DOI: 10.23868/201811038

ХАРАКТЕРИСТИКА АНГИОГЕННЫХ СВОЙСТВ C-KIT+-КЛЕТОК МИОКАРДА

К.В. Дергилев[1], З.И. Цоколаева[1], И.Б. Белоглазова[1], Е.И. Ратнер[1], Ю.Д. Молокотина[1], Е.В. Парфенова[1, 2]

[1] *Институт экспериментальной кардиологии Национального медицинского исследовательского центра кардиологии, Москва, Россия*

[2] *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

ANGIOGENIC PROPERTIES OF MYOCARDIAL C-KIT+ CELLS

K.V. Dergilev[1], Z.I. Tsokolaeva[1], I.B. Beloglazova[1], E.I. Ratner[1], Yu.D. Molokotina[1], E.V. Parfenova[1, 2]

[1] *Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russia*

[2] *M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

e-mail: doctorkote@gmail.com

В настоящее время большой интерес вызывает возможность использования клеток, получаемых непосредственно из миокарда, в качестве инструмента для стимуляции ангиогенеза и репаративных процессов в сердце.

Целью данного исследования было изучение in vitro и in vivo ангиогенных свойств c-kit+-клеток, получаемых из миокарда мелких грызунов.

Работа выполнена на самцах мышей линии C57BL/6 и крыс линии Вистар. В исследовании использованы методы проточной цитофлуориметрии, иммунофлуоресцентного анализа, модели инфаркта миокарда и подкожного ангиогенеза в Матригеле™.

Было показано, что после острого инфаркта миокарда происходит значительная активация пула c-kit+-клеток, часть из которых вступают в эндотелиальную дифференцировку и интегрируются в сосуды, образующиеся de novo. Культивированные in vitro c-kit+-клетки экспрессируют маркеры сосудистых клеток-предшественниц, проявляют эндотелиоподобные свойства, а после подкожной трансплантации в организм мыши в Матригеле™ вызывают значительное повышение васкуляризации трансплантата. Это достигается как за счет паракринных эффектов, стимулирующих прорастание сосудов мыши-реципиента в Матригель, так и частично за счет дифференцировки трансплантированных клеток в клетки эндотелия сосудов, что подтверждено при использовании клеток, прижизненно меченных витальным красителем.

Таким образом, c-kit+-клетки, получаемые из миокарда, могут рассматриваться как перспективный тип резидентных клеток, проявляющих свойства прогениторных клеток сосудов сердца, для разработки подходов к стимуляции васкуляризации ишемизированного миокарда.

Ключевые слова: c-kit+-клетки, прогениторные клетки сердца, инфаркт миокарда, васкуляризация.

Now, great interest is connected with application of the cells received directly from a myocardium as the tool for stimulation of angiogenesis and reparative processes in heart.

The aim of the present research is studying of angiogenic properties in vitro and in vivo of c-kit+-cells, obtained from hearts of small rodents.

The work was performed on male C57BL/6 mice and male Wistar rats. The study used methods of cytofluorimetry, immunofluorescent staining, models of myocardial infarction and subcutaneous angiogenesis in Matrigel™.

It was shown, that after acute myocardial infarction c-kit+ cells activated, part of which entered into endothelial differentiation and integrated into de novo formed vessels. C-kit+-expressed the markers of vascular progenitor cells, exhibited endothelial-like behavior in vitro, and after subcutaneous transplantation increased vascularization of Matrigel™. This is achieved both due to the paracrine effects, which stimulate the growth of the recipient's mouse vessels into the Matrigel implant, and partially due to the differentiation of the transplanted cells into the vascular endothelium cells, which was confirmed by vital dye staining.

Thus, c-kit+-cells derived from the myocardium can be considered as a promising type of resident cells exhibiting the properties of progenitor cells of the heart vessels for developing approaches to stimulate vascularization of the ischemic myocardium.

Keywords: c-kit+-cells, cardiac progenitor cells, myocardial infarction, vascularization.

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания уже на протяжении нескольких десятилетий лидируют в списке причин смертности населения развитых стран, значительно опережая все другие болезни. Одной из важнейших проблем в этой области является инфаркт миокарда, в основе которого лежит острое нарушение коронарного кровотока, приводящее к гибели значительного количества клеток сердца. В случае проведения своевременной реперфузии функциональные нарушения в работе сердца могут быть частично или полностью устранены. Однако полное восстановление кровоснабжения миокарда с помощью коронарного шунтирования или баллонной ангиопластики со стентированием возможно далеко не во всех случаях, что делает актуальным разработку альтернативных методов стимуляции васкуляризации миокарда. В качестве такого терапевтического подхода может рассматриваться клеточная терапия, основанная на использовании стволовых/прогениторных клеток разных типов [1]. Однако эффективность клеточной терапии внесердечными прогениторными клеткам (в основном, клетками костного мозга и периферической крови) оказалась недостаточной [2, 3]. В связи с этим внимание исследователей было обращено на клетки, получаемые непосредственно из ткани сердца и характеризующиеся свойствами прогениторных клеток, то есть клоногенностью, мультипотентностью, способностью к самообновлению.

Ранее было показано, что c-kit+-клетки, выделяемые из кардиальных эксплантов, обладают способностью к образованию клонов, индуцируемой дифференцировке в кардиомиоцитарном, эндотелиальном и гладкомышечном направлениях, экспрессируют гены эмбриональных клеток, включая гены плюрипотентности, и участвуют в регуляции клеточного гомеостаза миокарда [4–7], а после трансплантации улучшают функцию сердца и уменьшают постинфарктное ремоделирование левого желудочка [8]. Первоначальные представления об этих клетках как предшественниках кардиомиоцитов в ходе их обновления в течение жизни или регенерации после повреждения не получили подтверждения в других

работах [9]. Однако в значительной степени эти эффекты могут быть обусловлены стимуляцией васкуляризации поврежденных участков миокарда при трансплантации этих клеток, что позволяет сохранить жизнеспособность части поврежденных, но не погибших кардиомиоцитов [10]. Целью данного исследования было изучение in vitro и in vivo ангиогенных свойств c-kit$^+$-клеток, полученных из миокарда мелких грызунов.

Материал и методы

Животные

Исследование проводили на самцах мышей линии C57BL/6 из питомника лабораторных животных ФГБУ НМИЦ Кардиологии и крыс линии Wistar, приобретенных в питомнике лабораторных животных «Пущино» (Пущино, Россия). Животные содержались в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде в соответствии с требованиями ГОСТ. Эвтаназия мышей проводилась после ингаляционной наркотизации изофлюраном (Abbott, США) 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 (ФГБУ НМИЦ, разрешение № 385.06.2009).

Моделирование инфаркта миокарда мыши

В качестве основы моделирования экспериментального инфаркта миокарда использована методика, описанная ранее [11]. Операция проводилась под общей анестезией авертином (Sigma, США), введенным внутрибрюшинно. Животные (n=30) были интубированны и подключены к аппарату искусственной вентиляции легких (Harvard Apparatus, Германия). После подготовки операционного поля производился продольный разрез кожи по передней срединной линии, от угла грудины до основания мечевидного отростка. Подлежащие ткани разделялись путем тупой препаровки. После визуализации наружной поверхности межреберных мышц для проникновения в грудную полость выполнялся горизонтальный разрез по ходу четвертого межреберного промежутка от реберно-грудинного сочленения до средней подмышечной линии. Ранорасширителями раздвигали ребра для получения доступа к сердцу, ножницами вскрывали перикард. На переднебоковой поверхности левого желудочка (ЛЖ) с помощью шелковой лигатуры (хирургический шелк без покрытия, диаметр нити 8/0 USP) делали перевязку передней нисходящей коронарной артерии. Зона развивающегося инфаркта отличалась по цвету от интактного миокарда (она имела бледно-бордовый цвет). Далее удаляли воздух из грудной полости и рану послойно ушивали. Операция проводилась в асептических условиях. Послеоперационная смертность животных находилась в пределах 38±15%.

Животных выводили из эксперимента через 3, 7 и 14 сут. после моделирования инфаркта. Перед забором сердец в полость миокарда ЛЖ вводили 0,1 мл насыщенного раствора KCl, что приводило к остановке сокращений в диастолу. Предсердия и крупные сосуды иссекались, сердца промывали 0,9% раствором NaCl, помещали в криосреду Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek, США) и замораживали в жидком азоте. Криосрезы сердец толщиной 7 мкм, изготовленные с интервалом 300 мкм между срезами поперек от верхушки до основания левого желудочка, хранили при −70 °C. Визуализацию сосудистых маркеров в c-kit$^+$-клетках проводили путем иммунофлуоресцентной реакции криосрезов с антителами к маркерам c-kit (Biolegend, США; Santa Cruz, США), Ets1 (Abcam, США), CD31 (BD, США) и вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США) или Alexa Fluor 594 (Invitrogen).

Моделирование инфаркта миокарда крысы и трансплантация c-kit$^+$-клеток

Инфаркт миокарда был индуцирован путем перевязки передней нисходящей коронарной артерии крыс Wistar (n=44) с помощью способа, описанного ранее [12]. Перед трансплантацией c-kit$^+$-клетки метили флуоресцентным красителем Cell Tracker CM Dil (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя реагента. Экспериментальных животных делили на 2 группы (n=22 в каждой): животным контрольной группы интрамиокардиально выполняли 4 инъекции по 50 мкл среды M199 (ThermoFisher Scientific, США) без добавок; животным экспериментальных групп интрамиокардиально вводили в периинфарктную область 1×10^6 c-kit$^+$-клеток, ресуспендированных в 200 мкл среды M199. Инъекционное введение клеток выполнялось в течение 10 мин. после перевязки коронарной артерии. Послеоперационная смертность животных находилась в пределах 28±12%. Животных выводили из эксперимента через 14 сут. после трансплантации клеточного препарата.

Получение и культивирование резидентных c-kit$^+$-клеток сердца мыши

Мышей наркотизировали авертином и выполняли билатеральную торакотомию для получения доступа к сердцу. Затем иссекали перикард и выделяли/разделяли магистральные сосуды, идущие к сердцу. Далее выделяли фрагмент аорты, длины которого было достаточно для проведения канюляции без повреждения аортального клапана. В просвет аорты вводили катетер, подключали его к аппарату для перфузии и проводили перфузию сердца по методу Лангендорфа сначала раствором Кребса-Хенселейта (118,0 ммоль/л NaCl; 4,7 ммоль/л KCl; 2,5 ммоль/л $CaCl_2$; 1,2 ммоль/л KH_2PO_4; 1,6 ммоль/л $MgSO_4$; 25,0 ммоль/л $NaHCO_3$; 0,5 ммоль/л Na-EDTA; 5,5 ммоль/л глюкозы; pH 7,4) в течение 7 мин. со скоростью 3–3,5 мл/мин., затем в течение 9 мин. ферментом — коллагеназой 2 (250 Ед/мг; Worthington, США), приготовленным на растворе для перфузии, и далее раствором для инактивации фермента (5 г бычьего сывороточного альбумина в 1 л раствора Кребса-Хенселейта). После этого сердце измельчали ножницами, пипетировали переваренную ткань в течение 2 мин., полученную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр и центрифугировали при 600 g (5 мин.). Выделенные клетки использовали для проведения иммуномагнитной селекции с помощью наборов и протоколов фирмы Milteniy Biotec (США). На первом этапе проводили деплецию клеток гемопоэтического ряда с использованием набора Direct Lineage Cell Depletion Kit, mouse (Myltenyi biotec, США). Затем Lin(-) клетки сортировали с применением коммерческого набора CD117 MicroBeads, mouse (Myltenyi biotec). Изолированные клетки культивировали в чашках, покрытых фибронектином, в среде DMEM/F12 (ThermoFisher Scientific), дополненной 10% ФБС (ATCC, США), 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина, 2 мМ L-глутамина, 2% B27, 1x инсулин-трансферрин-селенитом и факторами роста: 20 нг/мл bFGF, 20 нг/мл EGF, 10 нг/мл LIF.

Получение и культивирование резидентных c-kit$^+$-клеток сердца крысы

Культуры c-kit$^+$-клеток крысы получали по методу, описанному ранее [13]. Клетки культивировали в среде DMEM/F12, дополненной 10% фетальной телячьей

сыворотки (ATCC), 100 ЕД/мл пенициллина/стрептомицина, 2 мМ L-глутамина, 2% B27, 1x инсулин-трансферрин-селенитом и факторами роста: 20 нг/мл bFGF, 20 нг/мл EGF, 10 нг/мл LIF.

Анализ иммунофенотипа c-kit$^+$-клеток сердца методом проточной цитофлуориметрии

Для проведения анализа суспензию клеток центрифугировали (200 g, 5 мин.), супернатант удаляли, осадок инкубировали в течение 30 мин. при +4°C с первично меченными антителами к маркерам c-kit (Myltenyi biotec), Sca-1 (Myltenyi biotec), CD 45 (Biolegend), CD 105 (Abcam), затем клетки промывали 3 раза и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), далее анализировали с помощью проточного цитофлуориметра FACS Canto II (BD, США). Для идентификации других маркеров использовали следующий протокол: суспензию клеток центрифугировали (200 g, 5 мин.), супернатант удаляли, осадок инкубировали в течение 30 мин. при +4°C в растворе 1% BSA/ФСБ с антителами к одному из следующих антигенов: CD34 (Santa Cruz, США), CD73 (Santa Cruz), C-met (Zymed, США), VEGFR2 (Abcam), PDGFR (Thermo Fisher Scientific). После инкубации клетки центрифугировали (200 g, 5 мин.), дважды промывали ФСБ, ресуспендировали в 1% BSA/ФСБ со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (кат # A11001 и A11008, Invitrogen), инкубировали в течение 30 мин. при +4°C, промывали, ресуспендировали в ФСБ и анализировали с использованием проточного цитофлуориметра FACS Canto II.

Анализ клоногенного потенциала c-kit$^+$-клеток миокарда

Для оценки клоногенного потенциала c-kit$^+$-клеток использовали метод «серийных разведений». На первом этапе культуру клеток обрабатывали раствором для открепления клеток Accutase™ (Stemcell Technologies, США) для получения суспензии единичных клеток, производили подсчет клеток, разводили клеточную суспензию до 1×10^4 кл./мл, затем до концентрации, которая позволит получить 96 клонов, и высаживали в лунки 96-луночного планшета. Эффективность клонообразования (ЭК) c-kit$^+$-клеток в процентах рассчитывали по формуле: ЭК=C1/C2×100, где C1 — количество лунок со сформированными колониями; C2 — общее количество лунок в планшете.

Анализ дифференцировочной способности c-kit$^+$-клеток миокарда

Для анализа дифференцировочной способности c-kit$^+$-клеток сердца клетки культивировали в дифференцировочной среде. Для индукции эндотелиальной дифференцировки c-kit$^+$-клетки 3 пассажа высевали на культуральные чашки, покрытые желатином, в среду Endothelial Cell Growth Medium-2 (Lonza, США), в которой гидрокортизон заменен на дексаметазон (10^{-8} M) и культивировали в течение 21 сут. Смену дифференцировочной среды проводили каждые 48 ч. Эндотелиальную дифференцировку тестировали путем окрашивания клеток антителами к маркеру Pecam (CD31) (1: 100, 1 ч., BD) и вторичными антителами Alexa Fluor 488 (1: 800, 1 ч., Invitrogen).

Анализ формирования капилляроподобных структур на поверхности Matrigel™

C-kit$^+$-клетки 3 пассажа предварительно депривировали в бессывороточной среде (EGM™-2MV Microvascular Endothelial Cell Growth Medium-2; Lonza) без добавок в течение 18 ч., снимали с поверхности культуральной чашки, обрабатывая раствором Accutase™, считали количество клеток, высаживали в лунки 12-луночного культурального планшета (15×10^4 кл./лунку), предварительно покрытых Matrigel™ (Growth Factor Reduced Matrix; Corning, США) и культивировали в течение 8 ч. в среде EGM™-2MV Microvascular Endothelial Cell Growth Medium-2. Документирование изображений сформированных сосудистых структур проводили с помощью микроскопа Axiovert 200M (Zeiss, Германия) и цифровой видеокамеры Axiocam HRC (Zeiss, Германия).

Анализ васкуляризации подкожного имплантата Matrigel™ у мыши

Эксперимент проводили на мышах-самцах линии C57BL/6 в возрасте 10 недель. Перед трансплантацией c-kit$^+$-клетки метили флуоресцентным красителем Cell Tracker CM Dil (Invitrogen), 5×10^5 c-kit$^+$-клеток 4 пассажа ресуспендировали в 50 мкл среды DMEM (Gibco, США) без добавок, смешивали с 200 мкл Matrigel™ и медленно отбирали шприцом 250 мкл суспензии Matrigel™ с клетками (группа трансплантации клеток), стараясь избегать вспенивания раствора и появления в нем пузырьков воздуха. В качестве контроля использовали Matrigel™ без клеток. Для проведения трансплантации с помощью изогнутого пинцета приподнимали кожу по нижнему краю внутренней поверхности бедра и вводили иглу инсулинового шприца в паховую область параллельно продольной оси животного так, чтобы было видно расположение кончика иглы под кожей. Медленно вводили суспензию Matrigel™, наблюдая формирование подкожного «вздутия». Далее иглу извлекали, зажимали на 5 сек. место введения и обеспечивали неподвижность животного в течение 10 мин. Через 14 сут. кожу рассекали над областью бляшек Matrigel™, препарировали мягкие ткани, отсекали септы, сформированные вокруг бляшки, и изымали материал для гистологического исследования. Васкуляризацию трансплантатов Matrigel™ оценивали по количеству сосудов на срезах в ходе гистологического анализа. Визуализацию сосудов проводили с использованием иммунофлуоресцентной реакции с антителами к CD31 и вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488.

Документирование и анализ изображений

Документирование изображений проводили с помощью микроскопа Axiovert 200M. Изображения фиксировали цифровой видеокамерой Axiocam HRC и обрабатывали в программах Axiovision 3.1 (Zeiss, Германия) и Adobe PhotoShop (Adobe Systems, США).

Статистический анализ

Количественные данные представлены в формате среднее ± стандартное отклонение. Для оценки статистической значимости различий использовали U-критерий Манна-Уитни и программный пакет Statistica 8.0 (Statsoft, США).

Результаты

Сосудистая сеть сердца является динамической структурой, которая адаптируется в зависимости от потребностей органа в кровоснабжении и для обеспечения жизнеспособности и функционирования различных клеток миокарда [14]. Наряду с клетками эндотелия, перицитами, гладкомышечными клетками в этом процессе принимают участие прогениторные клетки разных типов [15]. Мы предположили, что резидентные c-kit$^+$-клетки сердца могут участвовать в обновлении/ремоделировании сосудистой сети взрослого сердца. Для проверки этой гипотезы c-kit$^+$-клетки были выделены из образцов миокарда мыши путем ретроградной перфузии

изолированного сердца мыши по методу Лангендорфа. С помощью метода проточной цитофлуориметрии было показано, что в условиях in vitro эти клетки сохраняют экспрессию рецептора c-kit на клеточной поверхности (рис. 1). Оказалось, что наряду с рецептором c-kit на поверхности этих клеток, культивированных in vitro, сохраняется второй рецептор, характеризующий прогениторные клетки мыши — Sca-1. При этом гемопоэтические маркеры CD34 и CD45 полностью отсутствовали в выделенных из миокарда c-kit$^+$Sca-1$^+$-клетках, что исключает

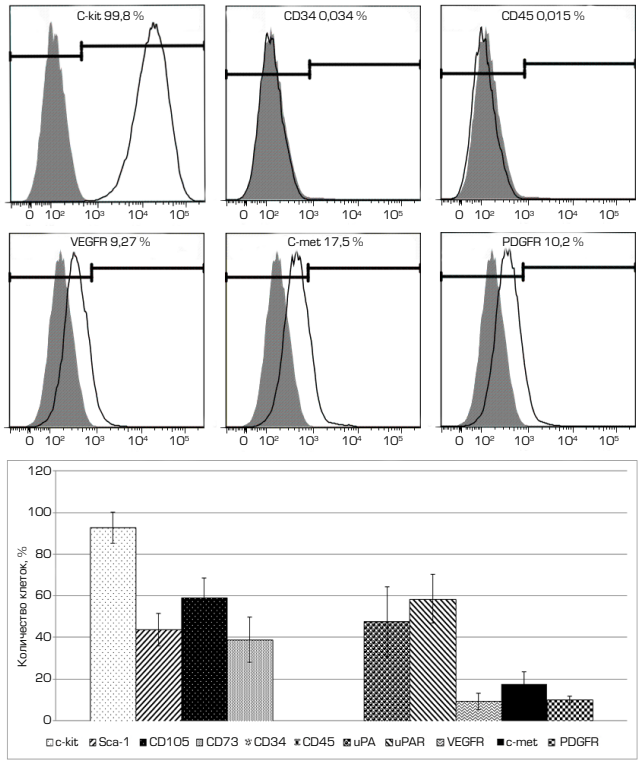

Рис. 1. Иммунофенотип c-kit$^+$-клеток, выделенных из миокарда мышей

их гемопоэтическую природу. Интересно отметить, что на поверхности выделенных клеток присутствовали маркеры мезенхимальных клеток (CD105 и CD73). Наличие маркеров мезенхимальных клеток было описано ранее при характеристике клеточных ниш миокарда in vivo [16] и при культивировании c-kit$^+$- и Sca-1$^+$-клеток миокарда in vitro [17]. Кроме того, на поверхности c-kit$^+$-клеток присутствовали рецепторы к основным проангиогенным факторам роста: VEGF, C-met, PDGF, а также рецептор урокиназы — сериновой протеазы, принимающей участие в регуляции ангиогенеза [18].

Культура c-kit$^+$-клеток сердца мыши обладала основными свойствами прогениторных клеток сосудов [4, 7]. Они хорошо пролиферировали в культуре и поддерживали соответствующий иммунофенотип на протяжении 10 пассажей. Эффективность клонообразования c-kit$^+$-клеток на первом пассаже составляла 3±1 % и возрастала к 3 пассажу, достигая 5±2 %. После культивирования в дифференцировочной среде полученные клоны c-kit$^+$-клеток проявляли способность к дифференцировке в сосудистые клетки-предшественницы и эндотелиальные клетки, характеризующиеся экспрессией маркеров Ets1 и PECAM (CD31) (рис. 2А). Кроме того, они формировали капилляроподобные структуры при культивировании на поверхности Matrigel™, что указывает на их эндотелиоподобное поведение (рис. 2Б).

Для проверки ангиогенного потенциала in vivo c-kit$^+$-клетки мыши были трансплантированы подкожно в составе Matrigel™ (рис. 3). Через 14 сут. после введения трансплантированные клетки сохранялись в Matrigel™, о чем свидетельствовало флуоресцентное свечение маркера Cell Tracker CM Dil. Количественный анализ показал, что по сравнению с контрольным Matrigel™ (без клеток), c-kit$^+$-клетки сердца значительно стимулировали формирование сосудистых структур в составе подкожного трансплантата (рис. 3). При этом интеграция введенных клеток в состав новообразованных сосудов и их дифференцировка в эндотелиальные клетки (наложение зеленой флуоресценции — CD31 и красной — Cell Tracker CM Dil) была выявлена лишь в 2,1±0,8 % всех

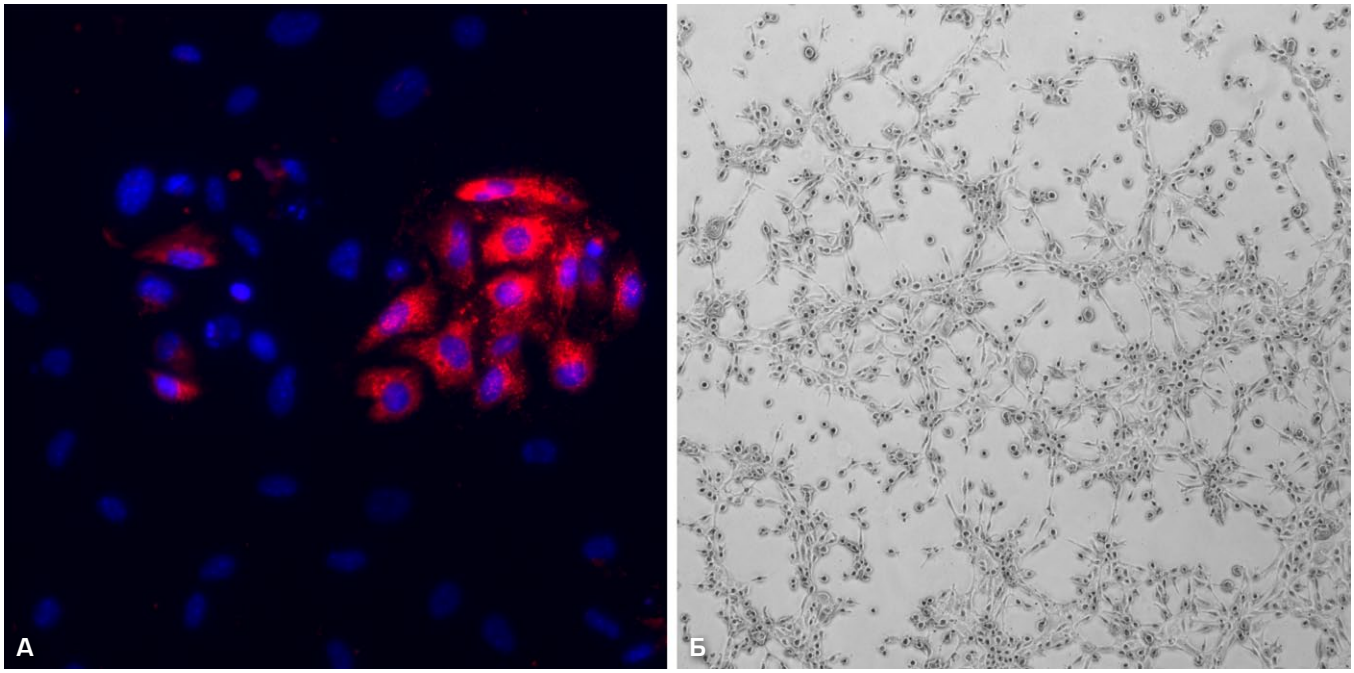

Рис. 2. Культуры c-kit$^+$-клеток после индукции дифференцировки в эндотелиальном направлении: А — экспрессия CD31 (красный); Б —капилляроподобные структуры при культивировании c-kit$^+$-клеток на поверхности Matrigel™. А — иммунофлуоресцентная реакция, ядра клеток докрашены DAPI. Ув.: А ×400; Б ×250

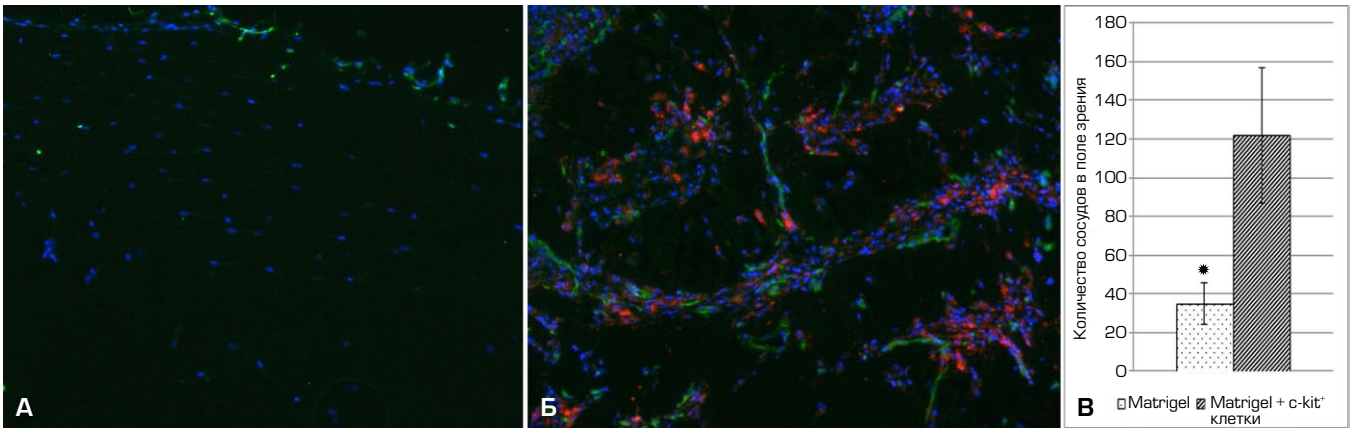

Рис. 3. Новообразованные сосуды в Matrigel™ с c-kit⁺-клетками после подкожной трансплантации мышам: А — Matrigel™ без клеток (контроль); Б — Matrigel™ с c-kit⁺-клетками; В — количество CD31⁺-сосудистых структур в контрольной и экспериментальной группах. А, Б — иммунофлуоресцентная реакция с антителами к CD31 (зеленый), C-kit⁺-клетки помечены флуоресцентным красителем Cell Tracker CM Dil (красный), ядра клеток докрашены DAPI. Ув. ×100

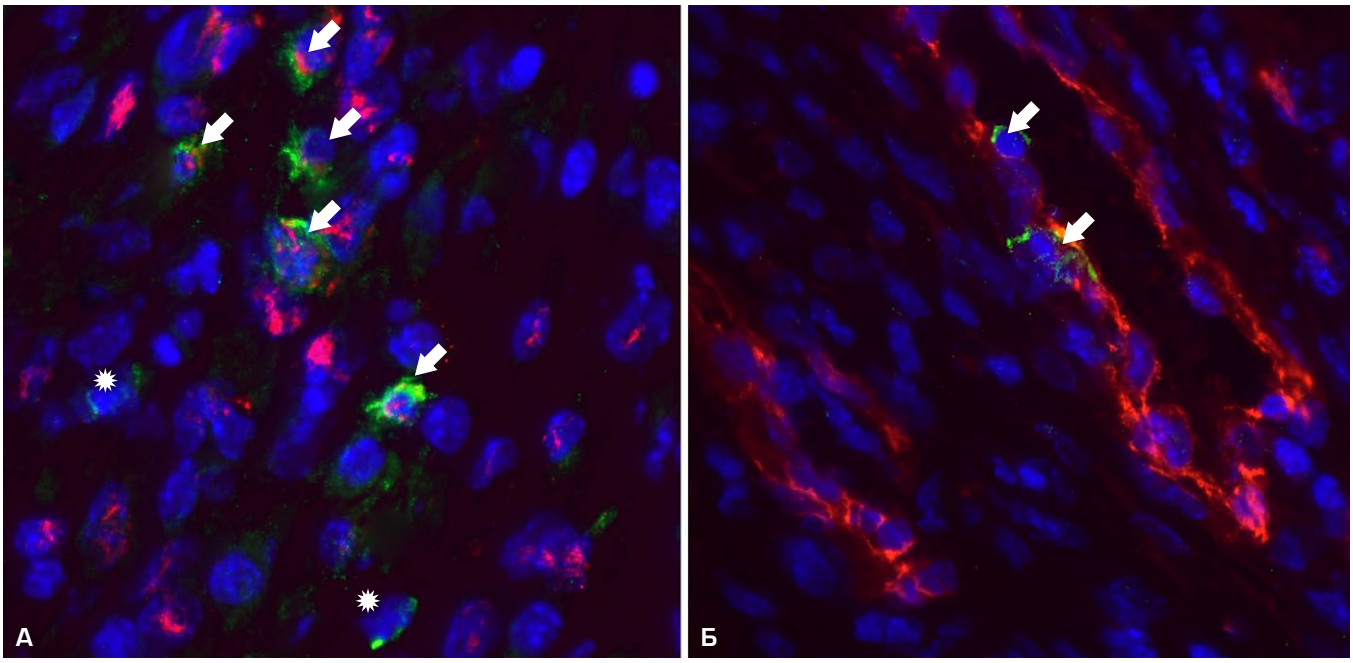

Рис. 4. Миокард мышей после смоделированного инфаркта, формирование сосудов при участии c-kit⁺-клеток: А — экспрессия транскрипционного фактора эндотелиальных клеток Ets1 (малиновый); Б — экспрессия CD31 (красный). Иммунофлуоресцентная реакция с антителами к соответствующим маркерам и c-kit (зеленый), ядра клеток докрашены DAPI. Стрелки указывают на c-kit⁺-клетки, экспрессирующие маркеры сосудистых клеток Ets1 (А) и CD31 (Б), звездочки — c-kit⁺-клетки без маркера Ets1. Ув. ×400

сосудистых структур. Большинство сформированных в Matrigel™ сосудов было представлено прорастающими сосудами мыши-реципиента, так как маркер эндотелия сосудов PECAM (CD31) не со-локализовался с маркером c-kit⁺-клеток — Cell Tracker CM Dil. Это свидетельствовало о том, что стимуляция прорастания сосудов мыши-реципиента в Matrigel™ была обусловлена паракринными эффектами трансплантированных клеток. Помимо этого, введеные Cell Tracker CM Dil⁺-клетки распределялись в составе Matrigel™ определенным образом, формируя клеточные структуры, подобные «тяжам», по ходу которых прорастали сосуды мыши-реципиента.

На втором этапе работы мы исследовали в динамике участие c-kit⁺-клеток сердца в постинфарктной реваскуляризации миокарда мыши. Известно, что c-kit⁺-клетки в миокарде характеризуются наряду с экспрессией тирозинкиназного рецептора c-kit к фактору стволовых клеток (SCF) полным отсутствием маркеров клеток гемопоэтического ряда (CD34, CD45) и триптазы — маркера тучных клеток [4, 5, 7, 16]. В неповрежденном миокарде c-kit⁺-клетки определялись в виде единичных клеток в интерстициальном пространстве между кардиомиоцитами и не экспрессировали маркеры васкулогенных клеток-предшественниц и зрелых эндотелиальных клеток. На 3 сут. после моделирования острого инфаркта миокарда наблюдалась инфильтрация зоны повреждения миокарда c-kit⁺CD45⁻-клетками (252±118 кл/мм²), которая сохранялась до 7 сут. (264±143 кл/мм²) и постепенно снижалась к 14 сут. (124±43 кл/мм²). Начиная с 3 сут. в зоне некроза обнаруживалось значительное повышение количества c-kit⁺CD45⁻-клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор Ets1 (121±44 c-kit⁺Ets1⁺ кл/мм²), который указывает на запуск начальных этапов дифференцировки клеток в эндотелиальном направлении (рис. 4А). И уже к 7 сут. визуализировались как единичные c-kit⁺CD45⁻-клетки, начинающие экспрессировать маркер эндотелия PECAM, так и клетки, интегрированные в сосудистую стенку, что косвенно указывает на участие c-kit⁺CD45⁻-клеток в формировании сосудов в зоне репарации после повреждения (78±37 c-kit⁺CD31⁺-кл/мм²) (рис. 4Б).

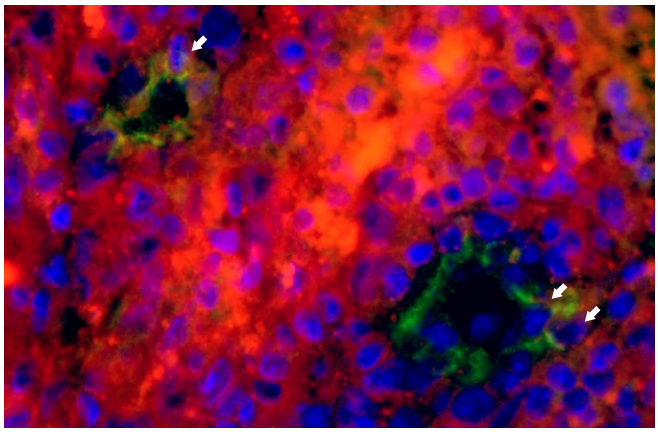

Рис. 5. Периинфарктная зона миокарда крысы после интрамиокардиальной трансплантации c-kit$^+$-клеток. Иммунофлуоресцентная реакция с антителами к CD31 (зеленый); трансплантированные c-kit$^+$-клетки мечены Cell Tracker CM Dil (красный); стрелки указывают на Pecam$^+$/Cell Tracker CM Dil$^+$-клетки, ядра клеток докрашены DAPI. Ув. ×250

При внутримиокардиальной трансплантации меченых c-kit$^+$-клеток сердца крысы после моделирования инфаркта мы также обнаружили признаки их дифференцировки в эндотелиальном направлении: часть меченных c-kit$^+$-клеток экспрессировала маркеры Ets1 и Pecam и интегрировалась в сосудистую стенку (рис. 5).

Обсуждение

Фундаментальные исследования последних лет продемонстрировали, что миокард взрослых млекопитающих все-таки способен к регенерациии после повреждения, но крайне ограниченной, недостаточной для замещения больших потерь кардиомиоцитов [18]. Важнейшим условием для успешного восстановления миокарда является образование новой сосудистой сети. Нарушение микроциркуляции и тканевой перфузии может не только способствовать возникновению аритмий, но и приводить к нарушению развития компенсаторной гипертрофии и повышению числа гибнущих и гибернирующих кардиомиоцитов, что лежит в основе развития сердечной недостаточности. При инфаркте миокарда острая окклюзия коронарной артерии вызывает образование обширной области ишемии и массивной гибели как кардиомиоцитов, так и всех клеток сосудов. Однако уже через сутки зона ишемии существенно сокращается и почти полностью исчезает на 3 сут., когда происходит формирование первых капилляров [19]. Результаты современных работ доказали, что классический механизм васкулогенеза, т.е. формирование новых сосудов за счет циркулирующих эндотелиальных клеток-предшественниц, вносит минимальный вклад в реваскуляризацию поврежденного сердца [20]. Формирование новых сосудов в сердце происходит исключительно за счет дифференцировки эндогенного пула клеток-предшественниц и пролиферации клеток зрелого эндотелия, присутствующих в миокарде [20]. В настоящей работе мы показали, что после инфаркта миокарда у мышей происходит увеличение пула c-kit$^+$CD45$^-$-клеток в зоне повреждения, которые начинают экспрессировать маркеры эндотелиальных клеток и интегрируются в стенки новообразованных сосудов. Васкулогенные свойства c-kit$^+$-клеток были зарегистрированы и после интрамиокардиального введения этих клеток на модели инфаркта миокарда у крыс. Более того, трансплантированные c-kit$^+$-клетки также начинали экспрессировать маркеры эндотелиальных клеток и встраиваться в новые сосуды. Эти данные согласуются с результатами исследований [21–24], подтверждающих возможность формирования новых артериол и капилляров за счет дифференцировки c-kit$^+$-клеток сердца. Оказалось, что эти клетки наряду с экспрессией рецепторов, характерных для прогениторных клеток — c-kit и Sca-1, экспрессируют на своей поверхности рецепторы к основным проангиогенным факторам роста: VEGF, C-met, PDGF и урокиназе. Урокиназа и ее рецептор, играют важную роль в формировании сосудов при ишемии и воспалении, регулируя направленную миграцию клеток сосудистой стенки, моноцитов/макрофагов и стволовых/прогениторных клеток разных типов [25–27]. Запускаемый урокиназой каскад протеолитических реакций, включающих локальное образование плазмина и активацию матриксных металлопротеиназ, способствует разрушению внеклеточного матрикса на пути формирования новых сосудистых отростков, активацию некоторых факторов роста (VEGF и про-HGF) и высвобождение факторов роста, секвестрированных в матриксе (bFGF, IGF и TGF-бета) [28, 29]. Мы выявили, что клоны c-kit$^+$-клеток дифференцируются в эндотелиальном направлении при культивировании в дифференцировочной среде. Кроме того, они хорошо формируют капилляроподобные структуры на поверхности Matrigel™, т.е. проявляют эндотелиоподобное поведение in vitro. В составе подкожного трансплантата в Matrigel™ c-kit$^+$-клетки сердца индуцируют его васкуляризацию, но только очень небольшое количество введенных клеток интегрируются в сосуды, проявляя признаки эндотелиальной дифференцировки. Большинство сосудов, прорастающих в трансплантат, образованы клетками мыши-реципиента, что свидетельствует о паракринном влиянии трансплантированных клеток на васкуляризацию Matrigel™. Согласно литературным данным, в составе популяции c-kit$^+$-клеток сердца присутствуют клетки, имеющие иммунофенотип c-kit$^+$KDR/FLK$^+$CD45$^-$, которые формируют пул клеток, обновляющих коронарные сосуды [23]. В соответствии с данными проточной цитофлуориметрии более 9% c-kit$^+$-клеток сердца мыши экспрессировали на своей поверхности рецептор VEGF 2 типа, являющийся ключевым регулятором ангио- и васкулогенеза в эмбриональном и постнатальном периоде [30, 31]. Возможно именно c-kit$^+$KDR$^+$-клетки и явились источником небольшой части (2%) эндотелиальных клеток в новых сосудах в трансплантате. С другой стороны, пространственная организация трансплантированных клеток в виде тяжей, вдоль которых прорастают новые сосуды, может быть аналогом ниши сосудистых прогениторных клеток. При этом c-kit$^+$-клетки формируют межклеточные контакты с клетками сосудов животного-реципиента, выступая в качестве клеток микроокружения. Можно предположить, что такое взаимодействие обеспечивает рост новых сосудов за счет обмена экзосомами/микровезикулами и действия проангиогенных факторов роста, продуцируемых c-kit$^+$-клетками сердца. Ранее мы обнаружили, что эти клетки продуцируют проангиогенные факторы роста: HGF, VEGF, ангиопоэтин-1 и ангиопоэтин-2 [32]. Кроме того, было показано, что они высвобождают экзосомы и микровезикулы, в состав которых входят цитокины, факторы роста и микроРНК, регулирующие рост сосудов и регенеративные процессы, и это может объяснять терапевтические свойства c-kit$^+$-клеток при их трансплантации в поврежденный миокард [33, 34]. Возможно, именно воздействием экзосом, переносящих в клетки поврежденного миокарда miRNA-210, miRNA-132 и miRNA-146a, объясняется подавление активности RasGAP-p120, Ephrin A3 и PTP1b сигнальных путей, что приводит к подавлению апоптоза

кардиомиоцитов, усилению миграции эндотелиальных клеток и васкуляризации зоны повреждения [35].

Заключение

Таким образом, полученные результаты указывают на c-kit$^+$-клетки сердца как резидентные клетки миокарда с проангиогенными свойствами, обусловленными как способностью дифференцироваться в клетки сосудов, так и паракринными эффектами, включающими, вероятно, и секрецию внеклеточных везикул, в частности, экзосом. Это ведет к раннему формированию новых сосудов в зоне повреждения, что улучшает трофику ишемизированной ткани, стимулирует выживание кардиомиоцитов и клеток сосудов, и, следовательно, уменьшает негативное ремоделирование и прогрессирование сердечной недостаточности.

Благодарности

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

ЛИТЕРАТУРА:

1. Michler R.E. The current status of stem cell therapy in ischemic heart disease. J. Card. Surg. 2018; 33(9): 520–31.
2. Litwinowicz R., Kapelak B., Sadowski J. et al. The use of stem cells in ischemic heart disease treatment. Kardiochir. Torakochirurgia. Pol. 2018; 15(3): 196–9.
3. Lalu M.M., Mazzarello S., Zlepnig J. et al. Safety and efficacy of adult stem cell therapy for acute myocardial infarction and ischemic heart failure (SafeCell Heart): a systematic review and meta-analysis. Stem Cells Transl. Med. 2018; 9999: 1–10.
4. Bolli R., Chugh A.R., D'Amario D. et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. Lancet 2011; 378(9806): 1847–57.
5. Dergilev K.V., Rubina K.A., Tsokolaeva Z.I. et al. Left ventricular heart aneurism — a new source of resident cardiac stem cells. Tsitologiia 2010; 52(11): 921–30.
6. Broughton K.M., Wang B.J., Firouzi F. et al. Mechanisms of Cardiac Repair and Regeneration. Circ. Res. 2018; 122(8): 1151–63.
7. Dergilev K.V., Rubina K.A., Parfenova E.V. Resident cardiac stem cells. Kardiologiia 2011; 51(4): 84–92.
8. Menasché P. Cell therapy trials for heart regeneration — lessons learned and future directions. Nat. Rev. Cardiol. 2018; 15(11): 659–71.
9. Senyo S.E., Steinhauser M.L., Pizzimenti C.L. et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. Nature 2013; 493(7432): 433–6.
10. Cahill T.J., Choudhury R.P., Riley P.R. Heart regeneration and repair after myocardial infarction: translational opportunities for novel therapeutics. Nature Reviews Drug Discovery 2017; 16: 699–717.
11. Ovsepyan A.A., Panchenkov D.N., Prokhortchouk E.B. et al. Modeling myocardial infarction in mice: methodology, monitoring, pathomorphology. Acta Naturae 2011; 3(1): 107–15.
12. Traktuev D.O., Tsokolaeva Z.I., Shevelev A.A. et al. Urokinase gene
13. transfer augments angiogenesis in ischemic skeletal and myocardial muscle. Mol. Ther. 2007; 15(11): 1939–46.
14. Dergilev K.V., Makarevich P.I., Tsokolaeva Z.I. et al. Comparison of cardiac stem cell sheets detached by Versene solution and from thermo-responsive dishes reveals similar properties of constructs. Tissue and Cell 2017; 49(1): 64–71.
15. Salikova S.P., Bakhtiiarov R.Z. The role of structural changes of the endothelium and myocardium in the development of experimental heart failure. Morfologiia 2008; 134(5): 20–5.
16. Torsney E., Xu Q. Resident vascular progenitor cells. J. Mol. Cell. Cardiol. 2011; 50(2): 304–11.
17. Leri A., Rota M., Hosoda T. et al. Cardiac stem cell niches. Stem Cell Res. 2014; 13(3): 631–46.
18. Gambini E., Pompilio G., Biondi A. et al. C-kit$^+$ cardiac progenitors exhibit mesenchymal markers and preferential cardiovascular commitment. Cardiovasc. Res. 2011; 89(2): 362–73.
19. Broughton K.M., Wang B.J., Firouzi F. et al. Mechanisms of Cardiac Repair and Regeneration. Circ. Res. 2018; 122(8): 1151–63.
20. Kobayashi K., Maeda K., Takefuji M. et al. Dynamics of angiogenesis in ischemic areas of the infarcted heart. Sci. Rep. 2017; 7(1): 7156.
21. He L., Huang X., Kanisicak O. et al. Preexisting endothelial cells mediate cardiac neovascularization after injury. J. Clin. Invest. 2017; 127(8): 2968–81.
22. Li Y., He L., Huang X. et al. Genetic Lineage Tracing of Non-Myocyte Population by Dual Recombinases. Circulation 2018; 138(8): 793–805.
23. Tillmanns J., Rota M., Hosoda T. et al. Formation of large coronary arteries by cardiac progenitor cells. PNAS USA 2008; 105(5): 1668–73.
24. Bearzi C., Leri A., Lo Monaco F. et al. Identification of a coronary vascular progenitor cell in the human heart. PNAS USA 2009; 106(37): 15885–90.
25. Chen Z., Zhu W., Bender I. et al. Pathologic Stimulus Determines Lineage Commitment of Cardiac C-kit+ Cells. Circulation 2017; 136(24): 2359–72.
26. Laurenzana A., Fibbi G., Margheri F. et al. Endothelial Progenitor Cells in Sprouting Angiogenesis: Proteases Pave the Way. Curr. Mol. Med. 2015; 15(7): 606–20.
27. Tkachuk V.A., Plekhanova O.S., Parfyonova Y.V. Regulation of arterial remodeling and angiogenesis by urokinase–type plasminogen activator. Can. J. Physiol. Pharmacol. 2009; 87(4): 231–51.
28. Loscalzo J. The macrophage and fibrinolysis. Semin. Thromb. Hemost. 1996; 22(6): 503–6.
29. Stepanova V.V., Tkachuk V.A. Urokinase as a multidomain protein and polyfunctional cell regulator. Biochemistry (Mosc.) 2002; 67(1): 109–18.
30. Parfenova E.V., Plekhanova V.V., Stepanova V.V. et al. Plasminogen activator of urokinase-type: mechanisms of involvement in vessel remodeling and angiogenesis, gene therapy approaches to ischemia. Ross. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova. 2004; 90(5): 547–68.
31. Wu B., Zhang Z., Lui W. et al. Endocardial cells form the coronary arteries by angiogenesis through myocardial-endocardial VEGF signaling. Cell 2012; 151(5): 1083–96.
32. Jin Z.G., Ueba H., Tanimoto T. et al. Ligand independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. Circ. Res. 2003; 93: 354–63.
33. Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б. и др. Интрамиокардиальное введение c-kit$^+$-прогениторных клеток сердца вызывает активацию прогениторных клеток эпикарда и стимулирует васкуляризацию после инфаркта. Гены и Клетки 2018; 13(1): 75–81.
34. Chimenti I., Smith R.R., Li T.S. et al. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. Circ. Res. 2010; 106: 971–80.
35. Bianconi V., Sahebkar A., Kovanen P. et al. Endothelial and cardiac progenitor cells for cardiovascular repair: A controversial paradigm in cell therapy. Pharmacol. Ther. 2018; 181: 156–68.
36. Barile L., Lionetti V., Cervio E. et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. Cardiovasc. Res. 2014; 103(4): 530–41.

Поступила: 25.07.2018