



Ангиогенный потенциал кардиальных стволовых и мезенхимальных стромальных клеток костного мозга крысы

Павлова С.В.^{1, 2, 3}, Розанова И.А.¹, Чепелева Е.В.^{1, 3}, Малахова А.А.^{1, 2, 3}, Лыков А.П.^{1, 4}, Покушалов Е.А.¹, Закиян С.М.^{1, 2, 3}

¹ Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Новосибирск, пр-т академика Лаврентьева, 10

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Новосибирск, пр-т академика Лаврентьева, 8

⁴ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии, 630060, Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Поступила в редакцию 15 сентября 2015 г. Принята к печати 27 ноября 2015 г.

Клеточная терапия – перспективный подход в лечении ишемических поражений миокарда. Результаты многочисленных исследований свидетельствуют, что кардиальные стволовые c-kit-позитивные (c-kit⁺) клетки взрослых организмов, подобно мезенхимальным стромальным клеткам костного мозга, обладают значительным ангиогенным потенциалом *in vivo*, а также оказывают паракринный эффект при терапии ишемических поражений сердца. Сравнение c-kit⁺ кардиальных стволовых и мезенхимальных стромальных клеток костного мозга крысы методами проточной цитометрии, иммунофлуоресцентного анализа и методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией показало, что клетки обладают сходным набором мезенхимальных маркеров (CD90, CD29, CD73, виментин, коллаген I типа, фибронектин), маркеров перицитов (αSMA, NG2, нестин, щелочная фосфатаза 1-го типа, Sca1), эндотелиальных маркеров (CD31, Tie2, vW), активных генов паракринных факторов и их рецепторов (PDGFb/PDGFRb, VEGF/VEGFR2, Ang1/Tie2, HGF/c-met, TGFb, Sfrp1). Культивирование в эндотелиальной среде EGM2 способствует повышению ангиогенного потенциала клеток обеих культур, о чем свидетельствует интенсивное связывание клетками изолектина B4, формирование капиллярноподобных структур в тесте на матригеле. Таким образом, на основании сходных молекулярных, цитогенетических и функциональных характеристик c-kit⁺ кардиальные стволовые клетки можно отнести к классу региональных мезенхимальных стромальных клеток, обладающих ангиогенным потенциалом.

Ключевые слова Кардиальные стволовые клетки • Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга • Кардиомиоциты • Перициты • Эндотелиоциты

Регенерация сердца после инфаркта миокарда – мечта врачей, пациентов и исследователей. С тех пор как доказали, что сердце не является терминально дифференцированным органом [1] и самообновляется, актуален вопрос кардиальных стволовых клеток (КСК). Обнаружив c-kit-позитивные (c-kit⁺) клетки миокарда млекопитающих *in vitro*, обладающие клоногенностью и способные дифференцироваться в кардиомиогенном, эндотелиальном и муральном направлениях, исследователи

предположили, что эти клетки могут быть кардиальными стволовыми [2]. Клетки с фенотипом c-kit⁺ просто выделять из эксплантной культуры тканей сердца методом кардиосфер [3] или с помощью антител к рецептору c-kit и последующей флуоресцентно- (FACS) или магнитно-активируемой (MACS) клеточной сортировки [4, 5]. Результаты клинических исследований по изучению эффекта интрамиокардиальной трансплантации c-kit⁺ кардиальных клеток (SCPIO [6] и CADUCEUS [7]) под-

твердили значительный терапевтический потенциал c-kit⁺ позитивных клеток сердца при лечении постинфарктного кардиосклероза. Тем не менее эффект достигается за счет улучшения перфузии гибернирующего миокарда и паракринного эффекта трансплантированных клеток [8, 9]. Многочисленные исследования c-kit⁺ кардиальных клеток на животных моделях инфаркта миокарда также свидетельствуют о значительном усилении ангиогенеза в области трансплантации клеток, однако авторы отмечают отсутствие доказательств кардиальной дифференцировки c-kit⁺ экзогенных клеток *in vivo* [10–13]. В работе по изучению клеток, которые экспрессировали ген c-kit (в эмбриогенезе или на стадии взрослого организма), показали, что потомками c-kit⁺ клеток в сердце являются васкулярные и интерстициальные клетки, а также единичные кардиомиоциты [14]. На сегодняшний день известны две популяции c-kit⁺ клеток сердца различного генеза: часть эмбриональных c-kit⁺ клеток происходит из области первичного кардиального поля и обладает кардиомиогенным потенциалом, однако элиминируется вскоре после рождения; часть c-kit⁺ клеток взрослого сердца имеет проэпикардальное происхождение [13]. Именно этот пул c-kit⁺ клеток постнатального миокарда доступен для изучения *in vitro* и характеризуется наличием маркеров мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (ММСК КМ) CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105. Мы предположили, что c-kit⁺ кардиальные клетки взрослого организма относятся к классу мезенхимальных стромальных клеток и наличие поверхностного маркера c-kit⁺ является региональной особенностью. Для этого сравнивали молекулярные и цитогенетические характеристики «эталона» мезенхимальных клеток – мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и c-kit⁺ кардиальных клеток крысы. Поскольку c-kit⁺ кардиальные клетки дифференцируются в эндотелиальном направлении, также исследовали ангиогенный потенциал мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга.

Материал и методы

Эксперименты на лабораторных животных проводили в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755 и приложение к приказу № 565 от 04.10.1977), с соблюдением принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000). Животные содержались на стандартной диете и имели свободный доступ к воде.

Выделение и культивирование мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крыс линии Wistar

Получали ядродержащие клетки костного мозга при помощи перфузии бедренных костей лабораторных животных, ресуспендировали в среде DMEM (Биолот, Россия) и пропускали через фильтр с размером пор 80 мкм для удаления клеточного дебриса. Для получения ММСК КМ инкубировали ядродержащие клетки костного мозга в стандартной ростовой среде, содержащей DMEM (Биолот, Россия), 10% FCS (HyClone), 100 мкг/мл гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Россия), 2 мМ L-глутамин (ICN, США) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Прикрепившиеся за 48 ч клетки культивировали до получения конфлюэнтного слоя в стандартной ростовой среде и эндотелиальной среде ESBM-2 (Lonza Clonetics).

Для остеогенной дифференцировки ММСК КМ и КСК инкубировали в стандартной среде, содержащей 5 × 10⁻⁷ М дексаметазона, 10 мМ β-глицерофосфата натрия и 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты (Sigma, США). Для адипогенной дифференцировки ММСК КМ инкубировали в стандартной среде с добавлением 5 × 10⁻⁶ М дексаметазона, 10 мкг/мл инсулина и 0,5 мМ изобутилметилксантина (Sigma, США). Для изучения ангиогенного потенциала клетки культивировали в эндотелиальной среде EGM2 (Lonza) на пластике, обработанном коллагеном I типа.

Выделение и культивирование кардиальных стволовых клеток крыс линии WAG

Культуру кардиальных стволовых клеток получали от 20-дневных крыс линии WAG согласно стандартным протоколам с собственными модификациями [15]. Предсердия и желудочки сердца механически измельчали до фрагментов размером 1 мм³ и обрабатывали 0,2% раствором коллагеназы NB4 (Serva electrophoresis) в течение 15 мин при 37 °С. Культивировали клетки в ростовой среде DMEM/F-12 (Invitrogen), содержащей 2% Knockout Serum Replacement (Invitrogen), 2% B27 (Gibco), пенициллин и стрептомицин (по 100 Ед/мл), 2 ммоль/л L-глутамин. В данной среде кардиальные стволовые клетки растут неприкрепленными, делятся клоногенно, в результате чего образуются кардиосферы. Когда кардиосферы достигали размера 100 мкм, их дезагрегировали реагентом TrypLE™. Через 2–5 пассажей клетки переводили на стандартную среду F12/DMEM (FD) (Invitrogen) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Autogene Bioclear), 100 Ед/мл стрептомицина (Gibco), 2 ммоль/л L-глутамин (Invitrogen). Для изучения ангиогенного потенциала кардиальные ство-

ловые клетки культивировали в эндотелиальной среде EGM2 (Lonza) на пластике, обработанном коллагеном I типа.

Анализ клеток методом проточной цитофлюориметрии

Для анализа клеток методом проточной цитометрии культуру клеток, диссоциированную диспазой (1 мг/мл; Stemcell Technologies), инкубировали с моноклональными мечеными антителами anti-CD29-APC (BioLegend), anti-CD34-alexaFluor 555 (BioS), anti-CD45-FITC (BD), anti-CD73 (BD), anti-CD90-FITC (BD) согласно рекомендациям производителей. Клетки анализировали на проточном цитометре FACS Cantoll (BectonDickinson, США).

Иммунофлюоресцентное окрашивание

Культуры кардиальных клеток фиксировали в 4% растворе формальдегида, блокировали неспецифическое связывание 2,5% раствором бычьего сывороточного альбумина (BCA) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и инкубировали с антителами по стандартным протоколам. Использовали антитела к белкам CD31 (ab64543, Abcam), CD90 (MAB1406, Millipor), vWF (A0082, Dako), aSMA (M0851, Dako), VEGFR2 (ab2349, Abcam), фибронектину (ab 6328, abcam), коллагену I типа (ab34710, abcam), Isolectin GS_IB4-alexa 594 (Invitrogen), c-kit (sc 168, Santa Cruz), Sca1 (Milteniy Biotech). Ядра окрашивали DAPI в Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories). Для выявления связавшихся антител использовали антитела против IgG мыши и кролика, конъюгированные с флуорохромами Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 568 (Life Technologies, Invitrogen). Анализ препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E при помощи программного обеспечения NIS-Elements AR.

Тест на связывание изолектина B4

Препараты на стеклах фиксировали в 4% растворе формальдегида и инкубировали в ФСБ, содержащем 0,1 мМ CaCl₂ и 2,5% BCA, в течение 30 мин при комнатной температуре. Связывание изолектина B4 (Isolectin GS_IB4-alexa 594, Invitrogen) проводили в ФСБ, содержащем 0,1 мМ CaCl₂, при 4 °C в течение 2 ч. Препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе Nikon X100 при помощи программного обеспечения Imstar.

Выявление ангиогенной активности

Эндотелиальные клетки способны образовывать капиллярно-подобные структуры на слое компонентов базальной мембраны. Ангиогенную активность культур клеток исследовали при помощи стандартного теста на тонком слое матригеля с пониженным содержанием ростовых факторов (BD Biosciences). В

лунку охлажденного культурального планшета заливали матригель из расчета 100 мкл/см², гель полимеризовался в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем в лунки высевали клетки плотностью 7–10 тыс. клеток/см². Формирование капиллярно-подобных структур наблюдали через 6–18 ч.

Анализ культур методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

Рибонуклеиновую кислоту (РНК) выделяли из культур клеток при помощи TRI Reagent (Sigma) согласно инструкции производителя. Для очистки образцов РНК от контаминации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) использовали набор реагентов TURBO DNA-free (Ambion). Синтез комплементарной ДНК проводили при помощи обратной транскриптазы SuperScript (Promega). Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе Biometra TRIO-Thermoblock по стандартному протоколу, используя специфические праймеры, представленные ниже. Полученные фрагменты ДНК анализировали методом гель-электрофореза.

Исследуемая последовательность ДНК	Структура праймеров
<i>CD31</i>	5'- GACAG-CCAAG-GCAGA-TGCAC -3' 5'- ATTGG-ATGGC-TGGC-CTGAA -3'
<i>C-Kit</i>	5'- GGCT-AGCCA-GAGAC-ATCA -3' 5'- GAGAG-GCTGT-GTGA-AGAGG -3'
<i>Sca1</i>	5'- CGGTC-ATTCA-GACCA-CACAC-AG -3' 5'- TGGGT-TGAAG-TTCTC-GCTCT-TG -3'
<i>desmin</i>	5'-TGGAG-CGTGA-CAACC-TGATA -3' 5'-CTGGA-CCTGC-TGTTCT-CTGA -3'
<i>c-met</i>	5'- CCAAG-CCGCG-TATGT-CAGTA-A -3' 5'- AATAA-GTCGA-CGCGC-TGCA -3'
<i>α-SMA</i>	5'- GAAGG-AATAG-CCACG-CTCAG -3' 5'- TCAAT-GTCCC-AGCCA-TGTA -3'
<i>VEGFR2</i>	5'- TCAAT-GTGGT-GAACC-TGCTG-G -3' 5'- TTCTC-TTGCC-CCGTA-AGTAA-GTTG -3'
<i>Ng2</i>	5'- CTCGCCACCTCCAAGAACAC -3' 5'- GCCCAGCCTCTGCCATT -3'
<i>Pdgfrβ</i>	5'- CAGGG-CGAGA-GCATC-ACCAT-CA -3' 5'- CAGCA-GCCGC-ACATA-GCCAT-TTT -3'
<i>Nestin</i>	5'- GTGCG-TGACT-ACCAG-GAGCG-CGTG -3' 5'-CATCT-TGAGG-TGTGC-CAGTT-GCTGC -3'
<i>Alp</i>	5'- CTTTG-TGGCT-CTCTC-CAAGA-CGTA -3' 5'- TCAGG-TTGTT-CCGAT-TCAAC-TCAT -3'
<i>SFRP1</i>	5'-CAG TCG GAT ATC GGC TCCTA-3' 5'-GTG GCA GTT CTT GTT GAG CA-3'
<i>Hgf</i>	5'-CTTCAGCTCCACAGAGAAGAAGTGC-3' 5'-CACGATCATGTTGGACAAGTCTCC-3'
<i>TGFβ</i>	5'-AGCTCAGAACCAGCCGGCTTGCAACAGGAT-3' 5'-TTACCAATGATGCAATTTCTAATATAGTCT-3'

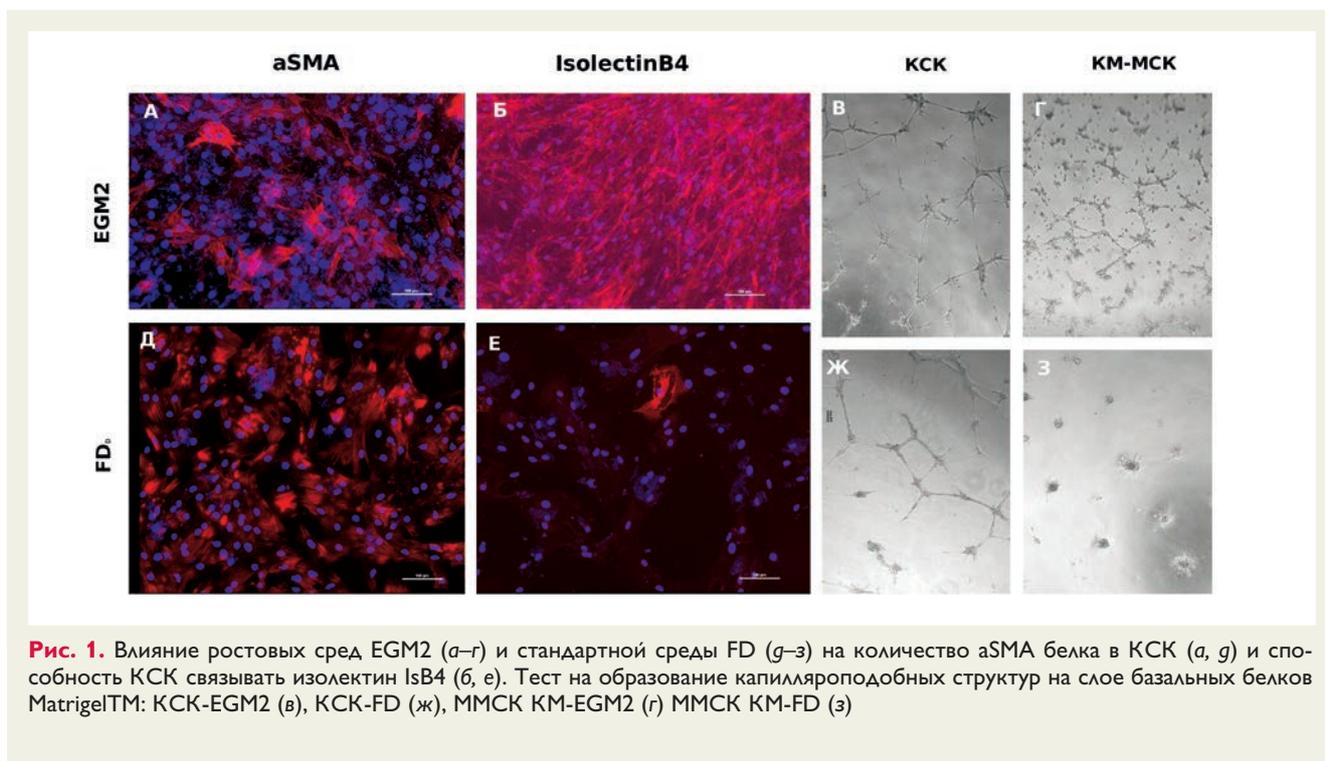


Рис. 1. Влияние ростовых сред EGM2 (а–г) и стандартной среды FD (г–з) на количество aSMA белка в КСК (а, г) и способность КСК связывать изолектин IsB4 (б, е). Тест на образование капилляроподобных структур на слое базальных белков MatrigelTM: КСК-EGM2 (в), КСК-FD (ж), MMCK KM-EGM2 (и) MMCK KM-FD (з)

Результаты

Мезенхимальные клетки костного мозга крысы получены по стандартному протоколу. Методом проточной цитометрии показано, что в популяции MMCK KM выявляются поверхностные маркеры CD73 (95% клеток), CD90 (95%), CD29 (98%) и отсутствуют белки CD45, CD34. Продемонстрирована их дифференцировка в остеогенном и адипогенном направлениях.

Кардиальные клетки крысы получили методом «первичных» кардиосфер [16]. С помощью проточной цитометрии показали, что в культуре 95% клеток позитивны на поверхностные маркеры CD75 и CD29, 90% кардиальных клеток являются CD90-положительными. В кардиальной культуре отсутствуют клетки, позитивные на маркеры CD45 и CD34. Иммунофлуоресцентным окрашиванием было показано, что кардиальные клетки связывают антитела к белкам c-kit и Sca1 [16]. Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) показана экспрессия маркера стволовых клеток сердца c-kit. При проведении протоколов дифференцировки в остециты и адипоциты нам не удалось индуцировать КСК в нужном направлении.

Для эндотелиальной дифференцировки MMCK KM и КСК культивировали в эндотелиальной среде EGM2 на пластике, обработанном коллагеном I типа в течение 3 недель. Для контроля часть клеток культивировали в стандар-

тной среде FD. В конце эксперимента проводили ИФ-анализ, ОТ-ПЦР и тест на образование капилляров на тонком слое экстракта базальной мембраны (матригель) для клеток каждой группы. Клетки популяции КСК, культивированные в эндотелиальной среде EGM2, характеризуются значительным сродством к изолектину B4 и на слое матригеля формируют капилляроподобную сеточку (рис. 1, б, в), что является признаком эндотелизации культуры. Клетки популяции КСК, культивированные в стандартной среде FD, нарабатывают белок aSMA, который выявляется в виде характерных фибрилл, теряют сродство к изолектину B4 (рис. 1, г, е). Тем не менее в тесте на матригеле клетки образуют капилляроподобные структуры, не формируя регулярную сеточку, и в «узлах» содержат скопления клеток, не способных формировать «капилляры» (рис. 1, ж).

Культивирование MMCK KM в эндотелиальной и стандартной средах не влияет на способность клеток интенсивно связывать изолектин B4. Хотя в тесте на матригеле только MMCK KM, культивированные в эндотелиальной среде EGM2, формируют капилляроподобные структуры (рис. 1, г, з). Также в этой популяции выявляют клетки, окрашенные на антитела к эндотелиальному маркеру CD31. Использование стандартной среды FD, так же как в случае с КСК, приводит к накоплению в MMCK KM, культивированных в среде FD, фибрилл aSMA (не приводится).

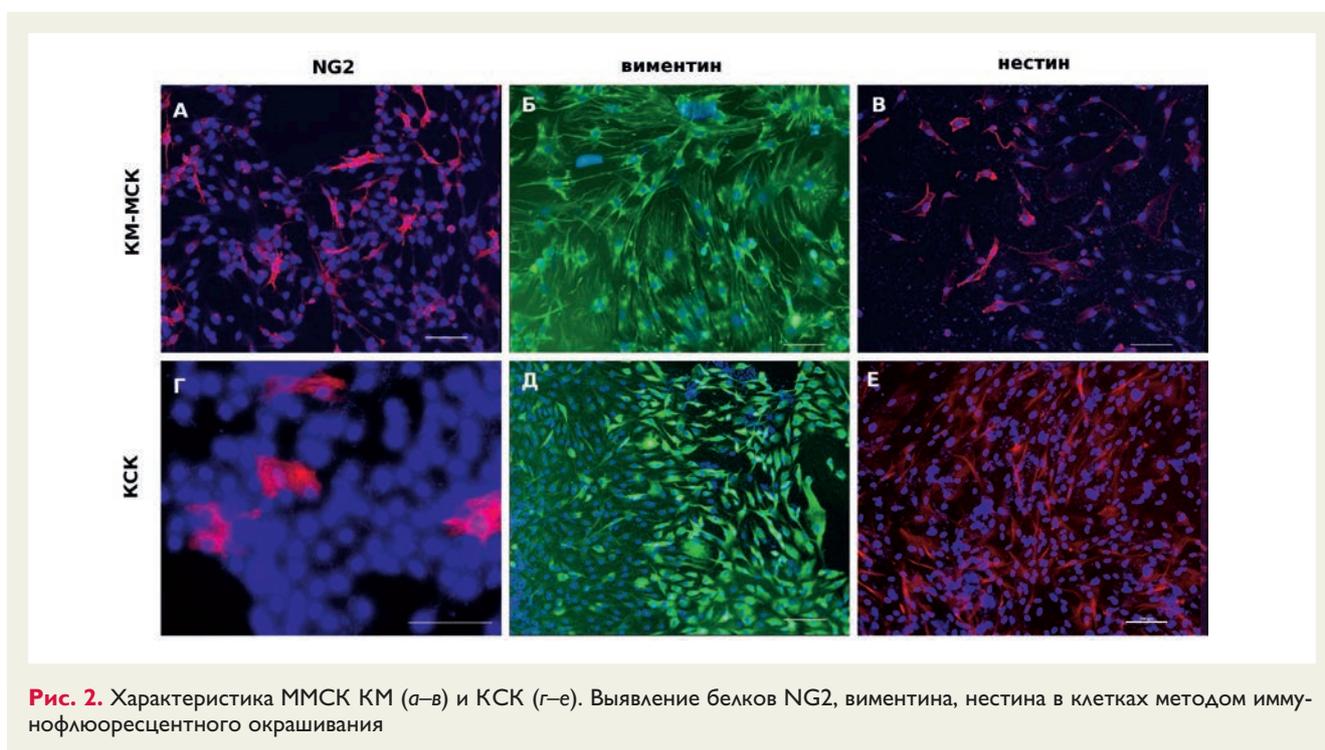


Рис. 2. Характеристика ММСК КМ (а–в) и КСК (г–е). Выявление белков NG2, виментина, нестина в клетках методом иммунофлюоресцентного окрашивания

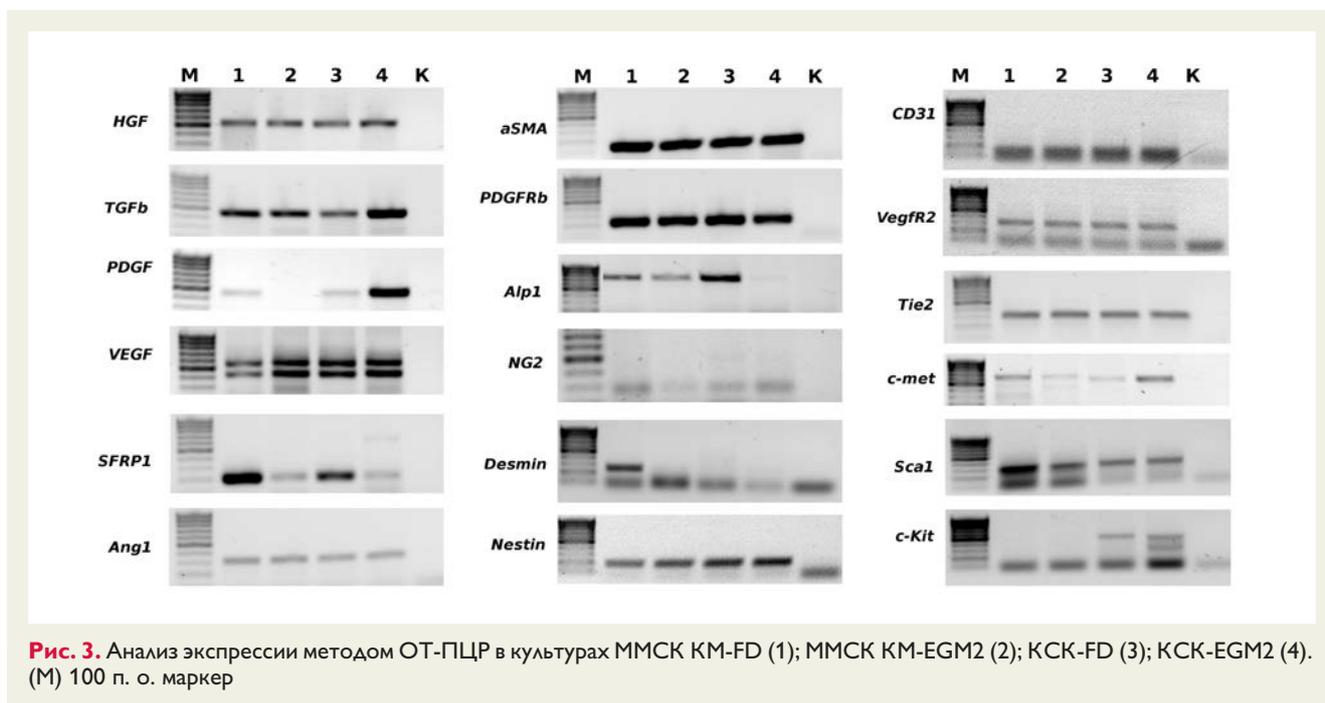
Методом иммунофлюоресцентного окрашивания показано, что все исследуемые клетки, независимо от происхождения и условий культивирования, производят коллаген I типа и фибронектин, окрашиваются на виментин, нестин, NG2 (рис. 2) и фактор фон Виллибранда (не приводится).

Методом ОТ-ПЦР мы показали, что в культурах КСК и ММСК КМ, независимо от условий культивирования, выявляется экспрессия генов, характерных для перicyтов: *NG2*, *нестин*, *αSMA* (также маркер гладкомышечных клеток и миофибробластов), ростового фактора *PDGFβ* (не выявлен в ММСК КМ в среде EGM2) и его рецептора *PDGFRβ*, щелочной фосфатазы *Alp1* (экспрессия этого гена пропадает в культуре КСК, культивированных в среде EGM2), *Scal* (*Stem cells antigen-1*), который также является маркером региональных прогениторных клеток [17]. В исследуемых культурах выявляются гены, характерные для эндотелиальных клеток *CD31*, *Tie2*, *VEGFR2*. Также была показана экспрессия ростовых факторов *VEGF*, *Ang1*, ответственных за ангиогенный потенциал популяции клеток, *HGF*, *TGFβ*, *Sfrp1*, обуславливающих паракринный потенциал МСК [18, 19]. Мы также показали экспрессию десмина, раннего маркера миогенных клеток в культуре ММСК КМ, культивированных в стандартной среде FD. Экспрессия гена *c-kit* в ММСК КМ не выявлена (рис. 3).

Обсуждение

Анализ собственных и литературных данных позволяет предположить, что пул *c-kit*-позитивных клеток сердца взрослых организмов не является источником регенерации сократительных клеток миокарда и в лучшем случае участвует в ангиогенезе, что подтверждается последними исследованиями [13, 14, 16]. Во всех исследованиях эффект от трансплантации *c-kit*⁺ кардиальных клеток, так же как и ММСК КМ, скорее обусловлен продукцией паракринных факторов, чем непосредственным участием клеток в васкуляризации [13, 16, 20].

Известно, что *c-kit*⁺ кардиальные клетки постнатального миокарда выявляются в областях проэпикардального происхождения: субэпикарде и интерстициальной ткани в миокарде. Количество *c-kit*⁺ клеток уменьшается в направлении от эпикарда к эндокарду. Клетки эпикарда способны совершать эпителиально-мезенхимальный переход, при котором происходит индукция экспрессии гена *c-kit*, мезенхимальных генов. Производными «переходных» клеток являются фибробласты, миофибробласты, клетки интерстиция, эндотелиальные и муральные клетки, реже – кардиомиоциты [21]. Мы, как и многие другие исследователи, показали, что *c-kit*⁺ кардиальные клетки постнатального миокарда имеют поверхностные маркеры мезенхимальных стромальных клеток CD105,



CD90, CD73 и т. д. Накоплены данные, свидетельствующие, что в условиях дифференцировки в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях в *c-kit*⁺ кардиальных клетках индуцируются соответствующие маркеры, характерные для дифференцированных МСК. С другой стороны, *c-kit*⁺ фенотип наблюдается в МСК кожи, костного мозга, жировой ткани [13].

Мы провели сравнительное исследование *c-kit*⁺ кардиальных клеток, полученных методом кардиосфер, и мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, которые удовлетворяют международным общепринятым критериям (наличие соответствующих поверхностных маркеров, способность дифференцировки в адипо- и остеогенном направлениях) и показали сходство между популяциями MMCK KM и KCK на уровне классических мезенхимальных маркеров. Также мы обнаружили в обеих популяциях маркеры перицитов на уровне белков методом иммунофлуоресцентного окрашивания (NG2, нестин, *aSMA*, виментин, коллаген I типа, фибронектин) и экспрессии генов (*Sca1*, *Alp1*, *PDGFb*, его рецептора *PDGFRb*). Отметим, что в клетках KCK и MMCK KM выявляется экспрессия генов, которые характерны для эндотелиоцитов – *CD31*, *Tie2*, *vW*, *VEGFR2*. Методом ОТ-ПЦР показана экспрессия генов в KCK, отвечающих за ангиогенный и паракринный эффекты мезенхимальных стволовых клеток. Культивирование KCK в эндотелиальных условиях не привело к появлению

CD31-позитивных клеток, хотя в целом способствовало повышению ангиогенного потенциала, о чем свидетельствует интенсивное связывание клетками KCK, культивируемых в среде EGM2, изолектина В4. В клетках MMCK KM, культивируемых в эндотелиальных условиях, методом иммунофлуоресцентного окрашивания выявляются CD31-позитивные клетки, в тесте на матрикеле наблюдается формирование капилляроподобных структур. При использовании стандартной среды с 10% сыворотки KCK и MMCK KM нарабатывают стресс-фибриллы *aSMA*, характерные для миофибробластов.

Таким образом, *c-kit*⁺ кардиальные стволовые клетки, полученные из сердца взрослых крыс, могут быть отнесены к региональным мезенхимальным клеткам. Среди региональных МСК особое внимание привлекают периваскулярные клетки, или перициты, которые входят в состав микрокапилляров, способствуют их стабилизации и участвуют в регуляции ангиогенеза, продуцируя ростовые факторы VEGF, Ang1, которые привлекают эндотелиоциты, способствующие стабилизации микрососудов [22]. Следует отметить, перициты обладают свойством формировать сферы при культивировании в среде с низким содержанием сыворотки [23], участвовать в формировании микрокапилляров в ангиогенном тесте на матрикеле. Перициты присутствуют в любом органе в составе микрососудов, способны дифференцироваться в остеогенном, адипогенном, хондрогенном и муральном направле-

ниях. Кроме того, они имеют тканеспецифичные черты, обуславливающие их способность дифференцироваться в миогенном направлении, что объясняет незначительный кардиомиогенный потенциал, которым обладают c-kit⁺ кардиальные клетки [17, 24, 25]. Если предположить, что c-kit⁺ кардиальные клетки являются перикардиоцитами сердца, тогда легко объяснить все особенности, описанные для данного типа клеток, их ангиогенный потенциал *in vitro* и паракринный эффект *in vivo*.

Выводы

1. Кардиальные стволовые клетки и мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга крысы обладают сходным набором маркеров, характерных для перикардиоцитов (CD90, CD29, CD73, виментин, коллаген I типа, фибронектин, αSMA, NG2, нестин, Alp1 (щелочная фосфатаза I типа), Sca1), эндотелиальных (CD31, Tie2, vW), паракринных факторов и их рецепторов (PDGFb/PDGFRb, VEGF/VEGFR2, Ang1/Tie2, HGF/c-met, TGFb, Sfrp1).

2. Культивирование кардиальных стволовых клеток и мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в среде EGM2 способствовало повышению ангиогенного потенциала культур, о чем свидетельствуют интенсивное связывание КСК в среде EGM2 изолектина В4 по сравнению с КСК в среде FD, появление капиллярноподобных структур в тесте на матригеле для ММСК КМ, культивированных в эндотелиальной среде EGM2.

3. c-kit⁺ кардиальные стволовые клетки могут представлять собой региональные мезенхимальные стволовые клетки типа кардиальных перикардиоцитов.

Работа поддержана бюджетным проектом Института цитологии и генетики СО РАН VI.60.1.2.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Bergmann O., Bhardwaj R.D., Bernard S., Zdunek S., Barnabé-Heider F., Walsh S., Zupicich J., Alkass K., Buchholz B.A., Druid H., Jovinge S., Frisén J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans // *Science*. 2009. Vol. 324. № 5923. P. 98–102.
- Beltrami A.P., Barlucchi L., Torella D., Baker M., Limana F., Chimenti S., Kasahara H., Rota M., Musso E., Urbanek K., Leri A., Kajstura J., Nadal-Ginard B., Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration // *Cell*. 2003. Vol. 114. № 6. P. 763–76.
- Smith R.R., Barile L., Cho H.C., Leppo M.K., Hare J.M., Messina E., Giacomello A., Abraham M.R., Marbán E. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens // *Circulation*. 2007. Vol. 115. № 7. P. 896–908.
- Leri A., Kajstura J., Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration // *Physiol. Rev.* 2005. Vol. 85. № 4. P. 1373–416.
- He J.Q., Vu D.M., Hunt G., Chugh A., Bhatnagar A., Bolli R. Human cardiac stem cells isolated from atrial appendages stably express c-kit // *PLoS One*. 2011. Vol. 6. № 11. P. e27719.
- Bolli R., Chugh A.R., D'Amario D., Loughran J.H., Stoddard M.F., Ikram S., Beache G.M., Wagner S.G., Leri A., Hosoda T., Sanada F., Elmore J.B., Goichberg P., Cappetta D., Solankhi N.K., Fahsah I., Rokosh D.G., Slaughter M.S., Kajstura J., Anversa P. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial // *Lancet*. 2011. Vol. 378. № 9806. P. 1847–57.
- Makkar R.R., Smith R.R., Cheng K., Malliaras K., Thomson L.E., Berman D., Czer L.S., Marbán L., Mendizabal A., Johnston P.V., Russell S.D., Schuleri K.H., Lardo A.C., Gerstenblith G., Marbán E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial // *Lancet*. 2012. Vol. 379. № 9819. P. 895–904.
- Malliaras K., Makkar R.R., Smith R.R., Cheng K., Wu E., Bonow R.O., Marbán L., Mendizabal A., Cingolani E., Johnston P.V., Gerstenblith G., Schuleri K.H., Lardo A.C., Marbán E. Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CARDiosphere-Derived autologous stem CELls to reverse ventricular dysfunction) // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014. Vol. 63. № 2. P. 110–22.
- Chugh A.R., Beache G.M., Loughran J.H., Mewton N., Elmore J.B., Kajstura J., Pappas P., Tatroles A., Stoddard M.F., Lima J.A., Slaughter M.S., Anversa P., Bolli R. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance // *Circulation*. 2012. Vol. 126. № 11 (Suppl. 1). P. S54–64.
- Smits A.M., van Vliet P., Metz C.H., Korfage T., Sluijter J.P., Doevendans P.A., Goumans M.J. Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology // *Nat. Protoc.* 2009. Vol. 4. № 2. P. 232–43.
- Andersen D.C., Andersen P., Schneider M., Jensen H.B., Sheikh S.P. Murine "cardiospheres" are not a source of stem cells with cardiomyogenic potential // *Stem Cells*. 2009. Vol. 27. № 7. P. 1571–81.
- Bolli R., Tang X.L., Sanganelmath S.K., Rimoldi O., Mosna F., Abdel-Latif A., Jneid H., Rota M., Leri A., Kajstura J. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy // *Circulation*. 2013. Vol. 128. № 2. P. 122–31.
- Keith M.C., Bolli R. "String theory" of c-kit(pos) cardiac cells: a new paradigm regarding the nature of these cells that may reconcile apparently discrepant results // *Circ. Res.* 2015. Vol. 116. № 7. P. 1216–30.
- van Berlo J.H., Kanisicak O., Maillet M., Vagnozzi R.J., Karch J., Lin S.C., Middleton R.C., Marbán E., Molkentin J.D. c-kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart // *Nature*. 2014. Vol. 509. № 7500. P. 337–41.
- Messina E., De Angelis L., Frati G., Morrone S., Chimenti S., Fiordaliso F., Salio M., Battaglia M., Latronico M.V., Coletta M., Vivarelli E., Frati L., Cossu G., Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart // *Circ. Res.* 2004. Vol. 95. № 9. P. 911–21.
- Чепелева Е.В., Павлова С.В., Малахова А.А., Милевская Е.А., Русакова Я.А., Подхватилина Н.А., Сергеевичев Д.С., Покушалов Е.А., Караськов А.М., Сухих Г.Т., Закиян С.М. Терапия хронического кардиосклероза у крыс линии WAG культурами кардиоваскулярных клеток, обогащенными стволовыми клетками сердца // *КТБМ*. 2015. № 3. С. 10.

17. Бозо И.Я., Деев Р.В., Пинаев Г.П. «Фибробласт» – специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезенхимного происхождения? // Цитология. 2010. Т. 52. № 2. С. 99–109.
18. Соловьева А.О., Повещенко О.В., Повещенко А.Ф., Коненков В.И., Караськов А.М. Изучение миграции трансплантированных клеток костного мозга в ткань сердца // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2012. № 3. С. 75–78.
19. Сергеевичев Д.С., Ларионов П.М., Субботин Д.В., Новрузов Р.Б., Кливер Е.Н., Караськов А.М. Молекулярный анализ экспрессии генов семейства VEGF в мононуклеарных клетках костного мозга человека после плеттинга // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2010. № 1. С. 70–75.
20. Ларионов П.М., Чернявский А.М., Бондарь В.Ю., Бочарова А.В., Субботин Д.В., Сергеевичев Д.С., Новрузов Р.Б., Караськов А.М. Регенерация перирубцовой зоны миокарда при комбинированной реваскуляризации (лазер плюс клетки) на модели хронической ишемической болезни сердца // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2009. № 3. С. 83–85.
21. Di Meglio F., Castaldo C., Nurzynska D., Romano V., Miraglia R., Bancone C., Langella G., Vosa C., Montagnani S. Epithelial-mesenchymal transition of epicardial mesothelium is a source of cardiac CD117-positive stem cells in adult human heart // J. Mol. Cell Cardiol. 2010. Vol. 49. № 5. P. 719–27.
22. Nees S., Weiss D.R., Senftl A., Knott M., Förch S., Schnurr M., Weyrich P., Juchem G. Isolation, bulk cultivation, and characterization of coronary microvascular pericytes: the second most frequent myocardial cell type in vitro // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2012. Vol. 302. № 1. P. H69–84.
23. Chen Y.T., Chang F.C., Wu C.F., Chou Y.H., Hsu H.L., Chiang W.C., Shen J., Chen Y.M., Wu K.D., Tsai T.J., Duffield J.S., Lin S.L. Platelet-derived growth factor receptor signaling activates pericyte-myofibroblast transition in obstructive and post-ischemic kidney fibrosis // Kidney Int. 2011. Vol. 80. № 11. P. 1170–81.
24. Зорина А.И. Бозо И.Я., Зорин В.Л., Черкасов В.Р., Деев Р.В. Фибробласты дермы: особенности цитогенеза, цитофизиологии и возможности клинического применения // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. Т. 6. № 2. С. 15–26.
25. Birbrair A., Zhang T., Wang Z.M., Messi M.L., Enikolopov G.N., Mintz A., Delbono O. Role of pericytes in skeletal muscle regeneration and fat accumulation // Stem Cells Dev. 2013. Vol. 22. № 16. P. 2298–314.

Angiogenic potential of rat cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stromal cells

Pavlova S.V.^{1,2,3*}, Rozanova I.A.¹, Chepeleva E.V.^{1,3}, Malakhova A.A.^{1,2,3}, Lykov A.P.^{1,4}, Pokushalov E.A.¹, Zakiyan S.M.^{1,2,3}

¹ Academician Ye. Meshalkin Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology, Ministry of Health Care of Russian Federation, 15 Rechkunovskaya St., 630055 Novosibirsk, Russian Federation

² The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, The Siberian Branch of the Russian Federation Academy of Sciences, 10 Lavrentieva Avenue, 630090 Novosibirsk, Russian Federation

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, The Siberian Branch of the Russian Federation Academy of Sciences, 8 Lavrentieva Avenue, 630090 Novosibirsk, Russian Federation

⁴ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, 2 Timakova St., 630060 Novosibirsk, Russian Federation

* Corresponding author. Email: spav@bionet.nsc.ru

Cell therapy is a promising approach in the treatment of ischaemic myocardial damage. Multiple research data show that c-kit⁺ cardiac stem cells of adult organism as well as mesenchymal stromal bone marrow cells demonstrate paracrine effect in the treatment of ischaemic myocardial damage. Comparative immunofluorescent, flow cytometry and RT-PCR analysis of c-kit positive cardiac stem cells and bone marrow derived mesenchymal stromal cells in rats indicates that both types of cells have similar mesenchymal (CD90, CD29, CD73, vimentin, collagen type I, fibronectin), pericyte (αSMA, NG2, nestin, alkaline phosphatase type I, Sca1), endothelial (CD31, Tie2, vW) markers and express paracrine factors and their receptors (PDGFb / PDGFRb, VEGF / VEGFR2, Ang1 / Tie2, HGF / c-met, TGFb, Sfrp1). Cultivation of CSC and BM-MSc in endothelial medium EGM2 helped to improve the angiogenic potential of the culture, as evidenced by the intense isolectin B4 binding, the formation of capillary-like structures in Matrigel test. We hypothesized that c-kit⁺ CSC are regional mesenchymal stem cells with features of cardiac pericytes. Moreover, we showed that rat bone marrow derived mesenchymal stromal cells demonstrate angiogenic potential in vitro.

Key words: cardiac stem cells; bone marrow derived mesenchymal stromal cells; cardiomyocyte; endotheliocyte; pericyte

Received 15 September 2015. Accepted 27 November 2015.