

УДК 611.12-018+611.4:616-003.93

**ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ
РЕГЕНЕРАЦИИ МИОКАРДА**

Белобородова Алена Валерьевна

*студентка Крымской медицинской академии имени С. И. Георгиевского
ФГАОУВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского»,
г. Симферополь. E-mail: alenabeloborod@gmail.com*

Василенко Светлана Анатольевна

*ассистент кафедры гистологии и эмбриологии
Крымской медицинской академии имени С. И. Георгиевского
ФГАОУВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского»,
г. Симферополь. E-mail: swetlanawasilenko@gmail.com*

Купша Елена Ивановна

*кандидат мед. наук, доцент кафедры гистологии и эмбриологии
Крымской медицинской академии имени С. И. Георгиевского
ФГАОУВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского»,
г. Симферополь. E-mail: liver-life@yandex.ru*

**APPLICABILITY OF STEM CELLS FOR
MYOCARDIAL REGENERATION**

Elena Beloborodova

*Student of V.I.Vernadsky Crimean Federal University,
Medical Academy named after S. I. Georgievsky, Simferopol*

Svetlana Vasilenko

*Assistant of Histology and Embryology Department of V.I.Vernadsky
Crimean Federal University,
Medical Academy named after S. I. Georgievsky, Simferopol*

Elena Kupsha

*Candidate of Medical Sciences, assistant professor of Histology and Embryology
Department of V.I.Vernadsky Crimean Federal University,
Medical Academy named after S. I. Georgievsky, Simferopol*

АННОТАЦИЯ

В статье проанализированы данные литературы о стволовых клетках (СК) различного происхождения и их использовании в экспериментальной и практической медицине. Одним из наиболее современных подходов для повышения регенерационного потенциала сердца является применение клеточной терапии. В миокарде выделен пул одноядерных СК сердца, способных вступать в клеточный цикл с завершенным карио- и цитокinesis. Проллиферативная активность прогениторных клеток сердца максимальна в неонатальном периоде и снижается с возрастом. Знание критических периодов развития сердца необходимо для разработки новых превентивных мер с целью сохранения пролиферативного потенциала миокарда и профилактики сердечно – сосудистых заболеваний. Трансплантация СК в зону инфаркта приводит к уменьшению объема рубцовой ткани и улучшению функциональных параметров миокарда.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки; фетальные стволовые клетки; мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки; прогениторные/стволовые клетки сердца; регенерация миокарда.

ABSTRACT

The literature data about stem cells of different origins and their use in experimental and practical medicine have analyzed in the article. Cell therapy is one of the most modern approaches to improve the regenerative capacity of the heart. Mononuclear cardiac stem cells have found in the myocardium, that are able to get into the mitosis with completed karyo- and cytokinesis. Proliferative activity of the heart progenitor cells is the maximum in the neonatal period and decreases with age. Knowledge about the critical periods of the heart development is necessary for the working out of new preventive measures to keep the proliferative capacity of the myocardium and prevention of cardio - vascular diseases. SC transplantation in the infarcted area reduces the volume of scar tissue and increase myocardial functional parameters.

Keywords: embryonic stem cells; fetal stem cells; multipotent mesenchymal stem cell; heart progenitor/stem cells; myocardial regeneration.

Болезни сердечно - сосудистой системы являются одной из главных медико-социальных проблем, стоящих перед здравоохранением всех экономически развитых стран мира. Из 17 млн., погибших от болезней кровообращения за 2014 год, 1,3 млн. пришлось только на Россию, что составляет 56,9% общей смертности населения (по данным Федеральной службы государственной статистики). [8, с.1]. При этом более трети случаев приходится на патологию, связанную с утратой части работоспособного миокарда (ишемическую болезнь сердца, инфаркт миокарда, хроническую сердечную недостаточность). Лечение этих заболеваний прошло большой путь: от медикаментозной терапии до высокотехнологичных хирургических вмешательств. Поскольку между объемом пораженного миокарда и смертностью от острого коронарного синдрома имеется прямая зависимость, проблема физиологической регенерации кардиомиоцитов (КМЦ) сердечной ткани в течение многих лет стоит в центре научных исследований во всех странах мира. Именно поэтому разрабатываются новые стратегии клеточной терапии, при которых создаются условия для восстановления функционально - ведущей ткани миокарда - сократительных КМЦ.

В зависимости от источника получения стволовые клетки (СК) подразделяют на эмбриональные, фетальные и постнатальные. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) образуются на 4-5 сутки после оплодотворения из бластоцисты. В отсутствие стимулов к дифференциации *in vitro*, ЭСК могут поддерживать плюрипотентность в течение многих клеточных делений и, обладая низким уровнем иммунореактивности, практически никогда не вызывают реакции отторжения. [6, с.12](Репин

Фетальные стволовые клетки (ФСК) получают из плодного материала на 9 – 11 неделе внутриутробного развития. При этом ФСК уже вступили в процесс дифференцировки и, пройдя ограниченное число делений, дают начало только определённым видам специализированных клеток.

Способность ЭСК и ФСК к митозу послужила основой их применения для лечения экспериментального инфаркта миокарда (ИМ) у мышей. После трансплантации ФСК в поврежденный миокард, в толще рубцовой ткани удалось выявить жизнеспособные, пролиферирующие КМЦ. При трансплантации неонатальных СК были получены аналогичные результаты. Однако, возникновение новой сердечной мышечной ткани не приводило к ее интеграции с миокардом реципиента. Это вызывало появление очагов гетеротропного возбуждения и, как следствие, возникновение аритмии. Кроме того, получение ЭСК и ФСК из эмбриональной ткани имеет серьезный морально-этический аспект, ограничивающий их широкое применение. [4, с.523] Цитология

Создание ЭСК путем перепрограммирования других клеток организма изначально было признано не эффективным, так как максимальная продуктивность процесса составляет всего 2%. [6, с.40]Репин Тем не менее, современные подходы с использованием экзогенного введения факторов транскрипции, демонстрируют возможность прямой трансдифференцировки фибробластов в зрелые КМЦ, минуя плюрипотентное состояние, и находятся на стадии экспериментальной разработки. [12, с.1] W

В качестве еще одного источника обновления КМЦ, с 1999 г., изучаются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) способные дифференцироваться в остеобласты, хондроциты, адипоциты, миоциты и кардиомиоциты. Источником этих клеток являются костный мозг, жировая ткань, пульпа молочных зубов, амниотическая жидкость, пуповинная кровь и вартонов студень. [3, с.32] Калинина Кардиомиоцитарный клеточный клон был получен из стволовых клеток костного мозга (СКК) *in vitro* путем обработки их 5-азациитидином (аналогом цитозина, способным индуцировать дифференцировку). Затем культура была подвергнута повторному скринингу с отбором клеток, способных к спонтанному сокращению. Клеточный клон был назван CMG (cardiomogenic cell), было показано, что полученные клетки

соответствовали кардиомиоцитам ультраструктурно и электрофизиологически, также отмечалась экспрессия кардиомиоцитарных генов (ANP, BNP, GATA 4, Nkx2,5/Csx). [3, с. 34; 4, с. 524] Цитология 2008

Выявленная способность ММСК дифференцироваться в кардиомиоцитарном направлении в дальнейшем была изучена при введении их в кровотоки при экспериментальном ИМ у лабораторных животных. При гистологическом анализе зоны инфаркта были обнаружены КМЦ с донорской меткой, которые экспрессировали α -актинин, тропонин-Т, тропомиозин, тяжелые цепи миозина и коннексин-43. Трансплантация ММСК в зону инфаркта приводила к значимому улучшению функциональных параметров поврежденного миокарда. Удалось показать также, что введение ММСК вызывало усиление ангиогенеза вследствие повышения эндогенной продукции фактора роста эндотелия сосудов VEGF. Таким образом, были продемонстрированы уникальные свойства ММСК: способность мигрировать в зону инфаркта из кровотока, дифференцироваться в сократительные КМЦ, продуцировать факторы, стимулирующие неоангиогенез. Требуемыми решения оставались вопросы выживаемости трансплантата и электрической ассоциации с КМЦ реципиента. [3] Цитология 2008

На современном этапе исследований установлено, что полипотентные стволовые клетки резидентно присутствуют (или могут формироваться в результате дедифференцировки) во всех органах взрослого организма. При стимуляции ростовыми факторами, они замещают погибающие апоптозом клетки.

Еще несколько десятилетий назад распространенным мнением являлось, что КМЦ не способны вступать в митоз. Дифференцируясь вскоре после рождения, КМЦ сохраняются на протяжении всей жизни. Начиная с 7 месяца после рождения, они не пролиферируют, а гемодинамическая нагрузка вызывает только гипертрофию сердечной мышцы. Фактором, ограничивающим пролиферацию КМЦ, является присутствие строго ориентированных агрегатов сократительных белков – миофибрилл, которые препятствуют процессам

цитокинеза. При патологии миокарда, в частности ишемии, как проявление адаптивно-компенсаторной реакции, отмечается избыточная полиплоидия путем незавершенного митоза, что результируется в появлении одноядерных тетраплоидных, двуядерных диплоидных, политенных КМЦ. Данный феномен связан с резким уменьшением сократительного миофибриллярного белка в расчете на геном, истончением и удлинением КМЦ и снижением сократительной способности миокарда, диагностируемой по изменению сердечного индекса. [5] Разумов

Развитие автордиографических методов исследования позволило изменить эти представления. Обнаружены одноядерные, т.н. «малые» КМЦ, способные вступать в клеточный цикл с завершенным карио- и цитокинезом. Доказано, что около 1% клеток взрослого сердца обновляется в течение года, и 45% КМЦ являются новообразованными к 50 годам. Клеточное ремоделирование миокарда – пожизненный процесс, однако большинство КМЦ образованы перинатально (с 22 недели внутриутробного развития по 7 сутки жизни новорожденного). Регенеративный потенциал СК сердца неодинаков в разные возрастные периоды. Наибольшая пролиферативная активность отмечается в неонатальном сердце, затем уменьшается с возрастом, составляя во взрослом миокарде менее 1%. Различают временные рамки критических периодов в развитии сердца, совпадающие с переключением пролиферативного роста на полиплоидию. У человека это эмбриональный и неонатальный периоды, детство, пубертатный период и юность. [1] Знание периодических особенностей развития сердца может быть полезно в разработке мероприятий по профилактике патологии миокарда, сохранения его пролиферативного ресурса, начиная с периода новорожденности.

В миокарде были выделены три популяции резидентных стволовых клеток: c-Kit +, Sca-1 +, и SP (side population). [7, 9, с.4] Kuhn EN, Несущие на своей поверхности рецептор к фактору стволовых клеток, клоногенные c-Kit-клетки могут давать рост кардиомиоцитов, эндотелиальных и гладкомышечных клеток *in vitro* и формировать функциональный миокард *in vivo*. Клетки,

несущие на своей поверхности антиген Sca-1+, характеризующий СК мыши (Sca-1-клетки) также способны к самообновлению и дифференцировке в кардиомиоциты. SP-клетки идентифицированы по способности исключить ДНК-связывающий краситель Хекст, они были выделены из многих тканей взрослого организма. Сердечные SP-клетки способны к пролиферации и дифференцировке как в кардиомиоцитарную, так и в гемопоэтическую линию. Также были идентифицированы неонатальные Isl-1+ кардиальные клетки - предшественники у мышей, крыс и человека, дифференцирующиеся в КМЦ.

Культура, состоящая из клеток, экспрессирующих маркер стволовых клеток c-Kit и маркеры эндотелиальных предшественников, могут образовывать «кардиосферы». Кардиосфера представляет собой трехмерную структуру, состоящую из клеток разных фенотипов: в ее центре находятся недифференцированные c-Kit + пролиферирующие клетки, а по периферии – клетки, несущие маркеры кардиомиоцитарной и эндотелиальной дифференцировки, а также мезенхимные клетки.

Имеются данные об успешном использовании кардиосфер при экспериментальном ИМ у мышей. [11]

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17283259>. Кардиосферы клеток были смоделированы из стволовых клеток, полученных посредством эндомиокардиальной биопсии. В результате введения кардиосфер в пограничную зону ИМ процент жизнеспособного миокарда, а также фракция выброса левого желудочка были выше, чем в контрольной группе. При последующих проспективных рандомизированных клинических испытаниях с применением кардиосфер установлено достоверное снижение объема рубцовой ткани, увеличение жизнеспособной массы сердечной мышцы и региональной сократимости, однако, конечный диастолический объем и фракция выброса левого желудочка не отличались от контрольной группы. Одновременно была продемонстрирована безопасность данной методики: отсутствовали смертность, индуцированные сердечные опухоли, хотя и имелось

статистически не значимое большее количество осложнений. [10]
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22336189> Makkar RR

Не окончательное решение проблем идентификации кардиомиогенного потенциала кардиосфер и поиска оптимальной модели применения факторов обеспечивающих пролиферацию, рост и дифференцировку СК объясняют сдержанное отношение к заместительному кардиомиогенезу, а клинические практические рекомендации (Clinical practice guidelines; CPGs) по-прежнему не рассматривают пролиферацию КМЦ как компонент ремоделирования сердца.[5] Разумов

Выводы:

1. В миокарде человека выделен пул резидентных стволовых клеток, способных дифференцироваться в кардиомиоциты и участвовать в регенерации миокарда при его патологии.

2. Знание критических периодов развития сердца необходимо для разработки новых превентивных стратегий с целью сохранения пролиферативного потенциала миокарда и профилактики сердечно – сосудистых заболеваний.

3. Трансплантация СК в поврежденный миокард приводит к снижению объема рубцовой ткани и улучшению сократительной способности сердца, что является наиболее перспективной стратегией для лечения инфаркта миокарда.

Список литературы:

1. Анацкая О.В. Неонатальный гастроэнтерит как причина долговременной атрофии, деформации и необратимой гиперполиплоидизации кардиомиоцитов // Кардиология. – 2010. – №12. – С. 35 – 44. URL: <http://www.cardio-journal.ru/ru/archive/article/2611> (дата обращения: 18.08.2016)
2. Дергилев К.В., Рубина К.А., Парфенова Е.В. Резидентные стволовые клетки сердца // Кардиология. Ежемесячный научно-практический журнал. – 2011. – №4. – С.84-92. (дата обращения 12.08.16)

3. Жадейко Р. Сердечно-сосудистые заболевания – основная причина смертности на Земле. // Проект компании Медицинские Компьютерные Системы KardiRu. 07.03.14. URL: <http://www.kardi.ru/ru/index/Article?ViewType=view&Id=14> (дата обращения: 1.07.2016)
4. Калинина Н. И. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарация тканей // Научный журнал Acta Naturae (русскоязычная версия) -2011.-Т.3.№4.С.32-39. URL:<http://elibrary.ru/item.asp?id=17704758> (Дата обращения 02.08.16)
5. Кругляков П. В. Клеточная терапия инфаркта миокарда //Цитология .- 2008.- Том 50 №6 С. 521-528. URL : <http://elibrary.ru/item.asp?id=11567282> (дата обращения 12.08.16)
6. Плотников Е. Ю. Стволовые клетки в регенеративной терапии сердечных заболеваний: Роль межклеточных взаимодействий. // Научный журнал Гены и клетки -2009.- Т. 4. № 1. С. 43-49. URL : <http://elibrary.ru/item.asp?id=12856227> (дата обращения 20.07.16)
7. Разумов В. В., Бондарев О. И., Задорожная М. П. Пролиферация кардиомиоцитов как забытый механизм ремоделирования сердца (аналитический обзор и собственные наблюдения) // Фундаментальные исследования. 2015. №1-6. URL: <http://cyberleninka.ru/article/n/proliferatsiya-kardiomiotsitov-kak-zabytyy-mehanizm-remodelirovaniya-serdtsa-analiticheskiy-obzor-i-sobstvennye-nablyudeniya> (дата обращения: 24.08.2016).
8. Репин В.С. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина / В.С. Репин, А.А. Ржанинова, Шаменков Д.А. – М: Реметэкс, 2002. – с. 176
9. Рубина К. А. Резидентные клетки-Предшественники в сердце и регенерация миокарда..// Научный журнал «Гены и Клетки». -2007.- Т. 2.

- № 1. С. 29-35. URL:<http://elibrary.ru/item.asp?id=9445947> (Дата обращения: 10.08.16)
10. Kuhn EN, Wu SM. Origin of cardiac progenitor cells in the developing and postnatal heart. // *Journal of cellular physiology*. – 2010/- ;225(2):321-325. doi:10.1002/jcp.22281. URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3620291/>. (Дата обращения 15.07.16)
11. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. // *Lancet*.- 2012/- 379(9819):895-904. doi:10.1016/S0140-6736(12)60195-0. URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22336189> (Дата обращения 01.07.16)
12. Regenerative Potential of Cardiosphere-Derived Cells Expanded From Percutaneous Endomyocardial Biopsy Specimens. Rachel Ruckdeschel Smith, Lucio Barile, Hee Cheol Cho, Michelle K. Leppo, Joshua M. Hare, Elisa Messina, Alessandro Giacomello, M. Roselle Abraham and Eduardo Marbán. // *Circulation*. 2007;115:896-908, published online before print February 19, - 2007- <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655209> URL : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17283259> (дата обращения 24.07.16)
13. Wystrychowski W, Patlolla B, Zhuge Y, Neofytou E, Robbins RC, Beygui RE. Multipotency and cardiomyogenic potential of human adipose-derived stem cells from epicardium, pericardium, and omentum. // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2016.-;7:84. doi:10.1186/s13287-016-0343-y. URL :<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4907285/>. (дата обращения 02.08.16)