

показал, что они формируют «новообразованную», хорошо васкуляризованную ткань на эпикардиальной поверхности миокарда левого желудочка. Часть трансплантированных ПКС мигрировала в миокард, проявляла признаки активации сигнальной передачи Notch (локализация NICD в ядре) и дифференцировки в эндотелиальном направлении. Полученные результаты свидетельствуют о том, что активация сигнального пути Notch может быть использована для стимуляции васкулогенного поведения ПКС и повышения терапевтических свойств тканеинженерных конструкций на их основе.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 16-15-00181.*

**Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б., Ратнер Е.И., Молокотина Ю.Д., Парфенова Е.В.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России  
doctorkote@gmail.com

#### **ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

В соответствии с рекомендациями регуляторных организаций Европейского Союза и США (EMA и FDA) для доклинических исследований терапевтической эффективности или специфической биологической активности биомедицинских клеточных препаратов стволовых/прогениторных клеток используют так называемые аналогичные клеточные препараты, полученные на основе аналогичных типов клеток у животных. В связи с этим особую актуальность приобретает разработка методов выделения, культивирования и оценки свойств стволовых/прогениторных клеток животных.

**ЦЕЛЬ.** Разработать способ выделения прогениторных клеток сердца (ПКС) и оценка их васкулогенных свойств *in vivo*. Разработанный способ выделения основан на ретроградной перфузии изолированного сердца мыши по методу Лангендорфа. За счет создания избыточного давления в аорте перфузионный раствор (раствор Кребса-Хензелята и коллагеназа II) попадает в коронарные артерии. Проходя через коронарные сосуды, перфузионный раствор вызывает деструкцию межклеточного матрикса и приводит к межклеточному «разобщению» с образованием суспензии клеток. Полученная клеточная суспензия после градиентного центрифугирования использовалась для иммуномагнитной селекции с антителами к маркеру CD117 (c-kit). ПКС мыши имели сходный фенотип с прогениторными клетками сердца человека и характеризовались отсутствием маркеров гематопозитических клеток, экспрессией маркеров стволовых клеток (c-kit, sca-1) и, частично, урокиназного рецептора, CD90, CD73, Notch 1. Полученные клетки мыши были способны к клонообразованию, образованию сфероидов и мультипотентной дифференцировке *in vitro* в кардиомиоцитарном, эндотелиальном и гладкомышечном направлениях, что сопоставимо с характеристиками ПКС человека. Для оценки *in vivo* ангиогенных свойств получаемых клеток мыши была использована модель подкожной имплантации клеток в Матригеле (Matrigel™) экспериментальным мышам. Показано, что ПКС в со-

ставе Матригеля эффективно стимулируют его васкуляризацию, но только часть ПКС интегрировалась и дифференцировалась в клетки новообразованных сосудов, что указывает и на паракринные механизмы их ангиогенного действия. Разработанный нами способ выделения c-kit ПКС из миокарда грызунов позволяет получать клетки, которые обладают основными характеристиками прогениторных клеток сердца, проявляют васкулогенные свойства *in vitro* и *in vivo*. Получаемые ПКС аналогичны по своим свойствам c-kit ПКС из миокарда или ушка правого предсердия человека, и могут быть использованы при доклинической оценке эффективности биомедицинских клеточных продуктов на основе ПКС человека как аналогичный клеточный препарат.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 17-15-01368.*

**Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б., Зубкова Е.С., Болдырева М.А., Меньшиков М.Ю., Парфенова Е.В.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России  
doctorkote@gmail.com

#### **ИНТРАМИОКАРДИАЛЬНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ РЕЗИДЕНТНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА ВЫЗЫВАЕТ АКТИВАЦИЮ КЛЕТОК ЭПИКАРДА И СТИМУЛЯЦИЮ НЕОВАСКУЛОГЕНЕЗА В ЗОНЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ**

В последние годы активно развивается направление, связанное с трансплантацией резидентных прогениторных клеток сердца (ПКС), с целью активации репаративных процессов в постинфарктном миокарде. Однако механизмы регенеративного действия пересаженных клеток остаются малоизученными.

**ЦЕЛЬ.** Оценить состояние ПКС после интрамиокардиальной трансплантации и исследовать влияние клеточного имплантата на активацию васкулогенного пула клеток эпикарда. Крысам-самцам линии Вистар проводили перевязку передней нисходящей коронарной артерии и интрамиокардиальные инъекции CM-DIL+ ПКС (1 млн. клеток) или контрольной среды. Через 14 дней после трансплантации ПКС сохраняли жизнеспособность и часть клеток проявляла признаки эндотелиальной дифференцировки. Достоверных различий в размере площади рубца между группами выявлено не было (данные морфометрии). Однако трансплантация ПКС способствовала уменьшению выраженности негативного ремоделирования: статистически значимому уменьшению дилатации полости ЛЖ, распространенности трансмурального поражения, увеличению толщины рубца и количества артериол в перинфарктной зоне. Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов миокарда показало достоверное увеличение количества Wt1+ прогениторных клеток эпикарда (ПКЭ) после трансплантации ПКС в сравнении с контрольной группой. ПКЭ мигрировали в миокард, часть из них коэкспрессировала маркеры CD31 (Pecam), гладкомышечный альфа-актин (SMA) и интегрировалась в новообразованные сосуды. Полученные результаты показывают, что интрамиокардиальная трансплантация ПКС способствует увеличению васкуляризации миокарда как за счет дифференцировки трансплантированных клеток, так и за счет активации васкулогенных

клеток эпикарда, а также уменьшает негативное ремоделирование, что может служить одним из показателей снижения риска развития постинфарктной сердечной недостаточности.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 16-15-00181.*

**Дергилев К.В., Цоколаева З.И.,  
Белоглазова И.Б., Зубкова Е.С.,  
Болдырева М.А., Меньшиков М.Ю.,  
Парфенова Е.В.**

ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России  
doctorokote@gmail.com

### **ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК НА РЕПАРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПОСЛЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА**

Сердце содержит пул низкодифференцированных стволовых/прогениторных клеток (ПКС), которые участвуют в поддержании клеточного гомеостаза в норме и при повреждении. Трансплантация ПКС рассматривается как перспективный метод поддержания и восстановления функциональной активности поврежденного миокарда (Gudeet al., 2017). Однако используемые способы доставки клеточного материала в виде инъекций суспензии клеток не позволяют избежать повреждения клеток и обеспечить хорошую выживаемость клеточного материала после трансплантации. Цель — сравнение эффективности трансплантации ПКС с помощью интрамиокардиального введения клеточной суспензии и эпикардиальной трансплантации в виде сформированных пластов клеток (ПК; cellsheet). Крысам-самцам линии Вистар проводили перевязку передней нисходящей коронарной артерии и проводили интрамиокардиальные инъекции CM-DIL+ ПКС или контрольной среды или эпикардиальную трансплантацию клеточных пластов ПКС (КП; cellsheet). Через 2 нед. после трансплантации количество сохранившихся меченых ПКС в группе инъекций было значительно меньше, чем в группе КП. При этом существенных различий в количестве клеток, экспрессирующих маркеры пролиферации и апоптоза, при двух способах введения выявлено не было. ПКС, трансплантированные в составе КП, имели более выраженную миграционную способность (из области первичного введения) по сравнению с инъекционными клетками. Оба метода трансплантации ПКС вызывали статистически значимое уменьшение дилатации полости ЛЖ, увеличение толщины стенки в области рубца по сравнению с контрольной группой. Однако, достоверное уменьшение размера рубца было продемонстрировано только в группе трансплантации КП. Гистологический анализ показал, что трансплантация КП способствует формированию «новообразованной», хорошо васкуляризированной ткани. ПКС, трансплантированные с помощью обоих способов, проявляли признаки дифференцировки в эндотелиальном направлении. Однако васкулогенный потенциал ПКС был достоверно выше при эпикардиальной трансплантации ПКС в составе КП. Таким образом, трансплантация ПКС в виде КП является перспективным способом доставки прогениторных клеток в миокард, способствующим поддержанию их выживаемости/сохранности и функциональных свойств после введения.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 16-15-00181.*

**Дергилев К.В., Цоколаева З.И.,  
Белоглазова И.Б., Ратнер Е.И.,  
Молокотина Ю.Д., Парфенова Е.В.**

ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России  
doctorokote@gmail.com

### **УРОКИНАЗНАЯ СИСТЕМА – ВОЗМОЖНЫЙ РЕГУЛЯТОР ФУНКЦИЙ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК И РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В СЕРДЦЕ**

Урокиназная система, состоящая из активатора плазминогена урокиназного типа (урокиназы — uPA), ее рецептора (uPAR) и ингибитора (PAI-1) является важнейшей системой, регулирующей основные функции клетки: направленную миграцию, пролиферацию, адгезию. Эта регуляция осуществляется через множество механизмов, включающих как регуляцию внеклеточного протеолиза и запуск протеолитических каскадов на поверхности клетки, так и внутриклеточные механизмы, обусловленные активацией множественных сигнальных каскадов. Несмотря на многочисленные исследования роли урокиназной системы в регуляции функций различных клеток, включая стволовые клетки, и тканей, касающихся прогениторных клеток сердца (ПКС) и миокарда крайне мало.

**ЦЕЛЬ.** Исследовать экспрессию компонентов урокиназной системы (урокиназы и урокиназного рецептора) в миокарде мыши после инфаркта. Моделирование инфаркта миокарда (ИМ) проводили путем перевязки передней нисходящей коронарной артерии у самцов мышей линии C57BL. В работе исследовали образцы здорового/неповрежденного миокарда и поврежденного сердца, полученного на 1, 3, 5, 7 и 14 сут. после инфаркта. С помощью иммуофлуоресцентного окрашивания показано, что в неповрежденном миокарде компоненты урокиназной системы присутствуют только на поверхности единичных клеток (макрофагах и лейкоцитах), расположенных в интерстициальном пространстве между кардиомиоцитов. В острую фазу после ИМ происходит значительная инфильтрация зоны некроза клетками воспаления, экспрессирующими урокиназу (uPA), ингибитор активатора плазминогена (PAI-1) и урокиназный рецептор (uPAR). На 3 день наблюдалось статистически значимое повышение количества резидентных прогениторных клеток сердца, характеризующихся наличием рецепторов CD117 и Sca-1 на поверхности, которые также несли uPAR. ПКС пролиферировали и коэкспрессировали маркеры дифференцировки в кардиальном/васкулогенном направлении. К 14 дню наблюдения количество CD117+uPAR+ и Sca-1+ uPAR+ ПКС клеток в зоне рубца и периинфарктной области снижается, что может указывать на окончание репаративного действия этих клеток. Отмечалось снижение количества uPA+ и PAI-1+ лейкоцитов/лимфоцитов, макрофагов в зоне некроза. Таким образом, острая фаза инфаркта миокарда характеризуется аккумуляцией в зоне инфаркта клеток воспаления, экспрессирующих на своей поверхности компоненты урокиназной системы, и прогениторных клеток сердца, экспрессирующих