

МЕХАНИЗМЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКЗОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ИШЕМИЗИРОВАННУЮ ТКАНЬ ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

© И. Б. Соколова, Н. Н. Павличенко

ООО «Транс-Технологии», Санкт-Петербург;
электронный адрес: natalia-z@alkorbio.ru

Клеточная терапия с помощью мезенхимных стволовых клеток (МСК) — современный, перспективный метод лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Изначальной предпосылкой для использования МСК при поражении миокарда или головного мозга послужила способность этих клеток дифференцироваться в кардиомиоциты и в клетки нейрогенного ряда. К настоящему времени экспериментально доказано, что трансплантация МСК ускоряет течение воспалительной реакции в ишемизированной ткани, активирует ангиогенез, ингибирует апоптоз и оказывает протекторное воздействие на клетки в тканевой области, пограничной с местом инфаркта. В результате уменьшаются площадь фиброзного или глиального рубца и объем поврежденной ткани, восстанавливаются функционирование поврежденного органа, поведенческий и неврологический статус экспериментальных животных.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, дифференцировка, паракринная функция, ангиогенез.

Принятое обозначение: МСК — мезенхимные стволовые клетки.

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности и инвалидизации трудоспособного населения. В экономически развитых странах с помощью современных методов лечения в большинстве случаев не удается добиться полного выздоровления у лиц, перенесших инфаркт миокарда или инсульт головного мозга. В последние десятилетия активно исследуют возможности применения мезенхимных стволовых клеток (МСК) в терапии этих заболеваний.

Изначальной предпосылкой для использования МСК при поражении миокарда или головного мозга послужила способность этих клеток дифференцироваться в кардиомиоциты и в клетки нейрогенного ряда.

Дифференцировка МСК *in vitro*

Кардиомиогенное направление. В нескольких лабораториях было показано, что обработка культуры МСК 5-азацитидином инициировала дифференцировку в клетки, подобные кардиомиоцитам (Wakitani et al., 1995; Makino et al., 1999; Fukuda, 2001; Cheng et al., 2003; Кругляков и др., 2006). Морфологическим критерием прошедшей дифференцировки служило наличие в культуре спонтанно сокращающихся «валиков» кардиомиоцитов. В популяции дифференцированных МСК была выявлена экспрессия генов GATA4 и *Nkx2.5*, которые являются факторами детерминации миокардиальных предшественников в раннем эмбриогенезе позвоночных; *коннексина 43* — гена основного белка щелевых контактов, необходимого для передачи сигнала сокращения. Также отмечали повышение экспрессии генов тропонинов *T*, *I* и

кардиотрофина 1, которые являются маркерами дифференцированных кардиомиоцитов. В культуре в кардиомиогенном направлении дифференцировалось около 15 % МСК (Fukuda, 2001; Кругляков и др., 2006).

Кроме того, *in vitro* МСК дифференцировались в кардиомиогенном направлении при совместном культивировании с неонатальными кардиомиоцитами (Fukuhara et al., 2003; Rangappa et al., 2003). Полученные клетки синтезировали белки, характерные для кардиомиоцитов, — тропонин *T*, бета-актин и миозин (тяжелая цепь).

Нейрональное направление. За последние 10 лет опубликовано огромное количество работ, посвященных дифференцировке МСК в нейроноподобные клетки *in vitro*. Для индукции нейрогенной дифференцировки применяются химические компоненты, ростовые факторы и совместное культивирование с нейронами. Следует учитывать, что недифференцированные МСК синтезируют промежуточный филамент нестин, некоторые нейроспецифические белки, включая β -III-тубулин и нейрофиламент со средней молекулярной массой NF-M, астроцит-специфический белок S100-*p* (Deng et al., 2006). Также было показано, что недифференцированные МСК в культуре экспрессируют гены нейрогенных маркеров *MAP 2*, *GFAP*, *MBP*, *GalC* и др. (Lamoury et al., 2006). Встает вопрос: возможно ли судить о нейрогенной дифференцировке МСК по экспрессии 1—2 маркеров, характерных и для недифференцированных клеток? Такие работы есть. Так, например, выявив высокую экспрессию фактора транскрипции *Sox-2* и нестина в культуре МСК после совместного культивирования с нейрогенными стволовыми клетками, сделали вывод о том, что дифференцировка в нейрогенном направлении прошла успешно (Alexanian,

2005). В другом исследовании культивирование МСК собаки в нейрогенной среде, содержащей бутилат гидроксианизола, привело к появлению нейроноподобных клеток, экспрессирующих MAP2 (Kang et al., 2008). Однако в настоящее время о дифференцировке МСК в нейрогенном направлении судят по морфологическим изменениям клеток в культуре — появлению длинных отростков и конусов роста, а также по синтезу комплекса маркерных белков нейронов, таких как нестин, NeuN, один из белков цитоскелета отростков нервных клеток Таи, нейрофила-мент-М (Woodbury et al., 2000; Levy et al., 2003; Scintu et al., 2006). Как правило, в нейрогенном направлении в культуре дифференцируется 70—80 % МСК.

Высокоэффективная индукция дифференцировки МСК в нервные клетки без дифференцировки в глиальном направлении была достигнута путем трансфекции внутриклеточным доменом *Notch1* (*NICD*) и последующей обработки некоторыми трофическими факторами (основной фактор роста фибробластов bFGF, форсколин FSK, цилиарный (глиальный) нейротрофический фактор CNTF) (Smith et al., 1986).

Дифференцировка МСК *in vivo*

Кардиомиоцитарное направление. Во многих экспериментальных работах продемонстрировано, что после трансплантации донорских МСК во взрослый миокард некоторые из этих клеток дифференцировались в кардиомиоциты (Orlic et al., 2001; Davani et al., 2003; Gojo et al., 2003; Silva et al., 2005). Иммунофлуоресцентным методом было показано, что незначительная часть введенных непосредственно в поврежденный миокард МСК через 4 нед синтезировала тропонин Т (Tang et al., 2006). В другой работе МСК, введенные внутривенно, мигрировали в зону инфаркта миокарда и экспрессировали такие маркеры кардиомиоцитов, как десмин, тропонин Т и коннексин 43 (Nagaya et al., 2004), синтезировали белки тропонин I и GATA4 (Кругляков и др., 2006).

Нейрональное направление. В настоящее время в достаточно большом количестве работ продемонстрирована возможность дифференцировки экзогенных МСК в нейрогенном и глиальном направлениях непосредственно в головном мозге. На модели ишемического инсульта у крыс было показано, что МСК, трансформированные зеленым флуоресцентным белком GFP и трансплантированные в хвостовую вену, мигрировали в пенумбрю. При этом часть из них экспрессировала нейрогенный маркер NeuN, а часть — глиальный фибриллярный кислый белок GFAP, что говорит о дифференцировке введенных МСК и в нейроны, и в глиальные клетки (Hanabusa et al., 2005; Wu et al., 2008). Есть данные о том, что в глиальном направлении дифференцируется 10, а в нейрогенном — 1 % от всех выявленных в головном мозге МСК (Chen et al., 2001). Представлены данные о том, что МСК человека в ишемизированном головном мозге крысы могли секретировать GFAP или такие нейрогенные маркеры, как нейроспецифическая энолаза NSE (Lihoshi et al., 2004), связанный с микротубулином белок MAP-2 (Li et al., 2001), β-III-тубулин, нейрофилааменты NF160, NF200, hNF70 и hNSE (Zhao et al., 2002).

В то же время некоторые исследователи не выявили дифференцировки МСК в нейрогенном направлении *in vivo*. Так, МСК, предварительно помеченные 5-бром-

2-диоксиуридином (BrdU) и трансплантированные в неонатальный мозг мыши, были выявлены в полосатом теле, молекулярном слое гиппокампа и в мозжечке. Некоторые из меченных клеток окрашивались антителами против GFAP, но не окрашивались антителами против нейрофилааментов (Koren et al., 1999). Эти результаты свидетельствуют о том, что в неонатальном мозге МСК дифференцировались в глиальных, но не в нейрогенных направлениях.

Помимо непосредственной дифференцировки в клетки поврежденной ткани терапевтический эффект от трансплантации МСК может быть получен за счет ростовых факторов и цитокинов, выделяемых этими клетками.

Паракринная функция МСК

С помощью биочипов на основе антител, содержащих 120 цитокинов, было показано, что в среде культивирования МСК в условиях нормоксии и гипоксии содержались интерлейкин IL-6, фактор роста эндотелия сосудов VEGF и хемотаксический для макрофагов белок MCP-1. В гипоксической среде концентрация факторов была выше, чем при нормоксии (Hung et al., 2007).

Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью специфических праймеров показали, что при культивировании в условиях нормоксии МСК собаки экспрессировали МРНК цитокинов TGF-β и IL-6, хемокинов IL-8, CCL 2 и CCL 5, VEGF, фактора роста гепатоцитов HGF, циклооксигеназы COX-2 и ингибиторов тканевых металлопротеиназ TIMP-1 и TIMP-2 (Kang et al., 2008). Экспрессия таких факторов, как IL-6, IL-8, CCL2, CCL5 и VEGF, усиливалась при добавлении в культуру МСК лейкоцитов.

Этим же методом показали, что МСК человека в культуре секретировали нейротрофический фактор головного мозга BDNF и фактор роста нервов β-NGF, но не выделяли нейротрофины NT-3, NT-4 и нейрорегулин 1 (Crigler et al., 2006).

Показано, что после 8-часового культивирования в условиях гипоксии МСК секретировали в значительном количестве эпидермальный фактор роста EGF, фактор роста кератиноцитов KGF, инсулиноподобный фактор роста IGF-1, VEGF-α, эритропоэтин EPO, фактор стromальных клеток SDF-1, ангиопоэтины Ang-1, Ang-2 и небольшое количество тромбоцитарного фактора роста PDGF-BB, трансформирующий фактор роста TGF-β1, фактор стволовых клеток SCF, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор G-CSF, эпидермальный фактор роста, связанный с гепарином, HB-EGF и тропонин TPO (Chen et al., 2008). По данным этой же работы, МСК экспрессировали большое количество макрофаговых вспомогательных белков МПМа и MDP-β. Вообще, в данном исследовании (Chen et al., 2008) было показано, что в условиях гипоксии среда культивирования МСК содержала 50 цитокинов.

С помощью иммуноферментного анализа было показано, что при культивировании МСК в среде с добавлением 20 % экстракта ткани головного мозга после ишемического инсульта в супернатанте повышался уровень BDNF, NGF, VEGF и HGF (Chen et al., 2002). Было показано, что *in vitro* МСК производят ряд интерлейкинов: IL-1, 6, 7, 8, 11, 12, 14 и 15, но не секретируют IL-2, 3, 4, 10 и 13 (Deans, Moseley, 2000).

К настоящему времени в литературе практически не опубликовано данных о том, какие факторы секретируют экзогенные МСК непосредственно в зоне повреждения миокарда или головного мозга. Однако в экспериментах *in vivo* показано, что в ипсилатеральном полушарии головного мозга после ишемического инсульта значительно повышалось количество основного фактора роста фибробластов bFGF (Chen et al., 2003a), BDNF, NGF (Li et al., 2002) и VEGF (Chen et al., 2003b). Можно предположить, что экзогенные МСК способны секретировать эти факторы непосредственно в поврежденном органе или стимулировать их выработку клетками окружающей ткани. Многие исследователи склонны предполагать, что паракринные функции МСК *in vitro* и *in vivo* примерно идентичны.

Миграция МСК

К настоящему времени в многочисленных экспериментальных исследованиях показано, что при любом способе трансплантации — в венозную или артериальную кровь, непосредственно в поврежденный орган — МСК мигрируют в область тканевого повреждения. Это объясняют следующим образом. В месте воспаления повышается секреция хемокинов SDF-1, фракталкина, MCP-1 и MGP-1; а МСК — это клетки с высоким уровнем экспрессии CXCR4 — рецептора к SDF-1 и CX₃CR1 — рецептора к фракталкину, что и приводит к направленной миграции (Feng et al., 2004; Shichinohe et al., 2007; Wang et al., 2008). Практически во всех экспериментальных работах, посвященных клеточной терапии инфаркта миокарда и ишемического инсульта, трансплантированные МСК были выявлены в тканевой области, пограничной с повреждением. При любой сердечно-сосудистой патологии практически все исследователи наблюдали одни и те же терапевтические эффекты после трансплантации МСК.

Регуляция воспалительной реакции

Ускорение течения воспалительной реакции в месте тканевого повреждения было отмечено на моделях инфаркта миокарда и ишемического инсульта. После окклюзии коронарной или среднемозговой артерии у крыс процесс воспаления в зоне повреждения у контрольных животных протекал в 2 раза медленнее, чем у животных, которым была проведена внутривенная трансплантация МСК (Кругляков и др., 2004; Зинькова и др., 2007).

Как известно, клетки, инфильтрирующие очаг тканевого повреждения (макрофаги, лимфоциты, нейтрофилы и др.), продуцируют цитокины, регулирующие течение воспалительной реакции. Ряд факторов, таких как IL-1 и фактор некроза опухоли TNF, повышают проницаемость стенок сосудов, активируют нейтрофилы и моноциты, т. е. стимулируют процесс воспаления. Другие вещества — IL-4 и IL-11 — способствуют снижению количества провоспалительных цитокинов; TGF ингибирует активность IL-1, IL-6 и TNF, IL-2 — макрофагов, т. е. угнетают реакцию воспаления.

Как уже было отмечено в разделе, посвященном паракринной функции, МСК *in vitro* секретируют практически все факторы (кроме IL-2), регулирующие течение воспаления. Вероятно, после трансплантации МСК мигрируют к месту тканевого воспаления и в данной физиологической

нише под воздействием окружающей среды выделяют ряд факторов, которые в конечном счете приводят к более быстрому завершению процесса воспаления.

Активация ангиогенеза

Активация ангиогенеза в ткани, пограничной с местом повреждения, была выявлена во всех исследованных моделях инфаркта миокарда и ишемического инсульта, которые были вызваны резким нарушением кровообращения (Кругляков и др., 2004; Зинькова и др., 2007). Это важнейший результат клеточной терапии, так как для нормализации метаболизма в ишемизированной ткани необходимо восстановить микроциркуляцию.

Неоваскуляризация может проходить за счет дифференцировки экзогенных МСК непосредственно в эндотелиальные клетки (ЭК). *In vitro* было показано, что МСК, положительные по CD105, CD73, CD166, CD90 и CD44, но негативные по CD34, CD133, VEGFR1, VEGFR2, VE-cadherin, VCAM-1 и фактору фон Виллебрандта vWF, при культивировании в 2%-ной сыворотке эмбрионов коров с добавлением VEGF через 7 сут дифференцировались в эндотелиоцитоподобные клетки и экспрессировали VEGFR1, VEGFR2, VE-cadherin, VCAM-1 и vWF (Oswald et al., 2004). Совместное культивирование МСК человека и ЭК кролика в течение 5 сут привело к тому, что более 25 % клеток начали экспрессировать тирокиназный receptor Flk-1vWF (Wu et al., 2005). Кроме того, на трехмерных матрицах в условиях гипоксии МСК формировали структуры, подобные капиллярным сетям (Annabi et al., 2003; Ball et al., 2007).

Возможность дифференцировки МСК в эндотелиоциты *in vivo* продемонстрирована в нескольких экспериментальных работах (Al-Khalidi et al., 2003; Silva et al., 2005). Было показано, что меченные эндогенные клетки находятся в стенках сосудов в пограничной с повреждением зоне и экспрессируют vWF (Chen et al., 2003b). На модели инфаркта миокарда у взрослых крыс продемонстрировали, что после внутривенной трансплантации МСК в ишемизированной области сердечной мышцы в 1.4 раза возрастала плотность капиллярной сети по сравнению с контрольной группой (Nagaya et al., 2004). При этом некоторые из экзогенных МСК секретировали vWF, что указывает на их дифференцировку в эндотелиальные клетки сосудистой стенки. Некоторые исследователи не выявили донорских клеток или их метки в стенках вновь образованных сосудов (Wu et al., 2007).

Часть ученых придерживается мнения о том, что активация ангиогенеза в пограничной с инфарктом области сердца происходит за счет того, что МСК выделяют ряд ростовых факторов, стимулирующих рост сосудов и их созревание. С помощью методики Вестерн-блот было показано, что после трансплантации МСК в данную тканевую зону в ней значительно повышался уровень bFGF, VEGF и SDF-1 α (Tang et al., 2005). На модели ишемического инсульта у крыс продемонстрировали, что после внутривенной трансплантации человеческих МСК в ткани головного мозга, пограничной с повреждением, уровень VEGF увеличивался в 1.7 раза по сравнению с контрольной группой (Chen et al., 2003b). VEGF — основной регулятор ангиогенеза как в эмбриональном, так и в постнатальном периодах развития организма. VEGF стимулирует пролиферацию и миграцию ЭК, их предшественников и моноцитов, имеющих рецепторы к нему.

Под воздействием этого ростового фактора увеличивается проницаемость сосудистых стенок, способствуя выходу белков плазмы в околососудистое пространство; индуцируются экспрессия эндотелиальной NO-синтазы и образование NО, что необходимо для миграции ЭК.

В процессе стабилизации и созревания вновь образованных сосудов участвуют: Ang-1, который подавляет пролиферацию ЭК, уменьшает сосудистую проницаемость и способствует привлечению перицитов; PDGF, привлекающий перициты и гладкомышечные клетки; TGF- β 1, стимулирующий синтез белков матрикса (Парфенова, Ткачук, 2007). Способность экзогенных МСК секretировать VEGF и (или) стимулировать выделение этого фактора клетками поврежденной ткани — одна из основных предпосылок для применения этих клеток в терапии ишемических заболеваний.

Однако, вероятнее всего, влияние МСК на процесс ангиогенеза не сводится к выделению VEGF. Была проведена работа, в которой сравнивалось влияние МСК и VEGF на активацию ангиогенеза в зоне инфаркта миокарда. Показали, что плотность микрососудистой сети в первом случае была значительно больше, чем во втором (Shyu et al., 2006). Скорее всего, повышение плотности микрососудистой сети в ишемизированной ткани после трансплантации МСК вызвано и прямой дифференцировкой МСК в ЭК, и их паракринной функцией, и способностью МСК стимулировать эндогенные reparативные процессы (как известно, в ишемизированной ткани запускается ограниченный неоангиогенез).

Протекторная функция МСК

Основная задача терапии (в том числе и клеточной) при лечении инфаркта миокарда и ишемического инсульта — сохранить жизнеспособность клеток в зоне, прилегающей к месту повреждения ткани.

Экспериментально доказано, что применение МСК ингибировало апоптоз клеток в пограничной с повреждением зоне. С помощью TUNEL-метода было показано, что внутривенная трансплантация МСК после ишемического инсульта у крыс уменьшила количество апоптотических клеток в зоне пенумбры примерно в 1.5—1.8 раза (Chen et al., 2003a; Hanabusa et al., 2005; Wu et al., 2008).

К настоящему времени выявлен ряд трофических факторов, оказывающих нейропротекторное влияние посредством связывания свободных радикалов, понижения апоптотической активности и ускорения течения воспалительной реакции: GDNF, BDNF, NGF, EGF и bFGF (Hirouchi, Urai, 2002). Такие факторы, как IGF-I (Suleiman et al., 2007), IL-10 (Zymek et al., 2007; Dhingra et al., 2009), кардиотрофин CT-1 (Gritman et al., 2006) и др., ингибируют гибель кардиомиоцитов после инфаркта. Ростовые факторы IGF, TGF- β и HB-EGFрабатываются взрослыми кардиомиоцитами и действуют как аутокринные стимуляторы роста для клеток сердца (Toma et al., 2002). Эти же вещества МСК секрецируют *in vitro* и, вполне вероятно, могут вырабатывать их в ишемизированной ткани, ингибируя апоптоз и стимулируя рост новых клеток.

Выживанию клеток, поврежденных морфологически по гиперхромному типу, но не погибших, безусловно, способствует и развитие микроциркуляторной сети в пограничной с повреждением зоне (что обсуждалось выше). С ростом микрососудов восстанавливаются газообмен и поступление питательных веществ из крови к клеткам.

Уменьшение объема поврежденной ткани и площади рубца

Восстановление микроциркуляции и сохранение жизнеспособности клеток в ишемизированной тканевой области приводили к уменьшению объема зоны некроза как после инфаркта миокарда, так и после ишемического инсульта (Lihoshi et al., 2004; Hanabusa et al., 2005; Tang et al., 2006; Зинькова и др., 2007; Wu et al., 2008). На модели ишемического инсульта у крыс было показано, что объем повреждения ткани мозга зависит от сроков внутривенной трансплантации МСК (через 3, 6, 12, 24 и 72 ч после окклюзии средней мозговой артерии) — чем позже введены клетки, тем больше тканевое повреждение. Но трансплантация даже через 72 ч привела к уменьшению объема повреждения по сравнению с контролем (180 ± 22 и 285 ± 55 мм^3 соответственно) (Lihoshi et al., 2004).

Трансплантация МСК как после инфаркта миокарда, так и после ишемического инсульта у крыс привела к формированию фиброзного рубца в сердце и глиального рубца в головном мозге меньшей площади, чем в контрольных группах животных (Li et al., 2005; Соколова и др., 2007; Wu et al., 2007). Помимо уменьшения площади рубца после применения МСК были отмечены некоторые изменения в его структуре. Так, в рубце после инфаркта миокарда было выявлено большое количество эластических волокон, что делало его менее ригидным, более подвижным и способным к сокращению (Кругляков и др., 2004).

Положительный эффект клеточной терапии с помощью МСК был выявлен не только на морфологическом уровне в тканях сердца или мозга, но и на функциональном уровне и при проведении поведенческого и неврологического тестирования животных. Трансплантация МСК после инфаркта миокарда приводила к уменьшению дилатации полостей желудочков (Кругляков и др., 2004), увеличению фракции выброса левого желудочка и значительному понижению конечного систолического объема левого желудочка (Dai et al., 2005; Martin-Rendon et al., 2008). Внутривенное введение МСК после ишемического инсульта способствовало восстановлению когнитивного поведения животных (Lihoshi et al., 2004; Pavlichenko et al., 2008), двигательно-исследовательской активности (Chen et al., 2003a; Lihoshi et al., 2004) и неврологического статуса (Chen et al., 2001; Hanabusa et al., 2005).

Экспериментальные исследования возможностей клеточной терапии при сердечно-сосудистых заболеваниях выявили очень важный аспект, имеющий отношение к практической медицине: внутривенная трансплантация МСК может быть отсрочена на несколько суток, и при этом полученный результат не хуже, чем при трансплантации МСК во время «терапевтического окна». Так, после инфаркта миокарда внутривенное введение МСК проводили в день операции, через 2, 7 и 14 сут. Комплексная морфологическая, морфометрическая и функциональная оценка результатов показала, что при сроках трансплантации до 7 сут включительно получен одинаковый положительный терапевтический эффект (Кругляков и др., 2005). После ишемического инсульта внутривенная трансплантация МСК может быть проведена в течение 4—7 сут без видимого ухудшения полученных результатов (Li et al., 2005; Зинькова и др., 2007). Но и применение МСК даже через 1 мес после ишемического инсульта также приводило к восстановлению неврологического статуса животных (Shen et al., 2007).

Итак, трансплантация МСК имеет несомненное терапевтическое значение при лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Основным результатом клеточной терапии является повышение плотности микрососудистой сети в ткани, пограничной с местом ишемического повреждения; в этой же тканевой зоне сохраняется жизнеспособность кардиомиоцитов или нейронов; ускоряется течение воспалительной реакции в месте повреждения и сроки формирования посттравматического рубца; заметно уменьшается объем ишемического повреждения ткани. Стимуляция reparативных процессов ткани поврежденного органа (сердца или головного мозга) приводит к восстановлению его функций и неврологического и поведенческого статуса животных.

Список литературы

- Зинькова Н., Гилерович Е., Соколова И., Шведова Е., Билибина А., Кругляков П., Полянцев Д. 2007. Влияние трансплантации мезенхимных стволовых клеток на динамику морфологических изменений в головном мозге крыс после ишемического инсульта. Цитология. 49 (11) : 923—932.
- Кругляков П., Соколова И., Аминева Х., Некрасова Н., Вийде С., Чередниченко Н., Зарницкий А., Семернин Е., Кислякова Т., Полянцев Д. 2004. Терапия экспериментального инфаркта миокарда у крыс с помощью трансплантации сингенных мезенхимных стволовых клеток. Цитология. 46 (12) : 1043—1054.
- Кругляков П., Соколова И., Аминева Х., Некрасова Н., Вийде С., Чередниченко Н., Зарницкий А., Семернин Е., Кислякова Т., Полянцев Д. 2005. Влияние сроков трансплантации мезенхимных стволовых клеток на репарацию сердечной мышцы крыс после инфаркта. Цитология. 47 (5) : 404—416.
- Кругляков П., Соколова И., Зинькова Н., Вийде С., Александров Г., Петров Н., Полянцев Д. 2006. Дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток в кардиомиогенном направлении *in vitro* и *in vivo*. Клеточные технологии в биологии и медицине. 4 : 194—197.
- Парфенова Е., Ткачук В. 2007. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы. Кардиологический вестник. 2 (2) : 3—23.
- Соколова И., Зинькова Н., Билибина А., Кругляков П., Гилерович Е., Полянцев Д., Отеллин В. 2007. Возможности применения клеточной терапии при лечении ишемического инсульта в эксперименте. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2 (4) : 54—62.
- Alexanian A. 2005. Neural stem cells induce bone-marrow-derived mesenchymal stem cells to generate neural stem-like cells via juxtacrine and paracrine interaction. *Exp. Cell Res.* 310 (2) : 383—391.
- Al-Khalidi A., Eliopoulos N., Martineau D., Lejeune L., Lachapelle K., Galipeau J. 2003. Postnatal bone marrow cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response *in vivo*. *Gene Ther.* 10 : 621—629.
- Annabi B., Lee Y., Turcotte S., Naud E., Desrosiers R., Champagne M., Eliopoulos N., Galipeau J., Beliveau R. 2003. Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells*. 107 : 2078—2081.
- Ball S., Shuttieworth C., Kiely C. 2007. Mesenchymal stem cells and neovascularization: role of platelet-derived growth factor receptors. *J. Cell Mol. Med.* 11 (5) : 1012—1030.
- Chen J., Li Y., Katakowski M., Chen X., Wang L., Lu D., Lu M., Gautam S., Chopp M. 2003a. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J. Neurosci. Res.* 73 : 778—786.
- Chen J., Li Y., Wang L., Zhang Z., Lu D., Lu M., Chopp M. 2001. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 32 : 1005—1011.
- Chen J., Zhang Z., Li Y., Wang L., Xu Y., Gautam S., Lu M., Zhu Z., Chopp M. 2003b. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ. Res.* 92 : 692—699.
- Chen L., Tredget E., Wu P., Wu Y. 2008. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *Plos One*. 3 : 1—3.
- Chen X., Li Y., Wang L., Katakowski M., Zhang L., Chen J., Xu Y., Gautam S., Chopp M. 2002. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology*. 22 : 275—279.
- Cheng F., Zou P., Yang H., Yu Z., Zhong Z. 2003. Induced differentiation of human cord blood mesenchymal stem/progenitor cells into cardiomyocyte-like cells *in vitro*. *J. Huazhohg Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 23 : 154—157.
- Crigler L., Robey R., Asawachaicharn A., Gaupp D., Phinney D. 2006. Human mesenchymal stem cells subpopulations express a variety of neuroregulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp. Neurol.* 198 : 54—64.
- Dai W., Hale S., Martin B., Kuang J., Dow J., Wold L., Kloner R. 2005. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation*. 112 : 214—223.
- Davani S., Marandin A., Royer B., Kantelip B., Herve P., Etienne J., Kantelip J. 2003. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation*. 108 : 253—258.
- Deans R., Moseley A. 2000. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.* 28 : 875—884.
- Deng J., Petersen B., Steinbauer D., Jorgensen M., Laywell E. 2006. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells*. 24 : 1054—1064.
- Dhingra S., Sharma A., Arora R., Slezak J., Singal P. 2009. IL-10 attenuates TNF-alpha-induced NF kappaB pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 82 (1) : 59—66.
- Feng J., He B., Dheen S., Tay S. 2004. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells*. 22 : 415—427.
- Fukuda K. 2001. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif. Organs*. 25 : 187—193.
- Fukuhara S., Tommita S., Yamashiro S., Morisaki T., Yutani C., Kitamura S., Nakatani T. 2003. Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage *in vitro*. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 125 : 1470—1480.
- Gojo S., Gojo N., Takeda Y., Mori T., Abe H., Kyo S., Hata J., Umezawa A. 2003. *In vivo* cardiovasculogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* 288 : 51—59.
- Gritman K., Van Winkle D., Lorentz C., Pennica D., Habecker B. 2006. The lack of cardiotrophin-1 alters expression of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor mRNA but does not impair cardiac injury response. *Cytokine*. 36 (1—2) : 9—16.
- Hanabusa K., Nagaya N., Iwase T., Itoh T., Murakami S., Shimizu Y., Taki W., Miyatake K., Kangawa K. 2005. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of mesenchymal stem cells after experimental stroke in rats. *Stroke*. 36 : 853—858.
- Hirouchi M., Ukai Y. 2002. Current state on development of neuroprotective agents for cerebral ischemia. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 120 : 107—113.
- Hung S., Pochampally R., Chen S., Hsu S., Prockop D. 2007. Angiogenic effects of human multipotent stromal cells conditioned medium activates the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells*. 31 : 1—15.
- Iihoshi S., Honmou O., Houkin K., Hashi K., Kocsis J. 2004. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res.* 1007 (1—2) : 1—9.

- Kang J., Kang K., Koo H., Park J., Choi E., Park Y. 2008. Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Develop.* 17 : 681—694.
- Kopen G., Prockop D., Phinney D. 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Cell Biol.* 96 : 10 711—10 716.
- Lamoury F., Croitoru-Lamoury J., Brew B. 2006. Undifferentiated mouse mesenchymal stem cells spontaneously express neural and stem cell markers Oct-4 and Rex-1. *Cytotherapy.* 8 (3) : 228—242.
- Levy Y., Merims D., Panet H., Barhum Y., Melamed E., Ofen D. 2003. Induction of neuron-specific enolase promoter and neuronal markers in differentiated mouse bone marrow stromal cells. *J. Mol. Neurosci.* 21 (2) : 121—132.
- Li Y., Chen J., Chen X., Wang L., Gautam S., Xu Y., Katakowski M., Zhang L., Lu M., Janakiraman N., Chopp M. 2002. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat. *Neurology.* 59 : 514—523.
- Li Y., Chen J., Wang L., Lu M., Chopp M. 2001. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology.* 56 : 1666—1672.
- Li Y., Chen J., Zhang C., Wang L., Lu D., Katakowski M., Gao Q., Shen L., Zhang J., Lu M., Chopp M. 2005. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia.* 49 (3) : 407—417.
- Lihoshi S., Honmou O., Houkin K., Hashi K., Kocsis J. 2004. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res.* 1007 (1—2) : 1—9.
- Makino S., Fukuda K., Miyoshi S., Konishi F., Kodama H., Pan J., Sano M., Takahashi T., Hori S., Ade H., Hata J., Umezawa A., Ogawa S. 1999. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 103 : 697—705.
- Martin-Rendon E., Brunskill S., Hyde C., Stanworth S., Mathur A., Watt S. 2008. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur. Heart J.* 29 : 1807—1818.
- Nagaya N., Fujii T., Iwase T., Ohgushi H., Itoh T., Uematsu M., Yamagishi M., Mori H., Kangawa K., Kitamura S. 2004. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287 (6) : H2670—2676.
- Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D., Leri A., Anversa P. 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 410 : 701—705.
- Oswald J., Boxberger S., Jorgensen B., Feldmann S., Ehninger G., Bornhauser M., Werner C. 2004. Mesenchymal stem cells can differentiate into endothelial cells *in vitro*. *Stem Cells.* 22 : 377—384.
- Pavlichenko N., Sokolova I., Vijde S., Shvedova E., Alexandrov G., Krouglyakov P., Fedotova O., Gilerovich E., Polyntsev D., Otellin V. 2008. Mesenchymal stem cells transplantation could be beneficial for treatment of experimental ischemic stroke in rats. *Brain Res.* 1233 : 203—213.
- Rangappa S., Entwistle J., Wechsler A., Kresh J. 2003. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 126 : 124—132.
- Shen L., Chen J., Zacharek A., Gao Q., Kapke A., Lu M., Ruginski K., Vanguri P., Smith A., Chopp M. 2007. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27 (1) : 6—13.
- Scintu F., Reali C., Pillai R., Badiali M., Sanna M., Argioli F., Ristaldi M., Sogos V. 2006. Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. *BMC Neurosci.* 16 : 7—14.
- Shichinohe H., Kuroda S., Yano S., Hida K., Iwasaki Y. 2007. Role of SDF-1/CXCR4 system in survival and migration of bone marrow stromal cells after transplantation into mice cerebral infarct. *Brain Res.* 1183 : 138—147.
- Shyu K., Wang B., Hung H., Chang C., Shih D. 2006. Mesenchymal stem cells are superior to angiogenic growth factor genes for improving myocardial performance in the mouse model of acute myocardial infarction. *J. Biomed. Sci.* 13 (1) : 47—58.
- Silva G., Litovsky S., Assad J., Sousa A., Martin B., Vela D., Coulter S., Lin J., Ober J., Vaughn W., Branco R., Oliveira E., He R., Geng Y., Wilierson J., Perin E. 2005. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation.* 111 : 150—156.
- Smith G., Miller R., Silver J. 1986. Changing role of forebrain satrocytes during development, regenerative failure, and induced regeneration upon transplantation. *J. Comp. Neurol.* 251 (1) : 23—43.
- Suleiman M., Singh R., Stewart C. 2007. Apoptosis and the cardiac action of insulin-like growth factor 1. *Pharmacol. Ther.* 114 (3) : 278—294.
- Tang J., Xie Q., Pan G., Wang J., Wang M. 2006. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 30 (2) : 353—361.
- Tang Y., Zhao Q., Qin X., Shen L., Ge J., Phillips M. 2005. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann. Thorac. Surg.* 80 (1) : 229—236.
- Toma C., Pittenger M., Cahill K., Byrne B., Kessler B. 2002. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 105 : 93—98.
- Wakitani S., Saito T., Caplan A. 1995. Myogenic derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* 18 : 1417—1426.
- Wang Y., Deng Y., Zhou G. 2008. SDF-1alpha/CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic i brain lesion in a rat model. *Brain Res.* 1195 : 104—112.
- Woodbury D., Schwarz E., Prockop D., Black L. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61 (4) : 364—370.
- Wu J., Sun Z., Sun H., Wu J., Weisel R., Keating A., Li Z., Feng Z., Li R. 2008. Intravenously administered bone marrow cells migrate to damaged brain tissue and improve neural function in ischemic rats. *Cell Transplantation.* 16 : 993—1005.
- Wu X., Huang L., Zhou Q., Song Y., Li A., Jin J., Cui B. 2005. Mesenchymal stem cells participating in ex vivo endothelial repair and its effect on vascular smooth muscle cells growth. *Int. J. Cardiol.* 105 : 621—629.
- Wu Y., Chen L., Scott P., Tredger E. 2007. Mesenchymal stem cells / enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells.* 9 : 1—11.
- Zhao L., Duan W., Reyes M., Keene C., Verfaillie C., Low W. 2002. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp. Neurol.* 174 (1) : 11—20.
- Zymek P., Nah D., Bujak M., Ren G., Koerting A., Leucker T., Huebener P., Taffet G., Entman M., Frangogiannis N. 2007. Interleukin-10 is not a critical regulator of infarct and left ventricular remodeling. *Cardiovasc. Res.* 74 (2) : 313—322.

POSSIBLE WAYS OF MSCs INFLUENCE ON THE ISHEMIC TISSUE
IN THE CASE OF CARDIOVASCULAR DISEASES

I. B. Sokolova, N. N. Pavlichenko

Trans-Technologies, Ltd., St. Petersburg;
e-mail: natalia_z@alkorbio.ru

Mesenchymal stem cells (MSCs) therapy is a modern and promising approach to the treatment of cardiovascular diseases. The background of MSCs therapeutic usage was their ability to differentiate into cardiomyocytes and neuronal lineage cells. It has been experimentally proven that MSCs transplantation accelerates inflammation in the ischemic region, activates angiogenesis, prevents apoptosis and acts as a protective agent in the areas adjacent to infarction. This reduces the size of the scar and the volume of damaged tissue, restores the functioning of the injured organ, and returns the standard rates of behavioral and neurological reactions of the experimental animals.

K e y w o r d s: mesenchymal stem cells, differentiation, paracrine function, angiogenesis.