нарушение коронарного кровообращения вызывает гибель значительного количества кардиомиоцитов сердечной стенки, которая в совокупности с гемодинамическими и нейрогуморальными факторами вызывает развитие тяжелой сердечной недостаточности. При этом состоянии взаимодополняющее воздействие патологических факторов ведет к ремоделированию полости сердца и развитию тяжелых функциональных нарушений. Использование клеточной терапии в виде внутривенного или внутримиекардиального введения стволовых/прогениторных клеток для лечения инфаркта миокарда и постинфарктной сердечной недостаточности показали весьма умеренную эффективность, что в значительной степени обусловлено гибелью большей части клеток после трансплантации [10–12]. В данной работе мы оценивали на модели инфаркта у крысы эффективность альтернативного способа трансплантации клеток в виде сформированных *in vitro* тканеинженерных конструкций, состоящих из клеточных пластов, образованных мезенхимальными прогениторными клетками сердца. ТИК были успешно получены как из МПК ушка правого предсердия человека, которое иссекается в ходе операции аорто-коронарного шунтирования, так и из МПК, выделенных по аналогичному протоколу из сердца крысы. В сформированных ТИК МПК образуют несколько слоев, формируют специфическое микроокружение за счет межклеточного взаимодействия (коннексин-содержащие контакты) и формируют контакты с компонентами межклеточного матрикса (коллаген 1, коллаген 3 и фибронектином), которые обеспечивают оптимальные механические и биологические характеристики, способствующие выживаемости клеток в составе конструкции после трансплантации. Фибронектин способен активировать пролиферацию МПК, индуцировать дифференцировку в кардиомиоцитарном и эндотелиальном направлениях *in vivo* путем активации сигнализации через $\alpha 5\beta 1$ интегрина рецепторы [13]. Кроме того, именно состояние белков матрикса определяет регенеративные свойства прогениторных клеток разных типов [14]. Мы показали, что клеточный графт

newly formed vessels. Stable secretion of these factors by TEC cells may contribute to formation of a gradient that provides directed formation of new components of the vascular network of the affected heart.

Acute coronary circulation impairment causes the death of a significant number of cardiomyocytes of the heart wall, which causes severe heart failure together with hemodynamic and neurohumoral factors. At that, the complementary effect of these pathological factors leads to remodeling of the heart cavity and development of severe functional disorders. The use of cell therapy in the form of intracoronary or intramyocardial administration of stem/progenitor cells for the treatment of myocardial infarction and post-infarction heart failure showed very moderate effectiveness, which is largely due to the death of most cells after transplantation [10–12]. In this paper, we evaluated the efficiency of an alternative method of cell transplantation in the form of tissue-engineering constructs formed *in vitro*, consisting of cell sheets formed by cardiac mesenchymal progenitor cells, in a rat's model of myocardial infarction. TECs were successfully obtained both from MPCs of the human right atrial auricle, which was excised during coronary artery bypass surgery and MPCs obtained from rat's heart according to the same protocol. MPCs form several layers in TECs; they create a specific microenvironment due to intercellular interaction (connexin-containing gaps) and form contacts with the components of the intercellular matrix (collagen 1, collagen 3 and fibronectin), which provide optimal mechanical and biological characteristics that contribute to cell survival in the constructs after transplantation. Fibronectin is able to activate the proliferation of MPCs, induce *in vivo* differentiation in cardiomyocytic and endothelial directions by activating signaling via $\alpha 5\beta 1$ integrin receptors [13]. In addition, it is the state of matrix proteins that determines regenerative properties of different types of progenitor cells [14]. We demonstrated that the cell graft persisted for 30 days of observation. Transplanted TECs are integrated into the damaged heart tissue of the recipient animal; TEC cells are not subjected to apoptosis, retain proliferative potential, partially differentiate in the vascular direction, and participate in the formation of blood vessels. In addition, transplanted TEC affects both the area of the underlying myocardium, and the peri-infarction area, where a significant activation of new vessel formation takes place, which may be the basis for limiting of negative remodeling. This effect can be explained by the paracrine mechanism of action of transplanted cells that secrete a set of angiogenic growth factors and cytokines that complement each other in influencing the vascularization process. It is well known that formation of functionally mature vessels requires combined or consistent actions of several growth factors [15]. For example, endogenous VEGF-A triggers angiogenesis, but its combination with Ang-1 is necessary for stabi-

сохраняется на протяжении 30 дней наблюдения. Трансплантированные ТИК интегрируются в поврежденную ткань сердца животного–реципиента, клетки ТИК не подвергаются апоптозу, сохраняют пролиферативный потенциал, и частично дифференцируются в сосудистом направлении, участвуют в формировании сосудов. Кроме того, трансплантированная ТИК оказывает воздействие как непосредственно на зону «подлежащего» миокарда, так и на перинфарктную область, где происходит значительная активация формирования новых сосудов, что может лежать в основе ограничения негативного ремоделирования. Этот эффект может быть объяснен паракринным механизмом действия трансплантированных клеток, секретирующих набор ангиогенных факторов роста и цитокинов, взаимодополняющих друг друга по влиянию на процесс васкуляризации. Хорошо известно, что для формирования зрелых функционально полноценных сосудов необходимо совместное или последовательное действие нескольких ростовых факторов [15]. Так эндогенный VEGF-A запускает ангиогенез, но для стабилизации/созревания новых сосудов, необходима его комбинация с Ang-1 [16]. Результаты наших предыдущих исследований, а также работ других научных групп, также указывают на необходимость совместного влияния ангиогенных факторов для эффективной стимуляции васкуляризации миокарда и скелетных мышц [17, 18]. В данном исследовании было продемонстрировано, что МПК в составе клеточных пластов секретируют практически оптимальный набор факторов для стимуляции всех этапов формирования сосудистой сети от запуска процесса ангиогенеза (VEGF, uPA) до созревания/стабилизации новообразованных сосудов (HGF, Ang-1) [19–22]. МПК секретируют факторы, привлекающие из кровотока стволовые клетки, включая эндотелиальные предшественники (SDF-1, VEGF) и факторы, в зону повреждения (SDF-1) [23], а также привлекающие эндогенные стволовые клетки сердца (HGF) [24]. HGF – важнейший регулятор направленной миграции МПК, несущих на своей поверхности рецептор к этому фактору – c-met. Секреция HGF прогениторными клетками сердца является важной частью механизма их аутокринной регуляции. HGF обладает антифибротическим эффектом и подавляет продукцию коллагенов фибробластами, препятствуя негативному ремоделированию ЛЖ после инфаркта миокарда [22]. Помимо этих факторов ключевая роль в обеспечении регенеративного процесса в сердце принадлежит системе протеаз, прежде всего урокиназной системе, включающей урокиназу (uPA), ее рецептор (uPAR) и ингибитор (PAI-1). Эта система обеспечивает запуск локализованного внеклеточного протеолиза, необходимого для направленной миграции клеток в ткани, а также активации

lization/maturation of new vessels [16]. Results of our previous studies, as well as the work of other research teams, also indicate the need in the joint influence of angiogenic factors for effective stimulation of myocardial and skeletal muscle vascularization [17, 18]. In this study, we demonstrated that MPCs in the composition of cell sheets secreted an almost optimal set of factors for stimulation of all stages of vascular network formation from the start of the angiogenesis (VEGF, uPA) to maturation/stabilization of newly formed vessels (HGF, Ang-1) [19–22]. MPC secretes factors that attract stem cells from the bloodstream, including endothelial precursors (SDF-1, VEGF) and factors, to the affected zone (SDF-1) [23], as well as attract endogenous cardiac stem cells (HGF) [24]. HGF is the most important regulator of directed MPC migration carrying a c-met receptor on its surface. HGF secretion by cardiac progenitor cells is an important part of the mechanism of their autocrine regulation. HGF has an antifibrotic effect and inhibits collagen production by fibroblasts, preventing negative LV remodeling after myocardial infarction [22]. In addition to these factors, a protease system, primarily the urokinase system, including urokinase (uPA), its receptor (uPAR) and inhibitor (PAI-1), plays a key role in ensuring the regenerative process in the heart. This system enables the initiation of localized extracellular proteolysis required for directed cell migration into tissues, as well as activation of growth factors required for successful vascularization. In general, epicardial TEC transplantation onto the epicardial surface in the infarction zone ensures the MPC survival for a sufficiently long time, maintenance of their proliferative potential, and probably their paracrine properties, which stimulate the repair/regeneration of damaged myocardium.

Conclusion

In general, the strategy of using epicardial TEC transplantation based on MPC sheets seems to be a rational approach for effective delivery of viable stem/progenitor cells to the damaged myocardium. The use of TEC helps to reduce or temporarily eliminate the effect of factors that contribute to progressive heart dysfunction by local paracrine exposure and activation of the revascularization processes in the affected zone.

Acknowledgements. The work was carried out with a financial support of Russian Science Foundation Grant No. 17-15-01368.

факторов роста, необходимых для успешной васкуляризации. В целом, эпикардальная трансплантация ТИК на эпикардальную поверхность сердца в области инфаркта обеспечивает выживание МПК в течение достаточно длительного времени, поддержание их пролиферативного потен-

циала, и, вероятно, их паракринных свойств, которые стимулируют процессы репарации/регенерации поврежденного миокарда.

Заключение

В целом, стратегия использования эпикардиальной трансплантации ТИК на основе пластов из прогениторных клеток представляется рациональным подходом для эффективной доставки жизнеспособных стволовых/прогениторных клеток в

Литература

1. Лихванцев В.В., Убасев Ю.В., Скрипкин Ю.В., Забелина Т.С., Сунгуров В.А., Ломиворотов В.В., Марченко Д.Н. Предоперационная профилактика сердечной недостаточности в некардиальной хирургии. *Общая реаниматология*. 2016; 12 (3): 48–61. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-3-48-61
2. Мороз В.В., Марченко Д.Н., Скрипкин Ю.В., Забелина Т.С., Овезов А.М., Лихванцев В.В. Периоперационные предикторы неблагоприятного исхода сосудистых вмешательств. *Общая реаниматология*. 2017; 13 (3): 6–12. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-3-6-12
3. Дергилев К.В., Рубина К.А., Цоколаева З.И., Сысоева В.Ю., Гмызина А.И., Калинина Н.И., Белявская Т.М., Акчури Р.С., Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Аневризма левого желудочка — возможный источник резидентных стволовых клеток сердца. *Цитология*. 2010; 52 (11): 921–930. PMID: 21268851
4. Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Рубина К.А., Сысоева В.Ю., Макаревич П.И., Болдырева М.А., Белоглазова И.Б., Зубкова Е.С., Шаронов Г.В., Акчури Р.С. Выделение и характеристика прогениторных клеток сердца из миокарда ушка правого предсердия. *Цитология*. 2016; 58 (5): 340–348.
5. Dergilev K.V., Makarevich P.I., Tsokolaeva Z.I., Boldyreva M.A., Beloglazova I.B., Zubkova E.S., Menshikov M.Yu., Parfyonova Y.V. Comparison of cardiac stem cell sheets detached by Versene solution and from thermoresponsive dishes reveals similar properties of constructs. *Tissue Cell*. 2017; 49 (1): 64–71. DOI: 10.1016/j.tice.2016.12.001. PMID: 28041835
6. Traktuev D.O., Tsokolaeva Z.I., Shevelev A.A., Talitskiy K.A., Stepanova V.V., Johnstone B.H., Rahmat-Zade T.M., Kapustin A.N., Tkachuk V.A., March K.L., Parfyonova Y.V. Urokinase gene transfer augments angiogenesis in ischemic skeletal and myocardial muscle. *Mol. Ther.* 2007; 15 (11): 1939–1946. DOI: 10.1038/sj.mt.6300262. PMID: 17653104
7. Zhang Y., Sivakumaran P., Newcomb A.E., Hernandez D., Harris N., Khanabдали R., Liu G.S., Kelly D.J., Pébay A., Hewitt A.W., Boyle A., Harvey R., Morrison W.A., Elliott D.A., Disting G.J., Lim S.Y. Cardiac repair with a novel population of mesenchymal stem cells resident in the human heart. *Stem Cells*. 2015; 33 (10): 3100–3113. DOI: 10.1002/stem.2101. PMID: 26184084
8. Taghavi S., Sharp T.E.3rd, Duran J.M., Makarevich C.A., Berretta R.M., Starosta T., Kubo H., Barbe M., Houser S.R. Autologous c-Kit+ mesenchymal stem cell injections provide superior therapeutic benefit as compared to c-Kit+ cardiac-derived stem cells in a feline model of isoproterenol-induced cardiomyopathy. *Clin. Transl. Sci.* 2015; 8 (5): 425–431. DOI: 10.1111/cts.12251. PMID: 25684108
9. Di Meglio F., Castaldo C., Nurzynska D., Miraglia R., Romano V., Russolillo V., Giuseppina L., Vosa C., Montagnani S. Localization and origin of cardiac CD117-positive cells: identification of a population of epicardially-derived cells in adult human heart. *Ital. J. Anat. Embryol.* 2010; 115 (1–2): 71–78. PMID: 21072993
10. Karantalis V., Hare J.M. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ. Res.* 2015; 116 (8): 1413–1430. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303614. PMID: 25858066
11. Terashvili M., Bosnjak Z.J. Stem cell therapies in cardiovascular disease. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2018; pii: S1053-0770(18)30281-7. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1053/j.jvca.2018.04.048. PMID: 30029992
12. Дергилев К.В., Рубина К.А., Парфенова Е.В. Резидентные стволовые клетки сердца. *Кардиология*. 2011; 51 (4): 84–92. PMID: 21623726
13. Konstandin M.H., Völkers M., Collins B., Quijada P., Quintana M., De La Torre A., Ormachea L., Din S., Gude N., Toko H., Sussman M.A. Fibronectin contributes to pathological cardiac hypertrophy but not physiological growth. *Basic Res. Cardiol.* 2013; 108 (5): 375. DOI: 10.1007/s00395-013-0375-8. PMID: 23912225
14. Muncie J.M., Weaver V.M. The physical and biochemical properties of the extracellular matrix regulate cell fate. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2018; 130: 1–37. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2018.02.002. PMID: 29853174
15. Lai H.J., Kuan C.H., Wu H.C., Tsai J.C., Chen T.M., Hsieh D.J., Wang T.W. Tailored design of electrospun composite nanofibers with staged release of multiple angiogenic growth factors for chronic wound healing. *Acta Biomater.* 2014; 10 (10): 4156–4166. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.05.001. PMID: 24814882

поврежденный миокард. Применение ТИК способствует уменьшению или временному исключению действия факторов, способствующих прогрессирующей дисфункции сердца, путем локального паракринного воздействия и активации процессов ревакуляризации зоны повреждения.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта российского научного фонда №17-15-01368.

References

1. Likhvantsev V.V., Ubasev Y.V., Skripkin Y.V., Zabelina T.S., Sungurov V.A., Lomivorotov V.V., Marchenko D.N. Preoperative prevention of heart failure in noncardiac surgery. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2016; 12 (3): 48–61. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-3-48-61. [In Russ., In Engl.]
2. Moroz V.V., Marchenko D.N., Skripkin Y.V., Zabelina T.S., Ovezov A.M., Likhvantsev V.V. Perioperative predictors of unfavorable outcome of vascular surgery. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2017; 13 (3): 6–12. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-3-6-12. [In Russ., In Engl.]
3. Dergilev K.V., Rubina K.A., Tsokolaeva Z.I., Sysoeva V.Yu., Gmyzina A.I., Kalinina N.I., Belyavskaya T.M., Akchurin R.S., Parfenova E.V., Tkachuk V.A. Left ventricular heart aneurism—a new source of resident cardiac stem cells. *Tsitologiya*. 2010; 52 (11): 921–930. PMID: 21268851. [In Russ.]
4. Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Rubina K.A., Sysoeva V.Y., Makarevich P.I., Boldyreva M.A., Beloglazova I.B., Zubkova E.S., Sharonov G.V., Akchurin R.S., Parfyonova Y.V. Isolation and characterization of cardiac progenitor cells obtaining from myocardial right atrial appendage tissue. *Tsitologiya*. 2016; 58 (5): 340–348. PMID: 30188625. [In Russ.]
5. Dergilev K.V., Makarevich P.I., Tsokolaeva Z.I., Boldyreva M.A., Beloglazova I.B., Zubkova E.S., Menshikov M.Yu., Parfyonova Y.V. Comparison of cardiac stem cell sheets detached by Versene solution and from thermoresponsive dishes reveals similar properties of constructs. *Tissue Cell*. 2017; 49 (1): 64–71. DOI: 10.1016/j.tice.2016.12.001. PMID: 28041835
6. Traktuev D.O., Tsokolaeva Z.I., Shevelev A.A., Talitskiy K.A., Stepanova V.V., Johnstone B.H., Rahmat-Zade T.M., Kapustin A.N., Tkachuk V.A., March K.L., Parfyonova Y.V. Urokinase gene transfer augments angiogenesis in ischemic skeletal and myocardial muscle. *Mol. Ther.* 2007; 15 (11): 1939–1946. DOI: 10.1038/sj.mt.6300262. PMID: 17653104
7. Zhang Y., Sivakumaran P., Newcomb A.E., Hernandez D., Harris N., Khanabдали R., Liu G.S., Kelly D.J., Pébay A., Hewitt A.W., Boyle A., Harvey R., Morrison W.A., Elliott D.A., Disting G.J., Lim S.Y. Cardiac repair with a novel population of mesenchymal stem cells resident in the human heart. *Stem Cells*. 2015; 33 (10): 3100–3113. DOI: 10.1002/stem.2101. PMID: 26184084
8. Taghavi S., Sharp T.E.3rd, Duran J.M., Makarevich C.A., Berretta R.M., Starosta T., Kubo H., Barbe M., Houser S.R. Autologous c-Kit+ mesenchymal stem cell injections provide superior therapeutic benefit as compared to c-Kit+ cardiac-derived stem cells in a feline model of isoproterenol-induced cardiomyopathy. *Clin. Transl. Sci.* 2015; 8 (5): 425–431. DOI: 10.1111/cts.12251. PMID: 25684108
9. Di Meglio F., Castaldo C., Nurzynska D., Miraglia R., Romano V., Russolillo V., Giuseppina L., Vosa C., Montagnani S. Localization and origin of cardiac CD117-positive cells: identification of a population of epicardially-derived cells in adult human heart. *Ital. J. Anat. Embryol.* 2010; 115 (1–2): 71–78. PMID: 21072993
10. Karantalis V., Hare J.M. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ. Res.* 2015; 116 (8): 1413–1430. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303614. PMID: 25858066
11. Terashvili M., Bosnjak Z.J. Stem cell therapies in cardiovascular disease. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2018; pii: S1053-0770(18)30281-7. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1053/j.jvca.2018.04.048. PMID: 30029992
12. Dergilev K.V., Rubina K.A., Parfenova E.V. Resident cardiac stem cells. *Kardiologiya*. 2011; 51 (4): 84–92. PMID: 21623726. [In Russ.]
13. Konstandin M.H., Völkers M., Collins B., Quijada P., Quintana M., De La Torre A., Ormachea L., Din S., Gude N., Toko H., Sussman M.A. Fibronectin contributes to pathological cardiac hypertrophy but not physiological growth. *Basic Res. Cardiol.* 2013; 108 (5): 375. DOI: 10.1007/s00395-013-0375-8. PMID: 23912225
14. Muncie J.M., Weaver V.M. The physical and biochemical properties of the extracellular matrix regulate cell fate. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2018; 130: 1–37. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2018.02.002. PMID: 29853174
15. Lai H.J., Kuan C.H., Wu H.C., Tsai J.C., Chen T.M., Hsieh D.J., Wang T.W. Tailored design of electrospun composite nanofibers with staged release of multiple angiogenic growth factors for chronic wound healing. *Acta Biomater.* 2014; 10 (10): 4156–4166. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.05.001. PMID: 24814882

- Biomater.* 2014; 10 (10): 4156–4166. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.05.001. PMID: 24814882
16. Stone O.A., Carter J.G., Lin P.C., Paleolog E., Machado M.J., Bates D.O. Differential regulation of blood flow-induced neovascularization and mural cell recruitment by vascular endothelial growth factor and angiotensin signalling. *J. Physiol.* 2017; 595 (5): 1575–1591. DOI: 10.1113/JP273430. PMID: 27868196
 17. Brudno Y., Ennett-Shepard A.B., Chen R.R., Aizenberg M., Mooney D.J. Enhancing microvascular formation and vessel maturation through temporal control over multiple pro-angiogenic and pro-maturation factors. *Biomaterials.* 2013; 34 (36): 9201–9209. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.007. PMID: 23972477
 18. Makarevich P.I., Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Boldyreva M.A., Shevchenko E.K., Gluhanyuk E.V., Gallinger J.O., Menshikov M.Y., Parfyonova Y.V. Angiogenic and pleiotropic effects of VEGF165 and HGF combined gene therapy in a rat model of myocardial infarction. *PLoS One.* 2018; 13 (5): e0197566. DOI: 10.1371/journal.pone.0197566. PMID: 29787588
 19. Szade A., Grochot-Przeczek A., Florczyk U., Jozkowicz A., Dulak J. Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis. *IUBMB Life.* 2015; 67 (3): 145–159. DOI: 10.1002/iub.1358. PMID: 25899846
 20. Karaman S., Leppänen V.M., Alitalo K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. *Development.* 2018; 145 (14): pii: dev151019. DOI: 10.1242/dev.151019. PMID: 30030240
 21. Morishita R., Aoki M., Hashiya N., Yamasaki K., Kurinami H., Shimizu S., Makino H., Takesya Y., Azuma J., Ogihara T. Therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor (HGF). *Curr. Gene Ther.* 2004; 4 (2): 199–206. DOI: 10.2174/1566523043346453. PMID: 15180586
 22. Morishita R., Nakamura S., Hayashi S., Taniyama Y., Moriguchi A., Nagano T., Taiji M., Noguchi H., Takeshita S., Matsumoto K., Nakamura T., Higaki J., Ogihara T. Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension.* 1999; 33 (6): 1379–1384. DOI: 10.1161/01.HYP.33.6.1379. PMID: 10373220
 23. Yu J., Li M., Qu Z., Yan D., Li D., Ruan Q. SDF-1/CXCR4-mediated migration of transplanted bone marrow stromal cells toward areas of heart myocardial infarction through activation of PI3K/Akt. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2010; 55 (5): 496–505. DOI: 10.1097/FJC.0b013e3181d7a384. PMID: 20179608
 24. Linke A., Müller P., Nurzynska D., Casarsa C., Torella D., Nascimbene A., Castaldo C., Cascapera S., Böhm M., Quaini F., Urbanek K., Leri A., Hintze T.H., Kajstura J., Anversa P. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102 (25): 8966–8971. DOI: 10.1073/pnas.0502678102. PMID: 15951423
 16. Stone O.A., Carter J.G., Lin P.C., Paleolog E., Machado M.J., Bates D.O. Differential regulation of blood flow-induced neovascularization and mural cell recruitment by vascular endothelial growth factor and angiotensin signalling. *J. Physiol.* 2017; 595 (5): 1575–1591. DOI: 10.1113/JP273430. PMID: 27868196
 17. Brudno Y., Ennett-Shepard A.B., Chen R.R., Aizenberg M., Mooney D.J. Enhancing microvascular formation and vessel maturation through temporal control over multiple pro-angiogenic and pro-maturation factors. *Biomaterials.* 2013; 34 (36): 9201–9209. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.007. PMID: 23972477
 18. Makarevich P.I., Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Boldyreva M.A., Shevchenko E.K., Gluhanyuk E.V., Gallinger J.O., Menshikov M.Y., Parfyonova Y.V. Angiogenic and pleiotropic effects of VEGF165 and HGF combined gene therapy in a rat model of myocardial infarction. *PLoS One.* 2018; 13 (5): e0197566. DOI: 10.1371/journal.pone.0197566. PMID: 29787588
 19. Szade A., Grochot-Przeczek A., Florczyk U., Jozkowicz A., Dulak J. Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis. *IUBMB Life.* 2015; 67 (3): 145–159. DOI: 10.1002/iub.1358. PMID: 25899846
 20. Karaman S., Leppänen V.M., Alitalo K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. *Development.* 2018; 145 (14): pii: dev151019. DOI: 10.1242/dev.151019. PMID: 30030240
 21. Morishita R., Aoki M., Hashiya N., Yamasaki K., Kurinami H., Shimizu S., Makino H., Takesya Y., Azuma J., Ogihara T. Therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor (HGF). *Curr. Gene Ther.* 2004; 4 (2): 199–206. DOI: 10.2174/1566523043346453. PMID: 15180586
 22. Morishita R., Nakamura S., Hayashi S., Taniyama Y., Moriguchi A., Nagano T., Taiji M., Noguchi H., Takeshita S., Matsumoto K., Nakamura T., Higaki J., Ogihara T. Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension.* 1999; 33 (6): 1379–1384. DOI: 10.1161/01.HYP.33.6.1379. PMID: 10373220
 23. Yu J., Li M., Qu Z., Yan D., Li D., Ruan Q. SDF-1/CXCR4-mediated migration of transplanted bone marrow stromal cells toward areas of heart myocardial infarction through activation of PI3K/Akt. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2010; 55 (5): 496–505. DOI: 10.1097/FJC.0b013e3181d7a384. PMID: 20179608
 24. Linke A., Müller P., Nurzynska D., Casarsa C., Torella D., Nascimbene A., Castaldo C., Cascapera S., Böhm M., Quaini F., Urbanek K., Leri A., Hintze T.H., Kajstura J., Anversa P. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102 (25): 8966–8971. DOI: 10.1073/pnas.0502678102. PMID: 15951423

Received 06.09.18

Поступила 06.09.18