

## СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ДЛЯ ТЕРАПИИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

М.А. Коноплянников, В.А. Кальсин, А.В. Аверьянов

*ФГБУ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов клинической помощи и медицинских технологий ФМБА России, Москва*

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) ускоряет гибель кардиомиоцитов и приводит к возникновению сердечной недостаточности. Существуют перспективы восстановления поврежденного миокарда благодаря использованию стволовых клеток. Данный обзор представляет собой краткое изложение современных данных по использованию различных типов стволовых клеток для терапии ИБС. Наиболее подробно рассматривается самый предпочтительный для клинического применения тип стволовых клеток – мезенхимальные стволовые клетки (МСК), их преимущества, клинические испытания на их основе, а также стратегия оптимизации МСК для улучшения их регенеративного потенциала.

**Ключевые слова:** ишемическая болезнь сердца, ремоделирование сердца, сердечно-сосудистая регенерация, стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, preconditioning.

### STEM CELLS FOR THE THERAPY OF ISCHEMIC HEART DISEASE: ADVANCES AND PROSPECTS

Konoplyannikov M.A., Kalsin V.A., Averyanov A.V.

Ischemic heart disease (IHD) accelerates death of cardiomyocytes and leads to the onset of cardiac failure. Due to the application of stem cells, there exists a potential for the regeneration of a damaged myocardium. Here we present a brief review of the modern data on the application of different types of stem cells for the IHD therapy. We pay special attention to the type of stem cells which is most preferable for the clinical application, namely, to the mesenchymal stem cells (MSC), including their advantages, clinical trials, as well as the strategy for the MSC optimization in order to boost their regenerative potential.

**Key words:** ischemic heart disease, cardiac remodelling, cardiovascular regeneration, stem cells, mesenchymal stem cells, preconditioning.

#### Введение

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является одной из главных причин смертности и инвалидности стареющего населения [1]. При инфаркте миокарда возникает некроз и усиливается апоптоз кардиомиоцитов, что, в конечном итоге, приводит к возникновению сердечной недостаточности (СН). Прогрессирующая потеря кардиомиоцитов происходит не только из-за ишемического состояния, но также и из-за сердечной недостаточности различного генеза [2]. Наоборот, подавление апоптоза кардиомиоцитов в экспериментах на животных приводит к улучшению функции сердца [3]. Лекарственные препараты, медицинские интервенции и трансплантация сердца, являющиеся распространенными современными методами лечения

больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, не всегда эффективны и доступны на тяжелых стадиях СН. Для преодоления этой ограниченности, в результате проведенных в последние десятилетия научных исследований, разрабатываются различные новые технологии лечения ИБС. В частности, с начала 2000-х годов проводятся активные исследования возможностей применения различных типов стволовых клеток для терапии данной патологии [4].

Ранее считалось, что кардиомиоциты в сердце взрослого человека не способны пролиферировать. Но недавно было установлено, что взрослые кардиомиоциты все же могут подвергаться делению и пролиферации, хотя их способность самостоятельно регенерировать миокард, поврежденный в результате ишемичес-

кой болезни, является недостаточной [5].

Большое количество успешно проведенных экспериментов на животных с очевидностью продемонстрировало, что функция поврежденного сердца может быть восстановлена путем введения в организм стволовых клеток, предварительно размноженных в большом количестве *in vitro*. Некоторые из стволовых клеток пролиферировали и дифференцировались в кардиомиоциты в зоне повреждения сердца [4]. Однако, в большинстве случаев такая дифференцировка была ограничена и не оказывала существенного эффекта на функциональное улучшение сердца, что обуславливало необходимость многостороннего анализа механизмов сердечной регенерации, вызываемой стволовыми клетками.

Поскольку сердце является постмитотическим органом, кардиомиоциты находятся в состоянии ареста клеточного цикла. Однако, некоторые эксперименты на тритонах и рыбах *Danio rerio* подтвердили, что поврежденное сердце может регенерировать благодаря резидентным стволовым клеткам, обладающим способностью к самообновлению и дифференцировке в кардиомиоциты с репарацией повреждения. Как и у млекопитающих, кардиомиоциты позвоночных при нормальных условиях не пролиферируют, но при повреждении сердца они подвергаются делению, возобновляя синтез ДНК и продвижение по клеточному циклу [6, 7]. Во взрослом человеческом организме сохранена небольшая способность кардиомиоцитов к обновлению, однако, только около 1% или 0.4% кардиомиоцитов обновляются каждый год у людей в возрасте 20 или 75 лет, соответственно [8].

В противоположность этому, у пациентов с инфарктом миокарда около 4% кардиомиоцитов в перинфарктной зоне позитивны по Ki-67 – маркеру клеточной пролиферации [9], а также у них наблюдается повышенная экспрессия специфических генов, способствующих делению кардиомиоцитов и их выходу из состояния задержки клеточного цикла [10].

Стволовые клетки обладают не только способностью к самообновлению, но также и мультипотентностью, они могут дифференцироваться в различные типы клеток, включая кардиомиоциты. Особенно интересными в плане изучения возможностей регенерации сердца при ИБС являются следующие типы стволовых клеток: эмбриональные стволовые клетки (ЭСК, ESC); индуцированные плюрипотентные стволовые

клетки (iPSC); стволовые клетки костного мозга (КМСК, BMSC), включающие гемопоэтические стволовые клетки (ГСК, HSC) и эндотелиальные прогениторные клетки (EPC); мезенхимальные стволовые клетки (МСК, MSC); скелетные миобласты (СкМ, SkM); резидентные стволовые клетки сердца (CSC) (рис.1).

### Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК)

ЭСК – стволовые клетки, получаемые из внутренней клеточной массы бластоцисты и обладающие тотипотентностью. Теоретически, ЭСК являются наиболее выгодным источником клеток для регенерации, т.к. они могут дифференцироваться в любые виды клеток [11, 12]. Показано, что ЭСК могут дифференцироваться в кардиомиоциты при специфических условиях культивирования, таких как сокультивирование с клетками мышины висцеральной эндодермы, при этом различные факторы способствуют дифференцировке ЭСК через паракринное регулирование [13]. Хуе и соавт. показали, что при трансплантации экспериментальным животным человеческих кардиомиоцитов, полученных дифференцировкой из ЭСК, пересаживаемые клетки инкорпорировались в сердечную ткань реципиента и осуществляли электрическое и функциональное взаимодействие с резидентными кардиомиоцитами организма хозяина [14]. Кроме того, такая трансплантация играла важную роль в регенерации зоны ишемии сердца в процессе лечения инфаркта миокарда, оказывая положительное влияние на состояние левого желудочка, согласно гемодинамическому анализу сокращения сердца, анализу локального нарушения кинетики стенки сердца и диастолической функции левого желудочка [15].

Но в целом, несмотря на положительные результаты, было показано, что лишь небольшая часть кардиомиоцитов, полученных дифференцировкой из ЭСК, имеют врожденную сократительную способность [16]. Кроме того, не был детально изучен механизм дифференцировки ЭСК в кардиомиоциты [17]. Также, использование этого типа стволовых клеток является неблагоприятным с этической точки зрения, так как для получения ЭСК надо разрушить начавший развитие эмбрион человека. Более того, трансплантация ЭСК может приводить к развитию опухоли – тератомы или к развитию реакции иммунного отторжения. По этим причинам никаких клинических исследо-

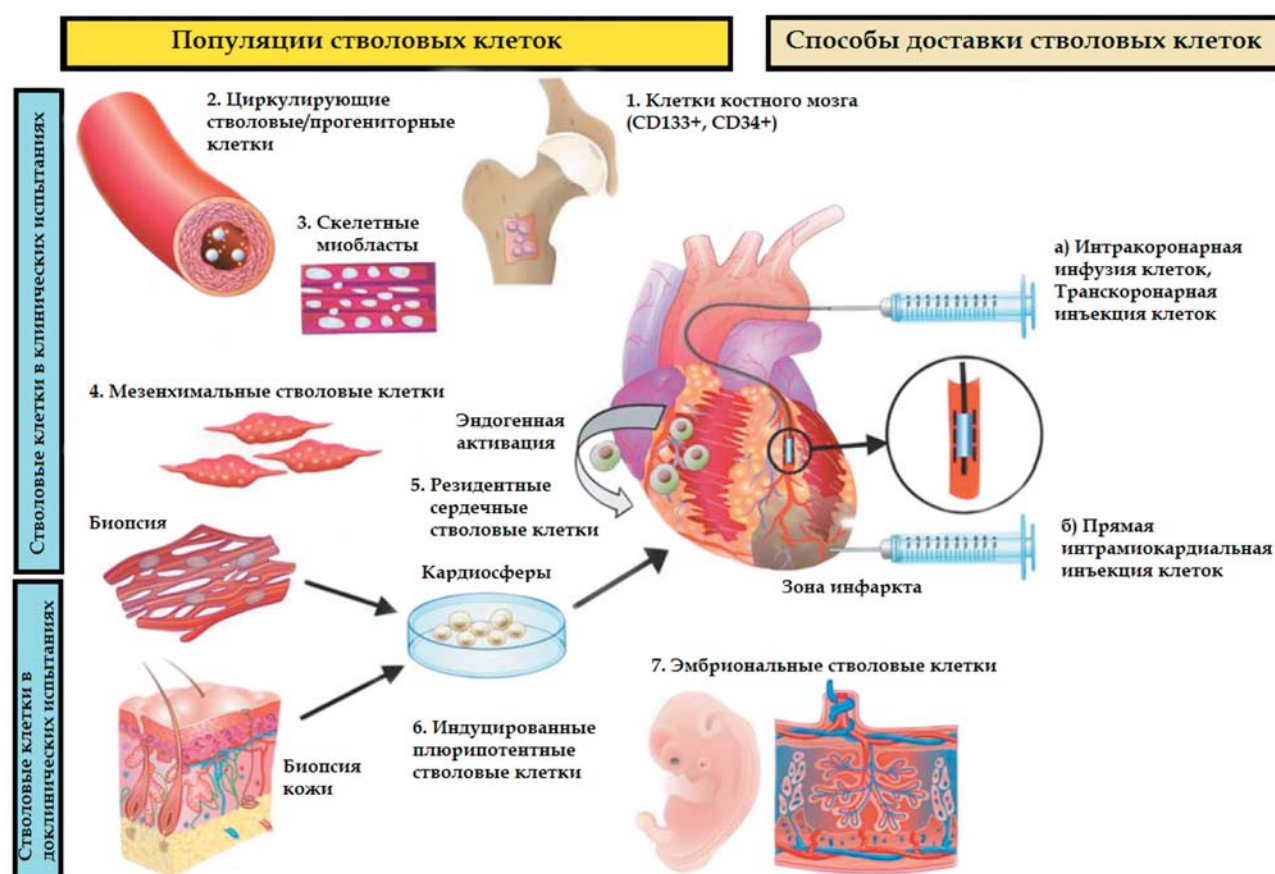


Рис.1. Стволовые и прогениторные клетки, исследуемые для возможной клеточной терапии ИБС, и способы их доставки в сердце (по Tongers и соавт., Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: promise, uncertainties, and challenges. European Heart Journal 2011; 32: 1197-1206).

ваний, в которых ЭСК использовались бы в качестве агента клеточной терапии для пациентов с ИБС, не проводилось.

### Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC)

В 2007 году Yamanaka и соавт. искусственно создали плюрипотентные стволовые клетки, похожие на ЭСК, но полученные из зрелых диплоидных соматических клеток, с использованием следующих факторов транскрипции – Oct3/4, Sox2, Klf4 и с-Мус, которые были названы авторами «индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками» (iPSC) [18]. iPSC, также как и ЭСК, могут дифференцироваться в различные типы клеток, включая кардиомиоциты [19]. Nelson и соавт. установили, что клеточная терапия на мышинной модели ИБС с использованием дифференцированных в направлении кардиомиоцитов мышинных iPSCs, индуцированных человеческими факторами транскрипции, восстанавливает поврежденные функции сердца [20].

Как и в случае с ЭСК, несмотря на положительные результаты, клиническое использование iPSC представляется пока не слишком перспективным, во-первых – из-за очень низкого выхода iPSC, полученных с помощью 4-х типов генов; во-вторых – из-за низкой эффективности их дифференцировки в кардиомиоциты, и в-третьих – из-за того, что дифференцированные клетки представляют собой гетерогенную смесь различных типов клеток, включая те, которые не являются кардиомиоцитами [21]. Более того, лечебное применение iPSC создает те же проблемы, что и использование ЭСК – возможность развития тератомы и потенциальной реакции иммунного отторжения после трансплантации. В настоящее время исследования iPSCs находятся в предклинической стадии, и методы их получения и использования постепенно совершенствуются.

### Индуцированные кардиомиоциты и прямое репрограммирование фибробластов в кардиомиоциты

Недавно проведенные исследования продемонстрировали, что постнатальные сердечные или дермальные фибробласты могут быть напрямую репрограммированы в клетки, подобные кардиомиоцитам, путем использования трех кардиальных ростовых транскрипционных факторов: Gata4, Mef2c и Tbx5 (GMT) [22]. Более того, фибробласты могут быть легко репрограммированы в кардиомиоциты при использовании экзогенно экспрессируемых генов плюрипотентности, таких как Oct4, Sox2 и Klf4 [23]. Так, Qian и соавт. показали, что после локального применения GMT-ретровируса на мышинной модели ИМ, генетически меченые миоцитоподобные клетки инфильтрировали перинфарктную зону; было подтверждено, что эти клетки являлись потомками сердечных фибробластов [24]. Было также установлено, что доставка GMT *in vivo* уменьшала размер зоны инфаркта и в некоторой степени ослабляла дисфункцию сердца вплоть до 3 месяцев после лигирования коронарной артерии.

Несмотря на впечатляющие результаты, манипулирование с генами выполнялось с использованием вирусных векторов, что является нежелательным в плане безопасности при клиническом применении получаемых клеток.

#### **Стволовые клетки костного мозга: гемопоэтические стволовые клетки и эндотелиальные прогениторные клетки**

Стволовые клетки костного мозга (КМСК) являются наиболее хорошо охарактеризованными стволовыми клетками, как по характеристикам поверхностных антигенов, так и по ростовым качествам *in vitro* и *in vivo*. Многочисленные исследования показали положительный эффект воздействия КМСК на восстановление функции сердца при терапии сердечно-сосудистых заболеваний [25-27]. Недавно проведенный анализ результатов 33 рандомизированных клинических исследований (всего 1765 пациентов с ИМ) показал, что смертность и инвалидность пациентов, подвергавшихся терапии КМСК, незначительно отличается от пациентов, подвергавшихся стандартной терапии. Вместе с тем, терапия КМСК улучшала показатели фракции выброса левого желудочка (LVEF), в течение длительного периода после трансплантации (12-61 месяцев) [28]. Необходимо отметить, что КМСК не являются гомогенной клеточной популяцией, они включают в себя клетки различного происхождения,

такие как гемопоэтические стволовые клетки (ГСК, HSC) и эндотелиальные прогениторные клетки (ЕРС). Было показано, что c-kit<sup>+</sup>/Lin<sup>-</sup> и c-kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>/Lin<sup>-</sup> популяции ГСК улучшают функцию сердца [25, 29]. Кроме того, результаты проведенных клинических исследований (COMPARE-AMI) показали, что CD133<sup>+</sup> ГСК также после трансплантации улучшают функцию левого желудочка [30]. Несмотря на полученные результаты, продолжается полемика по поводу возможной дифференцировки данного типа СК в кардиомиоциты [31, 32].

Эндотелиальные прогениторные клетки (ЕРС) – другая клеточная популяция в составе КМСК – способны дифференцироваться в эндотелиальные клетки. В ряде исследований показан положительный эффект трансплантации ЕРС по улучшению функции поврежденного сердца [33, 34], хотя данный тип СК не дифференцируется в кардиомиоциты после трансплантации [35]. Вероятно, наблюдаемый позитивный эффект можно объяснить ролью ЕРС в стимулировании ангиогенеза и достаточным обеспечением кардиомиоцитов реципиента кислородом, необходимым для их выживания и деления, а также улучшения жизнеспособности новообразованных кардиомиоцитов из эндогенных стволовых клеток сердца через паракринные факторы.

Надо отметить, что дефиниция ЕРС остается не до конца определенной, т.к., отсутствует четкая идентификация маркеров для их выделения, поэтому необходимо проведение дополнительных экспериментов для решения этой проблемы.

#### **Мезенхимальные стволовые клетки (МСК, MSC)**

МСК являются одним из самых удобных для использования типом СК взрослого организма, так как они, с одной стороны, могут быть легко выделены из разнообразных тканей: костного мозга, жировой ткани, пуповинной и периферической крови и еще некоторых источников, а с другой стороны, их достаточно легко размножить в клеточной культуре и при необходимости дифференцировать в различные виды клеток: адипоциты, остеобласты, хондроциты, клетки мышечной (миобласты и кардиомиоциты) и нервной тканей [36-38]. Правда, при системной трансплантации МСК, степень их спонтанной дифференцировки в кардиомиоциты мала [39]. Наиболее важным терапевтическим



ким эффектом трансплантации МСК при ИМ является их паракринный эффект. МСК секретируют многочисленные цитокины и ростовые факторы, стимулирующие выживание, рост и дифференцировку других клеток в зоне ИМ, включая резидентные сердечные СК [40]. Более того, МСК являются иммунопривилегированными клетками [41], следовательно аллогенные МСК могут успешно применяться наряду с аутологичными МСК.

В 1999 г. Makino и соавт. получили кардиомиогенную клеточную линию из МСК костного мозга мышей путем обработки МСК 5-азациитидином *in vitro*. Было показано, что в этом случае примерно 30% клеток дифференцировались в кардиомиоциты, экспрессирующие ряд специфических генов и имевшие фенотип, сходный с таковым у фетальных желудочковых кардиомиоцитов [42]. Аналогичные результаты продемонстрировали Tomita и соавт. (1999), вызывавшие криоповреждение миокарда воздействием жидкого азота [43]. Другими исследователями (Davanì и соавт., 2003) было показано, что МСК, наряду с образованием кардиомиоцитов, формировали гладкомышечные и эндотелиальные клетки, что также способствовало улучшению функции сердца [44]. Wang и соавт. выдвинули гипотезу о том, что микроокружение в миокарде создает определенные условия и сигналы для кардиомиогенной дифференцировки МСК [45].

Итак, МСК обладают рядом свойств, которые делают их предпочтительными для трансплантации пациентам, страдающим ИБС: МСК при локальном или системном введении способны к хомингу – миграции в мишенную ткань, в поврежденные участки сердечной мышцы, МСК иммунопривилегированы, апоптоз пересаживаемых МСК ниже, чем у многих других видов СК; МСК способны дифференцироваться в кардиомиоциты, между образующимися из МСК кардиомиоцитами присутствуют вставочные диски со щелевыми контактами для проведения потенциалов возбуждения к пересаженным клеткам от кардиомиоцитов хозяина; трансплантируемые МСК обладают мощным паракринным эффектом.

#### **Скелетные миобласты (СкМ, SkM)**

Хронологически аутологичные скелетные миобласты (СкМ, SkM) были первым типом СК, используемым в ограниченных клинических испытаниях для терапии ИБС. Если плюрипотентные СК, такие как КМСК, потенциаль-

но могут дифференцироваться в фибробласты при трансплантации в постинфарктную фиброзную зону, то СкМ, являясь прямыми предшественниками миоцитов, могут дифференцироваться только в миоциты [46-48]. При их получении и применении отсутствуют сложности этического и иммунологического характера.

СкМ демонстрировали хорошо выраженную резистентность в условиях ишемии [47]. В экспериментах на животных было показано, что трансплантация СкМ приводила к улучшению функции сердца, судя по увеличению фракции выброса левого желудочка [46, 48]. К сожалению, несмотря на позитивный эффект, было убедительно доказано, что трансплантируемые СкМ были неспособны к трансдифференцировке в кардиомиоциты [49]. Более того, проведенные в нескольких европейских клиниках совместные клинические испытания, MAGIC (Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy) показали, что СкМ при пересаживании пациентам с ИБС вызывали серьезные побочные эффекты, а именно – аритмию [50].

#### **Резидентные стволовые клетки сердца (CSC)**

Несколько исследовательских групп идентифицировали ряд популяций резидентных стволовых клеток сердца (CSC), основываясь на различных характерных для СК взрослого организма маркерах.

##### **1. Sca-1+ (Cells Stem Cell Antigen-1) клетки**

Sca-1 является антигеном, используемым для выделения ГСК. Однако, было показано, что Sca-1+ клетки могут быть выделены из сердца взрослого организма и способны подвергаться трансдифференцировке в сокращающиеся кардиомиоциты при культивировании в специфических условиях [51, 52]. Трансплантированные Sca-1+ клетки проявляют хоминг в перинфарктную зону, где дифференцируются в кардиомиоциты, экспрессирующие специфические сердечные маркеры, такие, как Nkx2-5 и GATA4. По результатам Wang и соавторов, трансплантация Sca-1+/CD31<sup>-</sup> популяции CSC приводила на мышинной модели ИМ к улучшению функции левого желудочка, благодаря стимуляции ангиогенеза [53].

##### **2. c-kit<sup>+</sup> клетки**

Клетки c-kit<sup>+</sup> способны дифференцироваться в кардиомиоциты, эндотелиальные клетки и гладкомышечные клетки *in vitro*, и они вносят вклад в регенерацию миокарда после трансплантации *in vivo* [54]. Результаты клинических испытаний SCPIO (Stem Cell Infusion in

Patients with Ischaemic cardiomyopathy) показали, что трансплантация c-kit<sup>+</sup> клеток улучшала функции левого желудочка [55]. Zaruba и соавт. [56] анализировали кардиомиогенный потенциал c-kit<sup>+</sup> CSC, выделенных из нормального неонатального, нормального взрослого и инфарктного взрослого сердца мыши. В неонатальной группе только c-kit<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> субпопуляция клеток демонстрировала выраженную кардиомиогенную активность, но не c-kit<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> или c-kit<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup> субпопуляции клеток из КМ. При этом c-kit<sup>+</sup> клетки из нормального взрослого сердца не подвергались кардиомиогенной дифференцировке ни при совместном культивировании с фетальными кардиомиоцитами, ни при их трансплантации в нормальное или инфарктное сердце взрослой мыши. Полученные данные говорят о том, что в процессе развития организма резидентные c-kit<sup>+</sup> клетки сердца теряют способность приобретать кардиомиогенный фенотип. Эти результаты отличаются от многочисленных предшествующих данных по c-kit<sup>+</sup> клеткам, выделенным из сердца крысы и человека. Сокультивирование данных CPC с кардиомиоцитами или их инъекция в поврежденный миокард приводили к более мощной кардиомиогенной дифференцировке [57, 58].

Заслуживает внимания то, что происхождение c-kit<sup>+</sup> клеток в сердце остается не до конца выясненным. В частности, эксперименты Fazel и соавт. [59] по трансплантации КМ наводят на мысль, что многие из c-kit<sup>+</sup> клеток во взрослом сердце – костномозгового происхождения, ведь, действительно, c-kit экспрессирован не только в CSC, но также и в клеточных популяциях КМ [30].

### 3. Isl-1+ клетки

Isl-1 играет важную роль в развитии различных органов, включая сердце [60]. Laugwitz и соавт. впервые идентифицировали Isl-1+ CSC в постнатальном миокарде мыши, крысы и человека [61]. Дальнейшие исследования показали, что Isl-1 отсутствует во взрослом сердце [62-65]. Недавно было продемонстрировано, что Isl-1+ клетки принимают участие в формировании всех главных типов клеток мышечного сердца [60, 61, 66, 67]. Выделенные Isl-1+ клетки пролиферируют и дифференцируются в кардиомиоциты, гладкомышечные и эндотелиальные клетки после трансплантации [67]. В отличие от Sca-1+ CSC и c-kit+ CSC, Isl-1+ CSC не экспрессируют других маркеров клеточной поверхности.

### 4. SP клетки (Side Population Cells)

SP клетки были выделены с использованием витального красителя (Hoechst 33342 или Rhodamine 123), при добавлении которого клетки, в значительной степени «исключающие» краситель, отсортировывали, получая так называемые «клетки побочной популяции» (side population cells). SP клетки были обнаружены в различных органах, включая КМ, скелетные мышцы, жировую ткань, сердце [68, 69]. SP клетки экспрессируют Sca-1 и могут быть трансдифференцированы в кардиомиоциты, что приводит к улучшению функции левого желудочка при трансплантации [70]. Эти СК экспрессируют Nkx2.5, GATA4 и Mef2c после дифференцировки в кардиомиоциты. SP клетки способны мигрировать к поврежденному участку сердца после возникновения повреждения. В целом, SP клетки являются перспективными для клеточной терапии, но использование токсичного красителя для их получения пока ограничивает применение данных клеток экспериментальными моделями животных.

### 5. CDC клетки (Cardiosphere-Derived Cardiac Cells)

Популяции CSC имеют способность к клоногенности и могут формировать в культуре сфероидные агрегаты, так называемые кардиосферы [71]. CDC клетки – клетки, выделенные из кардиосфер – способны дифференцироваться в эндотелиальные, гладкомышечные клетки, а также в кардиомиоциты [72]. Различные исследования показали, что CDC клетки улучшают функцию левого желудочка [73, 74]. К сожалению, в отличие от других популяций CSC, получение CDC клеток требует достаточно продолжительного времени из-за медленного роста кардиосфер. Кроме того, CDC клетки часто бывают контаминированы другими типами клеток, такими как фибробласты сердца.

### МСК – золотой стандарт клеточной терапии ИБС

Итак, рассмотрев вкратце наиболее интересные для потенциальной регенерации сердца при ИБС типы стволовых клеток, мы считаем необходимым более подробно остановиться на наиболее предпочтительном для клинического применения типе стволовых клеток – мезенхимальных стволовых клетках (МСК), а также на стратегии оптимизации их применения при терапии ИБС.

#### Преимущества МСК

Как отмечено выше, МСК обладают рядом

преимуществ, определяющих их широкое применение как в предклинических, так и в клинических исследованиях по клеточной терапии ИБС. МСК легко выделить и размножить в культуре, они являются иммунопривилегированными клетками, МСК способны дифференцироваться в кардиомиоциты, электрофизиологически идентичные кардиомиоцитам организма-хозяина. Трансплантированные системно или локально, МСК демонстрируют хоминг в поврежденные участки сердца и осуществляют там мощное паракринное действие, секретируя множественные цитокины и ростовые факторы (SDF-1/CXCL12, HGF, IGF-1, bFGF, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, Ang-1, MCP-1, IL-1, IL-6, PIGF, PLAT, TNF- $\alpha$  и др.), влияющие на близлежащие клетки, препятствуя их апоптозу. Также МСК обладают иммуномодуляторным и антифиброзным действием, стимулируют ангиогенез в зоне ишемического повреждения (рис. 2).

#### Клиническое применение МСК

На сегодняшний день доставка МСК при терапии острого ИМ и постинфарктного кардио-

склероза осуществляется путем интракоронарного или интрамиокардиального (на открытом сердце или через эндокардиальный катетер) введения, иногда совместно с ЕРС [75-78].

Возможность быстрого получения клеток в достаточных количествах для трансплантации, а также возможность использования не только аутологических, но и аллогенных МСК для пожилых пациентов с сопутствующими заболеваниями, делает МСК чрезвычайно привлекательными для клеточной терапии. Создание донорского банка МСК от молодых здоровых доноров способно обеспечить надлежащую систему качества клеток и согласованности их приготовления. Примером этого является рандомизированное, основанное на двойном слепом плацебо контроле, исследование 53 пациентов после острого ИМ, которым вводили аллогенные МСК (клеточный препарат Prochymal, Osiris Therapeutics, Inc., Baltimore, Maryland) [79]. Необходимо отметить, что благодаря скорости размножения МСК, от одного донора можно получить до 5000 доз клеток, готовых

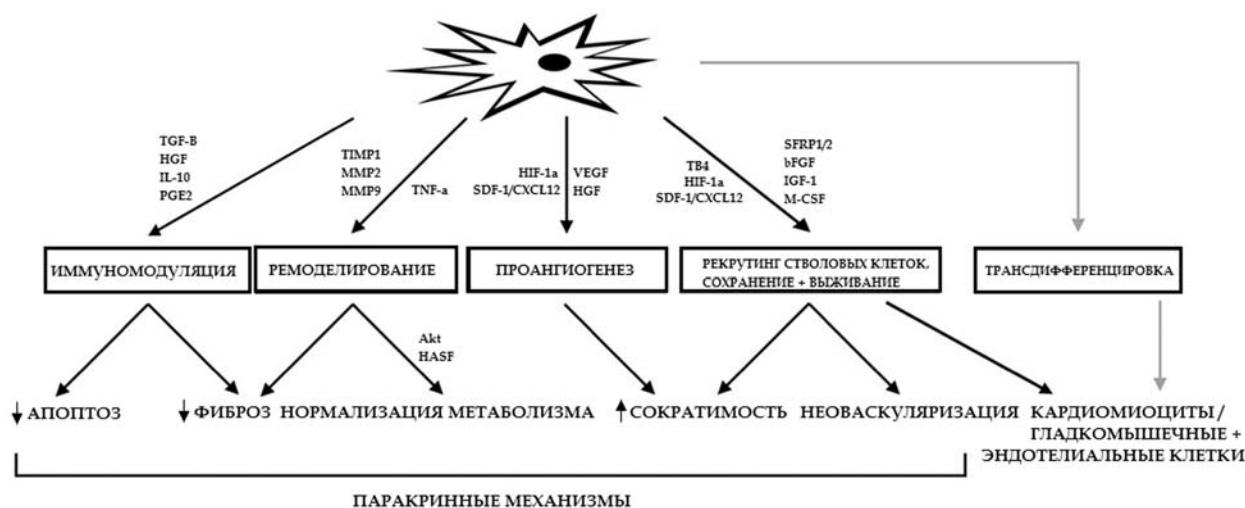


Рис.2. Механизмы действия МСК (по Richardson и соавт., *Optimization of the Cardiovascular Therapeutic Properties of Mesenchymal Stromal/Stem Cells-Taking the Next Step*, Stem Cell Reviews and Reports, Online First, 13 April 2012).

Примечание:

bFGF: основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor);  
 CXCL12: CXC-хемокин лиганд 12 (chemokine (C-X-C motif) ligand 12);  
 HASF: регулируемый гипоксией Akt-опосредованный фактор стволовых клеток (hypoxia regulated Akt mediated stem cell factor);  
 HGF: фактор роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor);  
 HIF-1 $\alpha$ : индуцируемый гипоксией фактор 1 альфа (hypoxia-inducible factor-1 alpha);  
 IGF-1: инсулиноподобный фактор роста 1 (insulin-like growth factor-1);  
 IL-10: интерлейкин-10 (interleukin-10); PGE2: простагландин E2 (prostaglandin E2); TB4: тимозин бета-4 (thymosin beta-4);  
 M-CSF: колониестимулирующий фактор макрофагов (macrophage colony stimulating factor);  
 MMP2 (and MMP9): матриксная металлопротеиназа 2 (и 9) (matrix metalloproteinase 2 (and 9));  
 SDF-1: фактор стромальных клеток 1 (stromal-cell derived factor-1);  
 SFRP-1: секретируемый белок 1 семейства Frizzled (secreted frizzled-related protein 1);  
 TGF- $\beta$ : трансформирующий ростовой фактор бета (transforming growth factor-beta);  
 TIMP1: тканевой ингибитор металлопротеиназ-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1);  
 VEGF: фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor);  
 TNF- $\alpha$ : фактор некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor-alpha).

для использования. МСК вводили внутривенно в течение 10 дней. Пациенты благополучно переносили аллогенный продукт после системного введения [80]. Через 6 месяцев наблюдалось возрастание фракции выброса ЛЖ и инверсия ремоделирования у пациентов, и, более того, редукция аритмии.

Первый опыт в России по интракоронарной и интрамуральной трансплантации МСК в сердце больных постинфарктным кардиосклерозом опубликован научной группой под руководством В.И. Шумакова [81]. У всех 8 пациентов наблюдалось улучшение функционального состояния миокарда, повышение качества жизни, более значимые при интрамиокардиальном введении. Более масштабные исследования были проведены в Медицинском радиологическом научном центре МЗ России (МРНЦ, г. Обнинск) [82]. В данной работе у больных с тяжелой формой хронической сердечной недостаточности (в том числе и после перенесенного ИМ) использовали системную (внутривенную) трансплантацию 150-200 миллионов кардиомиобластов, полученных из МСК аутологичного костного мозга. Было показано, что данный тип клеточной терапии минимально инвазивен, не вызывает каких-либо осложнений (аллергических реакций, жизнеугрожающих аритмий, эмболий, тяжелых гемодинамических расстройств и др.) и не приводит к ухудшению состояния после ее проведения. В первые 3-6 месяцев после системной трансплантации таких клеток-предшественников кардиомиоцитов у пациентов улучшалась сократительная способность миокарда и увеличивалась его перфузия, что клинически проявлялось в уменьшении степени выраженности сердечной недостаточности с дальнейшей длительной стабильной компенсацией (1-2 и более лет наблюдения). Расширение материалов этих клинических исследований и проведение необходимых предклинических исследований на животных по безопасности и эффективности разработанного метода клеточной терапии позволило МРНЦ в 2010 г. получить разрешение Росздравнадзора ФС № 2010/255 на применение новой медицинской технологии клеточной терапии у пациентов с заболеваниями, вызванными повреждениями сердечной мышцы различного генеза.

Тот же тип стволовых клеток (кардиомиобласты, выращенные из МСК аутологического костного мозга) был использован для интрамиокардиального введения в зону повреждения

ткани левого желудочка сердца у больных с постинфарктным кардиосклерозом во время проведения операции коронарного шунтирования в работах, выполненных под руководством академика Р.С. Акчурина в Российском кардиологическом научно-производственном комплексе [83]. Было показано, что такая форма имплантации стволовых клеток в миокард является безопасной, оказывает благоприятное воздействие на процесс ремоделирования левого желудочка и улучшает сократительную функцию миокарда, в сочетании с реваскуляризацией миокарда, что значительно дополняет лечебный эффект проводимого шунтирования.

В настоящее время рядом медицинских компаний проводятся клинические исследования аутологичных и аллогенных МСК для терапии пациентов с ИБС (табл.).

### Модификация МСК *in vitro*

Модификация МСК *in vitro* используется для улучшения их биологических функций, играющих роль при их последующей трансплантации *in vivo*. К таковым относятся: способность к хомингу, выживание в условиях ишемии, пролиферация, синтез паракринных факторов, способность к трансдифференцировке. Рассмотрим подробнее методы, используемые для модификации МСК.

#### 1. Прекондиционирование МСК

В процессе развития ИМ приток крови к части миокарда прерывается и, вследствие этого, кардиомиоциты недополучают кислород, уровень которого падает до 0,2% [84]. Вскоре после этого сочетание остаточной тканевой гипоксии, окислительного стресса, гибели кардиомиоцитов и притока воспалительных клеток создает враждебную среду для потенциально трансплантируемых в поврежденный миокард стволовых клеток. В силу того, что МСК в естественных условиях постоянно находятся в КМ в условиях низкого содержания кислорода (~ 2%) [85], то можно предположить, что МСК должны быть достаточно толерантны к условиям ишемии в инфарктном миокарде. Однако, существуют возможности для еще большего увеличения присущей МСК устойчивости, подвергая их прекондиционированию (предшествующей трансплантации инкубации) с различными факторами. Так, в исследованиях *in vitro* и *in vivo* было показано, что МСК, подвергнутые воздействию гипоксии, продуцируют повышенное количество транскрипцион-



Таблица

**Ведущие клинические исследования трансплантации аутологичных и аллогенных МСК при терапии пациентов с ИБС ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov))**

Заболевание	Тип клеток	Метод доставки	Фаза	Кол-во	Участник, страна
Острый ИМ	Аллогенные МСК	Внутривенное	I	48	Osiris Therapeutics, США (мультицентровое)
Острый ИМ, ФВ 20-45%	Аллогенные МСК	Внутривенное	II	220	Osiris Therapeutics, США (мультицентровое)
Острый ИМ	Аутологичные МСК	Интракоронарное	II/III	80	FCB-Pharmicell Co Ltd, Южная Корея (мультицентровое)
Острый ИМ	Аутологичные МСК	Транс-эндокардиальное	III	50	НИИ патологии кровообращения им. акад. Мешалкина, Россия (одноцентровое)
ИМ с подъемом сегмента ST ФВ 30-50%	Аллогенные МСК	Внутривенное	I/II	20	Stempeutics Research PVT Ltd, Индия (мультицентровое)
Ишемическая кардиомиопатия ФВ 15-45%	Аутологичные МСК	Транс-эндокардиальное	II	60	Финляндия (одноцентровое)
Ишемическая кардиомиопатия ФВ 20-50%	Аутологичные МСК	Транс-эндокардиальное	I/II	60	TAC-HFT, США (одноцентровое)
Ишемическая кардиомиопатия EF 15-50%	Аутологичные МСК	Транс-эпикардиальное	I/II	45	США (мультицентровое)
Ишемическая кардиомиопатия ФВ < 35%	Аутологичные МСК	Транс-эндокардиальное	I/II	10	Франция (одноцентровое)
Ишемическая кардиомиопатия ФВ 20-50%	Аллогенные или аутологичные МСК	Транс-эндокардиальное	I/II	30	POSEIDON-Pilot, США (мультицентровое)
ИБС	Аутологичные МСК	Интрамиокардиальное	I/II	40	Дания (одноцентровое)
ИБС	Аутологичные МСК	Интракоронарное или транс-эндокардиальное	II	60	TCA Cellular Therapy, США (одноцентровое)

ных и ростовых факторов, способствующих выживанию клеток, включая VEGF, HIF-1 $\alpha$ , survivin и Bcl-2, по сравнению с МСК, инкубированными в нормальных условиях [86]. Повышенная выживаемость и функциональные преимущества прекондиционированных в условиях гипоксии МСК были продемонстрированы при их трансплантации на моделях ИМ [84] и диабетической кардиомиопатии [87].

В частности, гипоксическое прекондиционирование может иметь преимущества для улучшения выживаемости клеток через индукцию и

стабилизацию внутриклеточного HIF-1 $\alpha$ , который подвергается ядерной транслокации для связывания с несколькими важными промоторами. Дальнейшая мишень, на которую он может повлиять – глюкозо-6-фосфатный транспортер, который служит для повышения содержания глюкозы в клетках через усиление глюконеогенеза. Кроме того, МСК могут быть прекондиционированы с агентами, вызывающими образование оксида азота [88], с перекисью водорода или с диазоксидом [89] для повышения их выживаемости и паракринного эффекта.

Диазоксид известен как стимулятор открытия митохондриальных АТР-чувствительных калиевых каналов (Mito-KАТР), что, как считается, осуществляет защиту клетки при ишемическом стрессе. Недолгая инкубация МСК с диазоксидом, как было показано, улучшает клеточную резистентность, благодаря повышенному образованию факторов, способствующих выживаемости, а также сигнальных факторов (VEGF, HGF, NF-κB, факторы Akt сигнального пути, microRNA-146a и др.) [89, 90]. На протяжении нескольких десятилетий было известно, что белки теплового шока (HSP) играют ключевую роль в защите клетки от целого ряда экологических стрессовых факторов. Транскрипция белков HSP может быть индуцирована в культивируемых клетках под воздействием гипертермии (например, инкубации в течение 1 часа при 42°C). Это было применено для прекондиционирования скелетных миобластов для увеличения их приживаемости в миокарде *in vivo* [91], в то время как МСК были генетически модифицированы для повышенной экспрессии различных белков HSP перед трансплантацией [92, 93]. Хотя конкретные механизмы действия белков HSP на МСК остаются неопределенными, экспериментальные данные свидетельствуют о том, что эти белки ингибируют регуляторы сигнальных путей некроза и апоптоза, и, в конечном итоге, активируют Akt. Более того, они могут также повышать трофические свойства МСК путем усиления секреции различных растворимых факторов, таких как VEGF, FGF-2 и IGF-1 [92]. Широкий спектр фармакологических препаратов был исследован либо в сочетании с МСК, либо в качестве дополнительной терапии в момент трансплантации клеток (например, статины [94, 95], силденифил [96]), либо как препараты для прекондиционирования клеток. Примеры последнего использования включают применение ингибиторов фосфодиэстеразы [97], модуляторов сигнальных путей ангиотензина [98] и нейропептида Y [99]. Считается, что этим агентам присущи различные механизмы действия. Недавно предположили, что блокада ангиотензина II может усиливать трансдифференцировку человеческих МСК в направлении кардиомиоцитов [98]. Огромная привлекательность использования прекондиционирования обуславливается простотой его выполнения в экспериментальных и клинических условиях. Однако, природа МСК является достаточно сложной, особенно в свете осуществ-

ления транслокации клеток из контролируемого микроокружения в культуре в динамичное и непредсказуемое микроокружение поврежденного сердца. Одной из первоочередных задач в области оптимизации клеточной терапии является расшифровка наиболее важных сигнальных путей, вовлеченных в процессы клеточного выживания и осуществления репаративной функции клетки при трансплантации, поэтому стратегия прекондиционирования должна быть более конкретно направлена на максимальное извлечение предполагаемой в данном контексте пользы.

## **2. Усиление эффекта паракринных факторов**

Как описано выше, значительная часть репаративного потенциала МСК при ИБС связана с продукцией широкого спектра растворимых паракринных факторов. Значительные усилия были направлены на укрепление этого паракринного потенциала с использованием либо методов переноса соответствующих генов, либо преинкубации с агентами, вызывающими повышенную экспрессию цитокинов или ростовых факторов.

VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) является важным регулятором индуцированного МСК васкулогенеза и ангиогенеза [100] и во время гипоксии может повышенно производиться в МСК через индукцию HIF-1α. Преинкубация МСК с TGF-β [101], SDF-1α [102] и липополисахаридами [103], как было также показано, приводит к увеличению клеточной продукции VEGF, сопровождающейся преимуществами для выживания клетки после трансплантации, улучшением ангиогенеза и восстановлением миокарда на моделях ИМ грызунов. Аденовирусная трансфекция крысиных МСК геном человеческого VEGF165 также оказалась успешной «гибридной» стратегией трансплантации клеток и генной терапии для усиления терапевтического ангиогенеза после ИМ [104].

IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста-1) также обладает плеiotропной активностью, влияющей на рост, пролиферацию и выживание клеток, преимущественно путем активации сигнальных путей Akt и MAP-киназы. Прекондиционирование МСК с IGF-1 усиливало хоминг и приживание клеток в миокарде после системного введения и приводило к функциональным преимуществам по сравнению с обычными МСК [105].

Важным компонентом паракринного эффекта МСК является их способность привле-

кать соответствующие клетки, включая кроветворные, эндотелиальные или сердечные прогениторные клетки, к зоне повреждения миокарда. SDF-1 $\alpha$  и его G-белковый трансмембранный рецептор (CXCR4), выполняют ключевую роль в привлечении клеток из КМ в зону инфарктного миокарда [106]. Сразу же после ИМ уровень SDF-1 $\alpha$  в сыворотке крови и в миокарде быстро увеличивается и достигает пика через 48 и 72 часа соответственно, а затем возвращается к базовому уровню. Это способствует хомингу прогениторных клеток в зону повреждения миокарда, включая циркулирующие, проангиогенные CD34<sup>+</sup> клетки, которые способствуют неоваскуляризации. Кроме того, SDF-1 $\alpha$  может также оказывать прямое проангиогенное воздействие, индуцируя экспрессию в клетках HIF-1 $\alpha$  and VEGF [107]. На моделях сердечно-сосудистых заболеваний, механизмами SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 манипулировали различными способами для оказания благотворного влияния на функцию миокарда и перфузию, а также для усиления репаративных свойств трансплантируемых МСК. В одном из исследований на модели ИМ грызунов, SDF-1 $\alpha$  был введен непосредственно в миокард как дополнение к внутривенной инъекции МСК, что привело к большему хомингу и приживлению этих экзогенных клеток в сердце реципиента, причем данный эффект мог быть аннулирован при добавлении функционального блокирующего антитела [108]. Преинкубация МСК с SDF-1 $\alpha$  также демонстрировала промитогенный и антиапоптотический эффекты в процессе инкубации *in vitro* с перекисью водорода и после трансплантации в инфарктный миокард [102]. В последнем случае это сопровождалось уменьшением размеров зоны инфаркта и фиброза, а также улучшением функции сердца, по сравнению с обычными МСК. Аналогичное улучшение свойств МСК наблюдалось и при трансдукции клеток для стабильно повышенной экспрессии SDF-1 $\alpha$  [109]. После трансплантации в сердце, трансдуцированные МСК были более резистентными к апоптозу и лучше приживались, чем немодифицированные МСК, что привело к снижению осаждения коллагена и экспрессии матричных металлопротеиназ. В других предклинических исследованиях использовались МСК, которые гиперэкспрессировали HGF [110] и другие факторы (например, CCR1 [111]) для повышения их терапевтического потенциала.

Дополнительные преимущества были получены при осуществлении двойной трансфекции МСК генами VEGF и SDF-1 $\alpha$  [112].

В настоящее время в рамках программы РАН «Фундаментальные науки – медицине» Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН и МРНЦ Минздрава ведут исследования препарата с выраженными ранозаживляющими свойствами – метапрогерола и его химических аналогов, как возможных лекарственных средств, перспективных для использования в качестве агентов сопровождения трансплантаций МСК и других типов стволовых клеток взрослого организма [113]. Было показано, что введение метапрогерола крысам с индуцированной доксорубицином кардиомиодистрофией на фоне произведенной системной трансплантации МСК, выращенных в культуре клеток крысиного костного мозга, значительно ускоряет восстановление поврежденной сердечной мышцы, превышающее по эффективности введение только одних стволовых клеток. Так как подобный эффект стимуляции регенеративного потенциала был выявлен в экспериментальных моделях и для ряда других типов стволовых клеток взрослого организма (ГСК, частично коммитированные потомки ГСК и стволовые клетки эпителия тонкого кишечника), то это дало возможность предположить, что эффекты метапрогерола реализуются неким общим механизмом, затрагивающим «микроокружение» стволовых клеток, находящихся в стационарном состоянии в так называемых «нишах», и включают стимуляцию продукции ключевых цитокинов и ростовых факторов, которые, возможно, продуцируются местными популяциями МСК, формирующими по преимуществу эти «ниши». Можно надеяться, что на этом пути со временем будут получены лекарственные агенты, которые будут использоваться совместно с трансплантациями стволовых клеток при терапии тяжелых повреждений жизненно важных органов, в том числе – и при поражениях сердечной мышцы различного генеза.

### 3. Активация цитопротекторных путей

Цитокины, описанные выше, осуществляют сложные взаимодействия и функции с различными клеточными и тканевыми субстратами. Значительная часть их способности защищать клетки от гибели регулируется через воздействие на механизмы сигнального пути Akt. Ген Akt кодирует серин-треониновую протеинкина-

зу, которая при активации стимулирует дальнейшие сигнальные пути (например, PI3K/mTOR), и, в конечном результате, ингибирует BAD, белок из семейства Bcl-2, и наоборот, активирует NFκB [114]. Это приводит к ингибированию апоптоза и транскрипции генов, активирующих выживаемость клеток, соответственно [115]. Активация экспрессии гена Akt также, как известно, стимулирует ангиогенез и преодоление состояния ареста клеточного цикла [116]. Соответственно, манипуляции с механизмами сигнального пути Akt в стволовых клетках хорошо расцениваются как средства оптимизации выживания как трансплантируемых клеток, так и клеток сердца и сосудов организма-хозяина. В серии высоко цитируемых статей по фундаментальным и предклиническим исследованиям Dzaui и соавт. продемонстрировали не только то, что репаративные свойства МСК в основном обусловлены паракринным эффектом, но и то, что данные свойства могут быть существенно улучшены путем генетической модификации МСК для гиперэкспрессии Akt [117, 118]. Преимущества Akt-трансфицированных МСК перед нетрансформированными клетками были продемонстрированы *in vivo* не позднее 72 часов после трансплантации в инфарктный миокард крысы. В частности, апоптоз сердечных клеток был сильно ослаблен, приживление МСК было усилено, и было стимулировано образование VEGF, HGF и IGF-1 в миокарде. Впечатляющие результаты были получены даже при использовании только кондиционной среды из-под культур Akt-трансфицированных МСК, что подчеркнуло паракринную основу их цитопротекторных и репаративных свойств. Совсем недавно было также продемонстрировано, что клеточная терапия ИМ с использованием Akt-трансфицированных МСК также сопровождается восстановлением нормальной метаболической функции сердца, с ограниченным использованием высокоэнергетических фосфатов и нормализацией pH миокарда и метаболизма глюкозы [119]. Геномный анализ идентифицировал, что в Akt-трансфицированных МСК повышено содержание белка Sfrp2, ключевого медиатора цитопротекторных паракринных свойств этих клеток [120].

Другой стратегией, используемой для усиления цитопротекторных свойств МСК, является их модификация для гиперэкспрессии интегрин-связанной киназы (ILK) [121] и гемциклооксигеназы-1 (НО-1) [122]. Гемциклоок-

сигеназа-1 энзиматически разрушает гем до билирубина, монооксида углерода и свободного железа и оказывает противовоспалительное, антиоксидантное, антиапоптотическое и проангиогенное действие. Повышенная экспрессия НО-1 в МСК усиливает выживаемость пересаживаемых клеток и улучшает функцию левого желудочка сердца свиньи на модели развития реакции «ишемии-реперфузии» [122].

Итак, описанные выше исследования демонстрируют большие возможности для повышения трофического потенциала МСК, их устойчивости к стрессу и апоптозу, а также для улучшения их способности к осуществлению репарации сердца. Кроме того, они помогли раскрыть многие из критических молекул и сигнальных путей, регулирующих функции стволовых клеток взрослого организма (выживание, пролиферацию и миграцию). На сегодняшний день необходима разработка технологий клинического применения данных стратегических методов. Хотя генетическая модификация МСК и других типов клеток поднимает ряд нормативных вопросов, касающихся безопасности применения клеток, уже были получены некоторые результаты. В настоящее время осуществляются клинические испытания ENACT-AMI (clinicaltrials.gov NCT00936819), в которых пациенты с обширным ИМ подвергаются введению циркулирующих моноклеарных клеток (MNC), трансфицированных геном человеческой эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) [123]. В другом клиническом испытании, MESAMI II, основанном на предклинических результатах, полученных на модели грызунов [124], исследуются МСК, preconditionированные с мелатонином, при терапии пациентов с рефрактерной хронической ишемической кардиомиопатией.

#### **4. Повышение кардиомиогенного потенциала МСК**

Предпринимаются также усилия для повышения потенциала МСК в направлении их кардиомиогенной дифференцировки. Как упоминалось ранее, первоначальные попытки верифицировать, а затем и манипулировать кардиомиогенным потенциалом МСК, были сосредоточены на использовании ингибитора ДНК-метилтрансферазы, 5-азацитидина [42]. Хотя этот неспецифический агент может способствовать умеренной трансдифференцировке МСК в кардиомициты, его действие было менее воспроизводимо на МСК человека, чем на МСК мыши [42]. Кроме того, preconditionи-



рование с 5-азациитидином может оказывать генотоксический эффект на клетки, имеющий последствия для их безопасной трансплантации *in vivo*. Прекондиционированные МСК также оказываются в состоянии ареста клеточного цикла, тем самым теряя репликативный потенциал, требуемый им для осуществления репопуляции кардиомиоцитов.

Другая стратегия заключается в направленном кардиопоэзе МСК. Кардиопоэтическое программирование было разработано как метод модификации ЭСК, подвергая их экспозиции с комбинацией специфических рекомбинантных факторов, присутствующих обычно в эмбриональной среде, с целью повышения их кардиомиогенного регенеративного потенциала [125]. Были установлены важные механизмы дифференцировки в кардиомиоциты, в которых были задействованы члены  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{TGF-}\beta$  и  $\text{FGF}$  семейств, идентифицированные как важнейшие регуляторы кардиопоэза стволовых клеток, в комбинации друг с другом способные репрограммировать ЭСК в кардиомиоциты без риска образования опухоли [126].

Недавно принцип направленного кардиопоэза был распространен и на МСК из КМ человека [127]. При проведении скрининга пациентов с ИБС была идентифицирована редкая субпопуляция пациентов, у которых МСК демонстрировали спонтанную способность улучшать сократительную функцию миокарда, наряду с высокой экспрессией *de novo* ранних и поздних транскрипционных факторов сердца (например,  $\text{Nkx2.5}$ ,  $\text{TBX5}$ ,  $\text{MESP1}$ ,  $\text{MEFC2}$ ). Эти клетки были подвергнуты воздействию комбинации из рекомбинантных факторов, состоящей из  $\text{TGF-}\beta 1$ ,  $\text{BMP4}$ ,  $\text{activin A}$ , ретиноевой кислоты,  $\text{IGF-1}$ ,  $\text{FGF-2}$ , альфа-тромбина и интерлейкина-6, которые консолидировали кардиоспецифический потенциал МСК. На модели мышинного ИМ, переведенного в хроническую фазу поражения сердечной мышцы, доставка кардиопоэтических МСК, по сравнению с неизмененными МСК, позволила получить устойчивые функциональные и структурные преимущества без всяких неблагоприятных последствий. Это было связано с более высокой степенью удержания МСК в миокарде, их большей трансформацией *in vivo* в кардиомиоциты, и большей паракринной стимуляции эндогенных  $\text{c-kit}^+$  стволовых клеток сердца (CSC).

Эта работа была продолжена уже в виде клинических исследований в Европе, в кото-

рых использовались кардиопоэтические МСК для терапии пациентов с хронической ишемической кардиомиопатией [128]. Кардиопоэтические МСК ( $0,6-1,2 \times 10^9$ ) были трансэндокардиально трансплантированы 21 пациенту в жизнеспособный, дисфункциональный миокард ЛЖ. В среднем, чуть ранее года, фракция выброса ЛЖ в большей степени увеличилась у реципиентов МСК по сравнению с контрольной группой (абсолютное увеличение на 5,2% при 1% в контроле), а также наблюдали улучшение функционального состояния (по результатам 6-минутной ходьбы) и уменьшение эпизодов аритмии в группе клеточной терапии.

### МикроРНК и кардиомиогенная дифференцировка МСК

В последние годы было обнаружено, что в процессах самообновления и дифференцировки МСК активную роль играют микроРНК [129, 130]. МикроРНК (miRNAs) – эндогенные, некодирующие молекулы РНК, длиной 20-23 нуклеотидов, негативно регулирующие экспрессию генов в различных биологических и патологических процессах, включая дифференцировку клеток, их пролиферацию, апоптоз, при заболеваниях сердца, неврологических расстройствах и раке у человека [131-135]. МикроРНК участвуют в регулировании МСК на разных стадиях развития данного типа клеток. В целом, механизмы экспрессии микро РНК отличаются у недифференцированных МСК и у полностью дифференцированных клеток, например, остеобластов, адипоцитов и хондроцитов, что предполагает значимость микроРНК на стадии принятия решения о дифференцировке МСК. Действительно, низкий или, наоборот, высокий уровень экспрессии той или иной микроРНК может быть предварительным определяющим условием для коммитированности и дифференцировки МСК в специфические линии клеток, как было продемонстрировано исследованиями Guo и соавторов [136]. Например, было продемонстрировано, что пониженный уровень экспрессии miR-138 ассоциируется с остеогенной [137] и адипогенной [138] дифференцировкой человеческих МСК. Другие микроРНК, miR-204/211 и miR-637 контролируют баланс между дифференцировкой МСК в адипоциты и остеобласты [139, 140]. Крайне интересно, что такие микроРНК, как miR-1, -206, -24 и -181 могут индуцировать дифференцировку МСК в кардиомиоциты *in*

*in vitro*. В присутствии 5-азациитидина экспрессируются miR-143 и miR-181, а не прямое сокультивирование МСК с неонатальными крысиными миоцитами приводит к повышению экспрессии miR-143, -206, -208 и -181 [141]. В то же время, miR-133 может блокировать эту дифференцировку [136].

Более того, Liu и соавт. (2012) недавно продемонстрировали, что miR-16 вовлечена в миогенную дифференцировку человеческих МСК в кардиальном микроокружении (нише резидентных стволовых клеток сердца) [142].

Гиперэкспрессия miR-16 значительно увеличивала задержку человеческих МСК в G1-фазе клеточного цикла и усиливала экспрессию маркерных генов сердечной ткани: GATA4, Nkx2-5, MEF2C и TNNI3, а в итоге индуцировала дифференцировку МСК в кардиомициты в кардиальном микроокружении. Использование miR-16 может быть перспективным подходом для премодификации МСК перед их трансплантацией пациентам с ИБС.

#### **Оптимизация доставки МСК**

Важнейшее требование эффективной репарации миокарда – чтобы достаточное количество жизнеспособных МСК могло достичь соответствующих локальных мишеней вскоре после трансплантации и сохраняться там в течение длительного времени, эффективно приживаясь, пролиферируя и функционируя.

Клетки могут быть введены в сердце: 1) системно периферической венозной инъекцией, 2) регионально, инфузией в коронарную артерию или вену, 3) локально, прямой трансэпикардимальной, трансэндокардимальной или интраперикардимальной имплантацией. К сожалению, несмотря на некоторые различия в эффективности этих методов доставки клеток, в настоящее время сохранение МСК и их приживание в миокарде остается недостаточно совершенным во всех случаях [143].

Рентгеноскопически контролируемая интракоронарная инфузия является одним из самых распространенных методов, применяемых в клинической клеточной терапии. Этот метод используется с целью распространения клеток в зоне пострадавшей ишемической артерии [144-146]. Его преимущества включают в себя низкую стоимость, минимальную инвазивность, относительно кратковременную продолжительность и возможность немедленного осуществления при первичном чрескожном коронарном вмешательстве при терапии острого

ИМ. Но использование данного метода имеет потенциальный риск агрегирования адгезивных МСК внутри коронарных микрососудов [147-149]. Введение МСК интрамиокардимальной инъекцией – открытой трансэпикардимальной или трансэндокардимальной, чрескожной с помощью катетера, доставляет МСК в специфические зоны миокарда более направленно. Такая прямая инъекция МСК, видимо, имеет преимущества по сравнению с системной и интракоронарной доставкой, касающиеся сохранения сердечных клеток [150], захвата нерезидентных клеток [148] и общего терапевтического эффекта [151]. При этом существует некоторый потенциальный риск создания очагов электрофизиологической неоднородности и аритмии. Однако, такие осложнения не являются характерными для МСК, а во многом специфичны для скелетных миоцитов [152]. Хотя сохранение клеток и их распределение является похожим для трансэндокардимальной и трансэпикардимальной инъекций [153], чрескожная доставка менее инвазивна и поэтому, возможно, имеет более широкие перспективы клинического применения [154].

#### **Заключение**

Использование терапии стволовыми клетками является захватывающей и динамичной областью исследований, с огромным потенциалом улучшения состояния пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, которые являются в развитых странах основной причиной смерти. В то время, как на животных моделях всесторонне показаны преимущества данной терапии для улучшения сердечной функции после инфаркта миокарда и ишемической сердечной недостаточности, результаты клинических испытаний, в ряде случаев, были разочаровывающими. Однако, результаты проводимых в последнее десятилетие клинических исследований обнадеживают в плане возможности достаточно быстрого создания и широкого использования эффективной и безопасной медицинской технологии, основанной на трансплантации кардиологическим пациентам стволовых клеток, т.е. на реализации методов и подходов регенеративной медицины. Накопленные результаты позволяют надеяться на хорошие перспективы терапевтического применения СК, и, в особенности, аутологичных и аллогенных МСК, как наиболее изученных и безопасных из СК. Безусловно, необходимо дополнительное усоч-

вершенствование методов выделения и идентификации МСК, изучение молекулярных механизмов реализации их паракринного действия, а также возможностей приживаемости, пролиферации и дифференцировки клеток в миокар-

де, разработка методов preconditionирования, применения лекарственных средств сопровождения трансплантации стволовых клеток и других воздействий, способных повысить лечебный эффект клеточной терапии.

#### Информация об авторах:

Конопляников Михаил Анатольевич – заведующий лабораторией клеточных технологий ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, к.б.н. e-mail: mkonopl@mail.ru

Кальсин Владимир Александрович – научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ ФНКЦ ФМБА России

Аверьянов Александр Вячеславович – заместитель генерального директора по научной работе ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, д.м.н. Тел. +7 (495) 395-0511, averyanovav@mail.ru

#### Литература

1. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: Systematic analysis of population health data. Lancet 2006; 367: 1747 - 57.

2. Diwan A, Dorn GW 2nd. Decompensation of cardiac hypertrophy: Cellular mechanisms and novel therapeutic targets. Physiology (Bethesda) 2007; 22: 56 - 64.

3. Diwan A, Krenz M, Syed FM, Wansapura J, Ren X, Koesters AG, et al. Inhibition of ischemic cardiomyocyte apoptosis through targeted ablation of bnip3 restrains postinfarction remodeling in mice. J Clin Invest 2007; 117: 2825 - 2833.

4. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: A systematic review and meta-analysis. Arch Intern Med 2007; 167: 989 - 997.

5. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. Physiol Rev 2005; 85: 1373 - 1416.

6. Borchardt T, Braun T. Cardiovascular regeneration in non-mammalian model systems: What are the differences between newts and man? Thromb Haemost 2007; 98: 311 - 318.

7. Poss KD. Getting to the heart of regeneration in zebrafish. Semin Cell Dev Biol 2007; 18: 36 - 45.

8. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. Science 2009; 324: 98 - 102.

9. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. N Engl J Med 2001; 344: 1750 - 1757.

10. Ahuja P, Sdek P, MacLellan WR. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. Physiol Rev 2007; 87: 521 - 544.

11. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: Emergence of a new era in biology and medicine. Genes Dev 2005; 19: 1129 - 1155.

12. Mignone JL, Kreutziger KL, Paige SL, Murry CE. Cardiogenesis from human embryonic stem cells. Circ J 2010; 74: 2517 - 26.

13. Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: Role of co-culture with visceral endoderm-like cells. Circulation 2003; 107: 2733 - 2740.

14. Xue T, Cho HC, Akar FG, Tsang SY, Jones SP, Marban E, et al. Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: Insights into the development of cell-based pacemakers. Circulation 2005; 111: 11 - 20.

15. Caspi O, Huber I, Kehat I, Habib M, Arbel G, Gepstein A, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. J Am Coll Cardiol 2007; 50: 1884 - 93.

16. Mignone JL, Kreutziger KL, Paige SL, Murry CE. Cardiogenesis from human embryonic stem cells. Circ J 2010; 74: 2517 - 26.

17. Condorelli G, Catalucci D. Human stem cells for heart failure treatment ready for prime time? J Am Coll Cardiol 2007; 50: 1894 - 95.

18. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006; 126: 663 - 76.

19. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. Circ Res 2009; 104: e30 - e41.

20. Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, Perez-Terzic C, Ikeda Y, Terzic A. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2009; 120: 408 - 416.
21. Yoshida Y, Yamanaka S. IPS cells: A source of cardiac regeneration. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 50: 327 - 32.
22. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142: 375 - 86.
23. Efe JA, Hilcove S, Kim J, Zhou H, Ouyang K, Wang G, et al. Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 215 - 22.
24. Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 2012; 485(7400): 593-8.
25. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10344 - 49.
26. Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 2005; 115: 326 - 38.
27. Kajstura J, Rota M, Whang B, Cascapera S, Hosoda T, Bearzi C, et al. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res* 2005; 96: 127 - 137.
28. Clifford DM, Fisher SA, Brunskill SJ, et al. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 2: CD006536.
29. Templin C, Kotlarz D, Faulhaber J, Schnabel S, Grote K, Salguero G, et al. Ex vivo expanded hematopoietic progenitor cells improve cardiac function after myocardial infarction: Role of beta-catenin transduction and cell dose. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45: 394 - 403.
30. Mansour S, Roy DC, Bouchard V, Nguyen BK, Stevens LM, Gobeil F, et al. COMPARE-AMI trial: Comparison of intracoronary injection of CD133+ bone marrow stem cells to placebo in patients after acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction: Study rationale and design. *J Cardiovasc Transl Res* 2010; 3: 153 - 59.
31. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004; 428: 668 - 73.
32. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428: 664 - 668.
33. Jujo K, Li M, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45: 530 - 44.
34. Leone AM, Rutella S, Giannico MB, Perfetti M, Zacccone V, Brugaletta S, et al. Effect of intensive vs standard statin therapy on endothelial progenitor cells and left ventricular function in patients with acute myocardial infarction: Statins for Regeneration after Acute myocardial infarction and PCI (STRAP) trial. *Int J Cardiol* 2008; 130: 457 - 62.
35. Gruh I, Beilner J, Blomer U, Schmiedl A, Schmidt-Richter I, Kruse ML, et al. No evidence of transdifferentiation of human endothelial progenitor cells into cardiomyocytes after coculture with neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation* 2006; 113: 1326 - 34.
36. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 568 - 584.
37. Xu X, Xu Z, Xu Y, Cui G. Selective down-regulation of extracellular matrix gene expression by bone marrow derived stem cell transplantation into infarcted myocardium. *Circ J* 2005; 69: 1275 - 83.
38. Xu H, Yang YJ, Qian HY, Tang YD, Wang H, Zhang Q. Rosuvastatin treatment activates JAK-STAT pathway and increases efficacy of allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in infarcted hearts. *Circ J* 2011; 75: 1476 - 85.
39. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 11474 - 79.
40. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; 98: 1076 - 84.
41. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105: 1815 - 22.
42. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999; 103(5): 697-705.
43. Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100 (19 Suppl): II247-256.
44. Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, et al. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation* 2003; 108 Suppl 1: II253-258.
45. Wang J-S., Shum-Tim D., Chedrawy E. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: the impor-



tance of microenvironment for milieu dependent differentiation. *Circulation* 2000; 102: II-683.

46. Menasche P. Skeletal myoblasts as a therapeutic agent. *Prog Cardiovasc Dis* 2007; 50: 7 - 17.

47. Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Wetzel K, Edge AS, Jacoby DB, et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia damaged myocardium in humans: Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 879 - 88.

48. Ghostine S, Carrion C, Souza LC, Richard P, Bruneval P, Vilquin JT, et al. Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation* 2002; 106: I131 - I136.

49. Reinecke H, Poppa V, Murry CE. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 241 - 49.

50. Eisen HJ. Skeletal myoblast transplantation: No magic bullet for ischemic cardiomyopathy. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008; 5: 520 - 21.

51. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12313 - 18.

52. Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, et al. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2004; 279: 11384 - 91.

53. Wang X, Hu Q, Nakamura Y, Lee J, Zhang G, From AH, et al. The role of the Sca-1+/CD31? cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells* 2006; 24: 1779 - 88.

54. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114: 763 - 76.

55. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): Initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 2011; 378: 1847 - 57.

56. Zaruba MM, Soonpaa M, Reuter S, Field LJ. Cardiomyogenic potential of c-kit(+)-expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts. *Circulation* 2010; 121: 1992 - 2000.

57. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114: 763-776.

58. Dawn B, Stein AB, Urbanek K, Rota M, et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium,

and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 3766-71.

59. Fazel S, Cimini M, Chen L, Li S, Angoulvant D, Fedak P, et al. Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest* 2006; 116: 1865 - 77.

60. Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 2003; 5: 877 - 89.

61. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, et al. Postnatal Isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005; 433: 647 - 53.

62. Chien KR, Domian IJ, Parker KK. Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine. *Science* 2008; 322: 1494 - 97.

63. Laugwitz KL, Moretti A, Caron L, Nakano A, Chien KR. Islet1 cardiovascular progenitors: A single source for heart lineages? *Development* 2008; 135: 193 - 205.

64. Martin-Puig S, Wang Z, Chien KR. Lives of a heart cell: Tracing the origins of cardiac progenitors. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 320 - 31.

65. Wu SM, Chien KR, Mummery C. Origins and fates of cardiovascular progenitor cells. *Cell* 2008; 132: 537 - 43.

66. Kattman SJ, Huber TL, Keller GM. Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell* 2006; 11: 723 - 732.

67. Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y, et al. Multipotent embryonic Isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 2006; 127: 1151 - 65.

68. Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: The SP phenotype. *Stem Cells* 2006; 24: 3 - 12.

69. Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, et al. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 2004; 265: 262 - 75.

70. Oyama T, Nagai T, Wada H, Naito AT, Matsuura K, Iwanaga K, et al. Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *J Cell Biol* 2007; 176: 329 - 41.

71. Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004; 95: 911 - 921.

72. Takehara N, Tsutsumi Y, Tateishi K, Ogata T, Tanaka H, Ueyama T, et al. Controlled delivery of basic fibroblast growth factor promotes human cardios-

phere-derived cell engraftment to enhance cardiac repair for chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1858 - 65.

73. Dawn B, Stein AB, Urbanek K, Rota M, Whang B, Rastaldo R, et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3766 - 71.

74. Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, et al. Regenerative potential of cardiophere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 2007; 115: 896 - 908.

75. Katriotis D.G., Sotiropoulou P.A., Karvouni E., et al. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheterization and Cardiovasc Interv* 2005; 65: 321-29.

76. Yang Z., Zhang F., Ma W., et al. A novel approach to transplanting bone marrow stem cells to repair human myocardial infarction: Delivery via a noninfarct-related artery. *Cardiovasc Ther* 2010; 28: 380-85.

77. Chen S., Liu Z., Tian N., et al. Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. *J Invasive Cardiol* 2006; 18: 552-6.

78. Katriotis D.G., Sotiropoulou P., Giazitzoglou E., Karvouni E., Papamichail M. Electrophysiological effects of intracoronary transplantation of autologous mesenchymal and endothelial progenitor cells. *Europace* 2007; 9: 167-71.

79. Williams A.R., Trachtenberg B., Velazquez D.L., et al. Intramyocardial stem cell injection in patients with ischemic cardiomyopathy: Functional recovery and reverse remodeling. *Circ Res* 2011; 108: 792-96.

80. Hare J.M., Traverse J.H., Henry T.D., et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 2277- 86.

81. Fischer U.M., Harting M.T., Jimenez F., et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: The pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev* 2009; 18: 683-92.

82. Цыб А.Ф., Коноплияников А.Г., Каплан М.А., Поповкина О.Е. и др., Использование системной трансплантации кардиомиобластов, полученных из мезенхимальных стволовых клеток аутологичного костного мозга, при комплексной терапии больных с хронической сердечной недостаточностью. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2009; 4 (1): 78-84.

83. Акчурин Р.С., Белявская Т.М., Скридлевская Е.А., Коноплияников А.Г. и др. Трансплантация аутологичных стволовых клеток во время операции коронарного шунтирования у больных ишемической болезнью сердца с постинфарктным кардиосклерозом и хронической сердечной недостаточностью. *Грудная и сердечно-сосудистая хирургия* 2009; 51(4): 23-28.

84. Khan M., Kwiatkowski P., Rivera B.K., Kuppusamy P. Oxygen and oxygenation in stem-cell therapy for myocardial infarction. *Life Sci* 2010; 87: 269-74.

85. Kofoed H., Sjøtoft E., Siemssen S.O., Olesen H.P. Bone marrow circulation after osteotomy. Blood flow, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, and pressure studied in dogs. *Acta Orthop Scand* 1985; 56: 400-403.

86. Hu X., Yu S. P., Fraser J.L., et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135: 799-808.

87. Li J. H., Zhang N., Wang, J.A. Improved anti-apoptotic and anti-remodeling potency of bone marrow mesenchymal stem cells by anoxic pre-conditioning in diabetic cardiomyopathy. *J Endocrinol Invest* 2008; 31: 103-110.

88. Rebelatto C. K., Aguiar A.M., Senegaglia A.C., et al. Expression of cardiac function genes in adult stem cells is increased by treatment with nitric oxide agents. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 378: 456-61.

89. Afzal MR, Haider HKh, Idris NM, Jiang S, Ahmed RP, Ashraf M. Pre-conditioning promotes survival and angiomyogenic potential of mesenchymal stem cells in the infarcted heart via NF-kappaB signaling. *Antioxid Redox Signal* 2010; 12: 693-702.

90. Suzuki Y, Kim HW, Ashraf M, Haider HKh. Diazoxide potentiates mesenchymal stem cell survival via NFkappaB- dependent miR-146a expression by targeting Fas. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299: H1077- 82.

91. Suzuki K., Smolenski R.T., Jayakumar J., Murtuza B. et al. Heat shock treatment enhances graft cell survival in skeletal myoblast transplantation to the heart. *Circulation* 2000; 102 (19 Suppl 3): III216-III221.

92. Wang X., Zhao T., Huang W., et al. Hsp20-engineered mesenchymal stem cells are resistant to oxidative stress via enhanced activation of Akt and increased secretion of growth factors. *Stem Cells* 2009; 27: 3021-31.

93. Chang W., Song B-W., Lim S., et al. Mesenchymal stem cells pretreated with delivered Hph-1-Hsp70 protein are protected from hypoxia-mediated cell death and rescue heart functions from myocardial injury. *Stem Cells* 2008; 27: 2283-92.

94. Yang Y.J., Qian H.Y., Huang J., et al. Combined therapy with simvastatin and bone marrow-derived mesenchymal stem cells increases benefits in infarcted swine hearts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 2076-82.
95. Yang Y., Mou Y., Hu S.J., & Fu, M. Beneficial effect of rosuvastatin on cardiac dysfunction is associated with alterations in calcium-regulatory proteins. *Eur J Heart Fail* 2009; 11: 6-13.
96. Lin Y.C., Leu S., Sun, C.K., et al. Early combined treatment with sildenafil and adipose-derived mesenchymal stem cells preserves heart function in rat dilated cardiomyopathy. *J Transl Med* 2010; 8: 88.
97. Haider H., Lee Y.J., Jiang S., Ahmed R.P., Ryon, M., & Ashraf, M. Phosphodiesterase inhibition with tadalafil provides longer and sustained protection of stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299: H1395-H1404.
98. Numasawa Y., Kimura T., Miyoshi S., et al. Treatment of human mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blocker improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and improved cardiac function via angiogenesis. *Stem Cells* 2011; 29: 1405-14.
99. Wang Y., Zhang D., Ashraf M., et al. Combining neuropeptide Y and mesenchymal stem cells reverses remodeling after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298: H275 - 86.
100. Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004; 109: 1543-49.
101. Herrmann J. L., Wang Y., Abarbanell A.M., et al. Pre-conditioning mesenchymal stem cells with transforming growth factor- $\alpha$  improves mesenchymal stem cell-mediated cardioprotection. *Shock* 2010; 33: 24-30.
102. Pasha Z., Wang Y., Sheikh R., Zhang D., et al. Pre-conditioning enhances cell survival and differentiation of stem cells during transplantation in infarcted myocardium. *Cardiovasc Res* 2008; 77: 134-42.
103. Yao Y., Zhang F., Wang L., et al. Lipopolysaccharide pre-conditioning enhances the efficacy of mesenchymal stem cells transplantation in a rat model of acute myocardial infarction. *J Biomed Sci* 2009; 16: 74-84.
104. Matsumoto R., Omura T., Yoshiyama M., et al. Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1168-73.
105. Guo J., Lin G., Bao C., Hu Z., Chu H., Hu M. Insulin-like growth factor 1 improves the efficacy of mesenchymal stem cells transplantation in a rat model of myocardial infarction. *J Biomed Sci* 2008; 15: 89-97.
106. Abbott J.D., Huang Y., Liu D., Hickey R., et al. Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 2004; 110: 3300-305.
107. Kijowski J., Baj-Krzyworzeka M., Majka M., et al. The SDF-1-CXCR4 axis stimulates VEGF secretion and activates integrins but does not affect proliferation and survival in lymphohematopoietic cells. *Stem Cells* 2001; 19: 453-66.
108. Zhuang Y., Chen X., Xu M., et al. Chemokine stromal cell-derived factor 1/CXCL12 increases homing of mesenchymal stem cells to injured myocardium and neovascularization following myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)*. 2009 Jan 20;122(2):183-7.
109. Tang J., Wang J., Guo L., et al. Mesenchymal stem cells modified with stromal cell-derived factor 1  $\alpha$  improve cardiac remodeling via paracrine activation of hepatocyte growth factor in a rat model of myocardial infarction. *Mol Cells* 2010; 29: 9-19.
110. Guo Y.H., He J. G., Wu J.L., et al. Hepatocyte growth factor and granulocyte colony-stimulating factor form a combined neovasculogenic therapy for ischemic cardiomyopathy. *Cytotherapy* 2008; 10: 857-67.
111. Huang J., Zhang Z., Guo J., et al. Genetic modification of mesenchymal stem cells overexpressing CCR1 increases cell viability, migration, engraftment, and capillary density in the injured myocardium. *Circ Res* 2010; 106, 1753-62.
112. Tang J., Wang J., Zheng F., et al. Combination of chemokine and angiogenic factor genes and mesenchymal stem cells could enhance angiogenesis and improve cardiac function after acute myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem* 2010; 339: 107-18.
113. Крышталь Г.В., Жданкина Г.М., Коноплянников А.Г., Тартаковский В.А. и др. Синтез аналогов метапрогерола. *Известия Академии наук. Серия химическая* 2012; 76 (2): 253-258.
114. Franke T.F., Kaplan D.R., Cantley L. C. PI3K: Downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 1997; 88: 435-437.
115. Datta S.R., Brunet A., Greenberg M.E. Cellular survival: A play in three Akts. *Genes Dev* 1999; 13: 2905-27.
116. Somanath P.R., Razorenova O.V., Chen J., Byzova T.V. Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle* 2006; 5: 512-18.
117. Gneccchi M., He H., Liang O.D., et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 2005; 11: 367-68.
118. Gneccchi M., He H., Noiseux N., et al. Evidence

supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 2006; 20: 661-9.

119. Gneccchi M., He H., Melo L.G., et al. Early beneficial effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing Akt on cardiac metabolism after myocardial infarction. *Stem Cells* 2009; 27: 971-79.

120. Mirotsoy M., Zhang Z., Deb A., et al. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 1643-48.

121. Song S.W., Chang W., Song B.W., et al. Integrin-linked kinase is required in hypoxic mesenchymal stem cells for strengthening cell adhesion to ischemic myocardium. *Stem Cells* 2009; 27: 1358-65.

122. Jiang Y., Chen L., Tang Y., et al. HO-1 gene overexpression enhances the beneficial effects of superparamagnetic iron oxide labeled bone marrow stromal cells transplantation in swine hearts underwent ischemia/reperfusion: An MRI study. *Basic Res Cardiol* 2010; 105: 431-42.

123. Taljaard M., Ward M.R., Kutryk M. J., et al. Rationale and design of Enhanced Angiogenic Cell Therapy in Acute Myocardial Infarction (ENACT-AMI): The first randomized placebo-controlled trial of enhanced progenitor cell therapy for acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2010; 159: 354-60.

124. Mias C., Trouche E., Seguelas M.H., et al. Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney. *Stem Cells* 2008; 26: 1749-57.

125. Behfar A., Zingman L.V., Hodgson, D. M., et al. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J* 2002; 16: 1558-66.

126. Behfar A., Perez-Terzic C., Faustino R.S., et al. Cardiopoietic programming of embryonic stem cells for tumor free heart repair. *J Exp Med* 2007; 204: 405-20.

127. Behfar A., Yamada S., Crespo-Diaz R., et al. (2010). Guided cardiopoiesis enhances therapeutic benefit of bone marrow human mesenchymal stem cells in chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: 721-34.

128. Bartunek J., Wijns W., Dolatabadi D., et al. C-cure multicenter trial: Lineage specific bone marrow derived cardiopoietic mesenchymal stem cells for the treatment of ischaemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57: E200.

129. Lakshmipathy U, Hart RP. Concise review: MicroRNA expression in multipotent mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 2008; 26 (2): 356-63.

130. Valtieri M, Sorrentino A. The mesenchymal

stromal cell contribution to homeostasis. *J Cell Physiol* 2008; 217 (2): 296-300.

131. Karp X, Ambros V. Developmental biology: encountering microRNAs in cell fate signaling. *Science* 2005; 310 (5752): 1288-9.

132. Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 2006; 11 (4): 441-50.

133. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103 (48): 18255-60.

134. Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, et al. A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* 2007; 317 (5842): 1220-4.

135. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6 (11): 857-66.

136. Guo L, Zhao RC, Wu Y. The role of miRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2011; 39 (6): 608-16.

137. Eskildsen T, Taipaleenmäki H, Stenvang J, Abdallah BM, et al. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 6139-44.

138. Yang Z, Bian C, Zhou H, Huang S, et al. MicroRNA hsa-miR-138 inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells through adenovirus EID-1. *Stem Cells Dev* 2011; 20: 259-67.

139. Huang J., Zhao L., Xing L., Chen D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells* 2010. 28: 357-64.

140. Zhang JF, Fu WM, He ML, et al. MiR-637 maintains the balance between adipocytes and osteoblasts by directly targeting Osterix. *Mol Biol Cell* 2011; 22: 3955-61.

141. Shan ZX, Lin QX, Yu XY, et al. [MicroRNAs can be expressed in cardiomyocyte-like cells differentiated from human mesenchymal stem cells]. [Article in Chinese] *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2007; 27: 1813-16.

142. Liu JL, Jiang L, Lin QX, Deng CY, Mai LP, Zhu JN, Li XH, Yu XY, Lin SG, Shan ZX. MicroRNA 16 enhances differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a cardiac niche toward myogenic phenotypes *in vitro*. *Life Sci* 2012; 90 (25-26): 1020-6.

143. Psaltis P. J., Simari R. D., Rodriguez-Porcel M. Emerging roles for integrated imaging modalities in cardiovascular cell-based therapeutics: A clinical perspective.



Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2012 Jan; 39(1): 165-81.

144. Lunde K., Solheim S., Aakhus S., et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *New Eng J Med* 2006; 355: 1199-1209.

145. Schachinger V., Erbs S., Elsasser A., et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *New Eng J Med* 2006; 355: 1210-21.

146. Traverse J.H., Henry T.D., Ellis S.G., et al. Effect of intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks following acute myocardial infarction on left ventricular function: The LateTIME randomized trial. *JAMA* 2011; 306: 2110-19.

147. Vulliet P.R., Greeley M., Halloran S.M., MacDonald K.A., Kittleson M.D. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 2004; 363: 783-784.

148. Freyman T., Polin G., Osman H., et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006; 27: 1114-22.

149. Ly H.Q., Hoshino K., Pomerantseva I., et al. *In vivo* myocardial distribution of multipotent progenitor cells following intracoronary delivery in a swine model

of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2009; 30: 2861-68.

150. Hou D., Youssef E.A., Brinton T.J., et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: Implications for current clinical trials. *Circulation* 2005; 112: I150-I156.

151. Perin E.C., Silva G.V., Assad J.A., et al. Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal cells in a canine model of acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44: 486-95.

152. Menasche P., Hagege A.A., Vilquin J. T., et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1078-1083.

153. Mitchell A.J., Sabondjian E., Sykes J., et al. Comparison of initial cell retention and clearance kinetics after subendocardial or subepicardial injections of endothelial progenitor cells in a canine myocardial infarction model. *J Nucl Med*. 2010; 51: 413-17.

154. Psaltis P., Zannettino A., Gronthos S., Worthley S. Intramyocardial navigation and mapping for stem cell delivery. *J Cardiovasc Transl Res* 2010; 3: 135-46.

#### Информация об авторах:

Конопляников Михаил Анатольевич – заведующий лабораторией клеточных технологий ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, к.б.н. e-mail: mkonopl@mail.ru

Кальсин Владимир Александрович – научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ ФНКЦ ФМБА России

Аверьянов Александр Вячеславович – заместитель генерального директора по научной работе ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, д.м.н. Тел. +7 (495) 395-0511, averyanovav@mail.ru