

АКТИВАЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

© П. М. Докшин,¹ А. А. Карпов,² Ш. Д. Эйвазова,² М. В. Пузанов,²
А. А. Костарева,² М. М. Галагудза,² А. Б. Малашичева^{1, 2, *}

¹ С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034, и
² Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, 197341;
* электронный адрес: amalashicheva@gmail.com

Развитие сердечной недостаточности вследствие острого инфаркта миокарда сопровождается массовой некротической гибелью кардиомиоцитов в очаге повреждения и последующим патологическим ремоделированием сердца. Традиционно считали, что в постнатальном периоде возможности репарации сердца сильно ограничены или отсутствуют. Однако недавно были описаны эндогенные стволовые клетки сердца, имеющие регенеративный потенциал, но механизм активации этих клеток остается малоизученным. Цель нашей работы — получение стволовых клеток сердца из ишемизированного участка миокарда и сравнение по функциональным свойствам со стволовыми клетками сердца, выделенными из здорового участка миокарда. Оценку степени дифференцировки клеток проводили методом количественной ПЦР на гены-маркеры дифференцировки, а также окрашивали дифференцированные клетки иммуноцитохимическим методом на специфические маркеры. Стволовые клетки сердца из зоны инфаркта обладали более высоким пролиферативным потенциалом и имели большую склонность к миграции, чем клетки здорового участка сердца. Уровень активации ряда специфических маркеров кардиогенной, остеогенной и адипогенной дифференцировки при индукции соответствующей дифференцировки был выше у клеток из зоны инфаркта по сравнению с клетками здорового участка миокарда. Таким образом, ишемическое воздействие на миокард при инфаркте приводит к активации внутреннего регенеративного потенциала стволовых клеток сердца.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, механизмы активации репарации сердца, сердечные стволовые клетки.

Принятые сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, ЗК — клетки из здорового участка, ПИК — перинфарктные клетки, ПЦР — полимеразная цепная реакция, СКС — стволовые клетки сердца.

Развитие инфаркта миокарда возникает в результате сужения просвета коронарной артерии, кровоснабжающей миокард, что приводит к массовой некротической гибели кардиомиоцитов в очаге повреждения и последующему патологическому ремоделированию сердца (Vuja, 2005; Towbin, 2007; Reed et al., 2017). Восстановление сократительной функции сердца и регенерация миокарда после ишемического повреждения являются актуальными вопросами современной регенеративной медицины и клеточной биологии.

Традиционно во взрослом сердце млекопитающих выделяли два типа клеток — сократительные «рабочие» кардиомиоциты, которые формируют миокард камер желудочков и предсердий, а также клетки-водители ритма, формирующие проводящую систему сердца и отвечающие за функции автоматизма и проводимости. Долгое время считали, что сердце — терминально детерминированный орган, в котором отсутствуют процессы тканеспецифичной регенерации (Severs, 2000). Однако недавно были описаны эндогенные стволовые клетки сердца (СКС) млекопитающих, на определенных стадиях развития взрослого организма сохраняющие свой регенеративный потенциал (Anversa, Kajstura, 1998; Beltrami et al.,

2003; Oh et al., 2003). Считают, что СКС представляют собой гетерогенную группу клеток, рассредоточенных по всему сердцу (предсердия, желудочки, эпикард или перикард). Полагают, что в определенных условиях они способны к ограниченной регенерации ткани миокарда *in vivo*. СКС в постнатальном периоде имеют характерные признаки стволовых клеток, такие как способность к самообновлению, клоногенность и мультипотентность, а также возможность дифференцироваться в кардиомиоциты, гладкомышечные и эндотелиальные клетки (Beltrami et al., 2003; Urbanek et al., 2005).

Популяции СКС неоднородны и занимают определенные ниши в миокарде. Различные популяции СКС определяют, используя различные маркеры стволовых клеток при фенотипировании (Zhou et al., 2001; Beltrami et al., 2003; Oh et al., 2003; Wessels, Pérez-Pomares, 2004; Laugwitz et al., 2005; Smith et al., 2007). В настоящее время принято говорить о существовании различных ниш эндогенных стволовых клеток сердца, особенности клеточного устройства которых сейчас активно изучаются (Mocchetti et al., 2015; Le, Chong, 2016).

Участие популяций СКС в регенеративных процессах показано на некоторых экспериментальных моделях (Lin-

ke et al., 2005; Bearzi et al., 2007; Anversa et al., 2013), однако молекулярные механизмы, лежащие в основе таких изменений, остаются неясными (Le, Chong, 2016). Активная пролиферация СКС близ очага повреждения миокарда была показана исследователями в модели острого инфаркта (Beltrami et al., 2001). Это открытие способствовало рассмотрению роли гипоксии в активации репаративных свойств СКС в миокарде (Kimura et al., 2015).

Недавно было показано (Nakada et al., 2016), что снижение концентрации кислорода в камере, в которой находились мыши после индукции инфаркта миокарда, вызывало усиленный регенеративный ответ *in vivo* с уменьшением степени фиброза миокарда и улучшением систолической функции левого желудочка. Была высказана гипотеза, согласно которой гипоксическое воздействие может являться активационным стимулом для СКС (Nakada et al., 2016). Является ли повреждающее гипоксическое воздействие стимулом для активации стволового потенциала СКС, остается неясным.

Целью данной работы было сравнить СКС, происходящие из перинфарктной зоны миокарда, с СКС из участка здорового миокарда в экспериментальной модели острого гипоксического повреждения. СКС сравнивали по функциональным свойствам — скорости роста, способности к миграции и дифференцировке.

Материал и методика

Исследование проводили на базе Научно-исследовательской лаборатории молекулярной кардиологии Научно-исследовательского института молекулярной биологии и генетики Национального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова. Для проведения экспериментов на животных было получено разрешение локального этического комитета Национального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова. Все эксперименты проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации.

Индукция гипоксии *in vivo* и выделение клеток. Развитие инфаркта миокарда передней стенки левого желудочка сердца крыс Wistar индуцировали перманентной перевязкой левой коронарной артерии (Карпов и др., 2014). Через 3 сут из ишемизированного участка получали СКС путем измельчения фрагмента ткани миокарда и последующей ферментативной обработки коллагеназой А (0.7 мг/мл) в течение 2 ч при 37 °С (Худяков и др., 2013а); в качестве контроля использовали участок здорового миокарда. Через 1 сут среду заменяли на свежую, удаляли крупные остатки и затем культивировали до достижения конфлюэнтного состояния (приблизительно через 5—7 сут). По достижении конфлюэнтного состояния культура состояла из мелких однородных быстро делящихся клеток. Иммунофенотипирование клеток проводили с использованием моноклональных антител к CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD146 и CD166 (BD, США) по стандартной методике (Худяков и др., 2013а).

Культивирование клеток. Суспензию клеток высевали на 10-сантиметровые чашки Петри в среду, содержащую 70 % DMEM/F12 (Invitrogen, США), 20 % ECM (Invitrogen, США), 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (HyClone), 100 мкМ раствор аминокислот MEM NEAA (Gibco, США), смесь пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) (Gibco, США),

2 мМ L-глутамин (Gibco, США) и культивировали при 37 °С, 5 % CO₂ и 99%-ной влажности. В полученной культуре живые кардиомиоциты отсутствовали, и популяция клеток была однородной. Культуральную среду меняли каждые 2 сут. В работе использовали клетки 4—10-го пассажей.

Скорость пролиферации СКС оценивали методом построения кривых роста. Клетки рассеивали при плотности 10³ кл./см². Каждые 2 сут производили подсчет клеток в камере Горяева.

Скорость миграции оценивали методом нанесения царапины: после образования монослоя в культуре среду меняли на бессывороточную, содержащую гидроксимочевину (10 мМ) для подавления пролиферации и фактор роста PDGF-BB (10 нг/мл) (Костина и др., 2013). На дно культуральной чашки, покрытой слоем клеток, наносили царапину и затем подсчитывали число клеток, покрывших царапину, через 12, 24 и 36 ч.

Оценка дифференцировочного потенциала СКС. Дифференцировку индуцировали в трех направлениях — кардиогенном, остеогенном и адипогенном. Клетки высевали при плотности 10⁴ кл./см². На следующий день среду заменяли на дифференцировочную (DMEM/F12, содержащую 2 % лошадиной сыворотки, 100 мкМ раствор аминокислот MEM (Gibco, США), 1 % инсулин-трансферрин-селена (Invitrogen, США), смесь пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) (Gibco, США). При индукции дифференцировки в кардиоогенном направлении среду заменяли на дифференцировочную, содержащую 5 мкМ 5-азациитидина (Sigma-Aldrich, США) на следующие сутки после начала культивирования клеток. Далее в течение следующих 3 сут ежедневно обновляли среду с добавлением 5-азациитидина (5 мкМ). На 6-е сут с момента начала индукции дифференцировки к среде добавляли аскорбиновую кислоту (10⁻⁴ М) (Sigma-Aldrich, США), и 1 нг/мл TGF-β1 (Pepro- tech, США). Начиная с этого момента аскорбиновую кислоту (10⁻⁴ М) добавляли 1 раз в 2 сут, а 1 нг/мл TGF-β1 — 2 раза в неделю. Замену среды проводили каждые 2—3 сут. Продолжительность дифференцировки составляла 24 сут (Худяков и др., 2013б). Для индукции остеогенной дифференцировки на следующий день от начала культивирования клеток среду заменяли на дифференцировочную, содержащую 50 мкМ аскорбиновой кислоты, 1 мкМ дексаметазона и 10 мМ бета-глицеролфосфата (Sigma, США). Дифференцировочную среду обновляли 2 раза в неделю и культивировали клетки в течение 21 сут. Для индукции адипогенной дифференцировки использовали среду, содержащую 0.5 мМ 3-изобутил-1-метилксантина, 1 мкМ дексаметазона, 1 мкМ инсулина, 0.2 мМ индометацина и 0.5 мМ росиглитазона (Sigma, США). Дифференцировочную среду обновляли 2 раза в неделю. Продолжительность дифференцировки составляла 14 сут.

Иммуноцитохимическое мечение клеток. Полученные в результате дифференцировки кардиогенные клетки, культивируемые на предметных стеклах, переносили в чашки Петри (10 см) и фиксировали 4%-ным параформальдегидом 12 мин на льду. Затем удаляли супернатант и промывали 3 раза по 5 мин натрий-фосфатным буферным раствором (НФБ), добавляли 0.5%-ный раствор Тритона X-100 на НФБ на 3 мин. Стекла с клетками промывали НФБ 3 раза по 5 мин и инкубировали 40 мин в 1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) на НФБ. Затем удаляли раствор и гидрофоб-

Последовательности праймеров, используемых для количественной ПЦР

Праймер	Прямой праймер (5'—3')	Обратный праймер (5'—3')
<i>Vim</i>	TGCCAACCGGAACAACGAT	ACTGCACCTGTCTCCGGTA
<i>Fabp4</i>	TGGGCGTGGAATTCGATGAA	CACATGTACCAGGACCCAC
<i>Runx2</i>	TCCCTCCGAGACCCTAAGAAA	GCTGCTCCCTTCTGAACCTAC
<i>BMP2</i>	CTGCCATGGGGAATGTCCTT	TGCACTATGGCATGGTTGGT
<i>TNNT2</i>	CAGGCTCTTCATGCCCAACT	GCTCGTTCAGGTCCTTCTCC
<i>GAPDH</i>	CCAGTATGACTCTACCCACG	CATTTGATGTTAGCGGGATCTC

ным маркером ограничивали область вокруг покровных стекол. Разводили первичные антитела к α -актину в соотношении 1 : 200 (Invitrogen, США) в растворе БСА и наносили на стекла. Стекла с клетками инкубировали во влажной камере около 1 ч при комнатной температуре, после чего их промывали НФБ 3 раза по 5 мин. Вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом (Alexa Fluor 488), разводили в соотношении 1 : 10 000 и инкубировали с ними предметные стекла с клетками в течение 40 мин в темноте при комнатной температуре, после чего стекла промывали НФБ 3 раза. Далее проводили окраску ядер 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (Invitrogen, США) в разведении 1 : 10 000 на НФБ в течение 5 с, после чего стекла промывали НФБ 3 раза. Стекла с клетками монтировали на предметные стекла с помощью раствора Fluoromount (Sigma, США). Препараты анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Observer.D1 (Carl Zeiss, Германия).

ПЦР в реальном времени. Из ткани и дифференцированных в кардиогенном, адипогенном и остеогенном направлениях клеток выделяли РНК с помощью стандартного протокола выделения, используя тризол (Trizol Reagent, США). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реагентов Евроген (Россия) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Предварительно образец обрабатывали ДНКазой. Для постановки ПЦР в реальном времени использовали 5-кратную реакционную смесь qPCRmix-HS SYBR с интеркалирующим красителем SYBR Green I (Евроген, Россия), а также кДНК в качестве матрицы (50 нг), прямой и обратный праймеры (по 10 мкМ каждого) и стерильную воду

до конечного объема 25 мкл. Реакцию осуществляли в установке 7500 Real-TimePCR-System (LifeTechnologies, США). Количественную ПЦР проводили в течение 40 циклов. Для анализа данных, полученных в ходе количественной ПЦР в режиме реального времени, в качестве метода представления относительной экспрессии гена использовали метод $2^{-\Delta\Delta C_T}$, в качестве гена «домашнего хозяйства» — *GAPDH* (Перепелина и др., 2017). Последовательности используемых праймеров представлены в таблице.

Для статистической обработки данных использовали программы Microsoft Excel и GraphPad Prism Software. Достоверность различий между группами оценивали при помощи непараметрического критерия Манна—Уитни. Значимыми считали различия при $P < 0.05$. Все эксперименты повторяли трижды.

Результаты

В ходе культивирования СКС, полученных из перинфарктных и здоровых участков миокарда, была отмечена тенденция к более быстрому росту популяции перинфарктных клеток (ПИК) по сравнению с клетками из здорового контрольного участка (ЗК). На 7-е сут культивирования популяция ПИК уже достигала конфлюэнтной плотности (рис. 1) в отличие от популяции ЗК. Полученные клетки были способны к пролиферации в течение 20 пассажей.

Ранее было показано (Augello, De Bari, 2010; Alimperi et al., 2014; Golpanian et al., 2016), что стволовые клетки

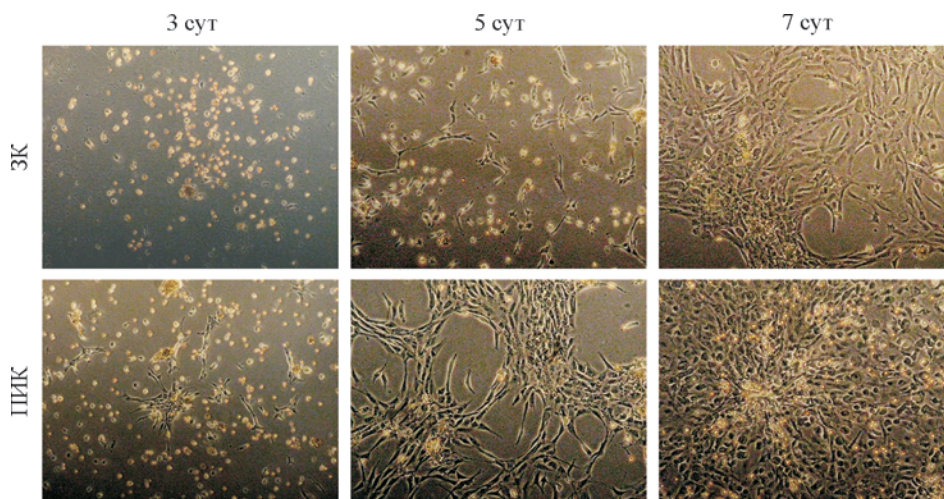


Рис. 1. Стволовые клетки сердца (СКС) крыс из здорового (ЗК) и перинфарктного (ПИК) миокарда в процессе культивирования. Динамика роста в течение 7 сут; СКС выделены на 3-и сут после индукции инфаркта.

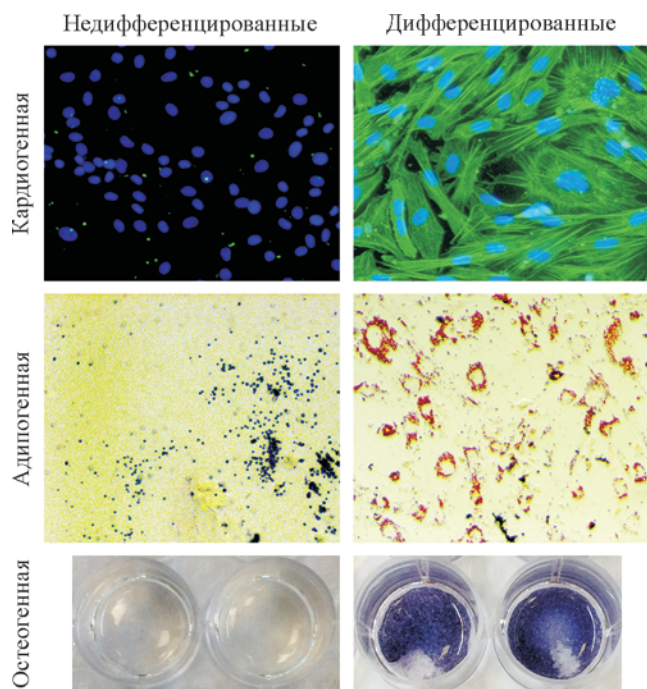


Рис. 2. Кардиогенная (зеленый цвет), адипогенная (красный цвет) и остеогенная (синий цвет) дифференцировка СКС.

Клетки дифференцировали путем добавления в среду культивирования специфических индукторов. Иммуноцитохимическое окрашивание на α -актинин и DAPI, окрашивание на жировые накопления (судановый красный) и щелочную фосфатазу (краситель NBT/BCIP).

мезенхимной природы способны к дифференцировке в нескольких направлениях в зависимости от окружения и влияния химических индукторов дифференцировки. Для того чтобы выяснить, обладают ли СКС, полученные из участка миокарда, способностью к дифференцировке, мы индуцировали в контрольных СКС дифференцировку в кардиогенном, остеогенном и адипогенном направлениях. Через 24 сут культивирования СКС в среде, содержащей факторы кардиогенной дифференцировки, наблюдали формирование филаментов альфа-актина (рис. 2). Через 21 сут культивирования СКС в среде, содержащей факторы остеогенной дифференцировки, мы наблюдали интенсивную окраску клеток, выявляющую щелочную фосфатазу (рис. 2). Через 14 сут культивирования в среде, содержащей факторы адипогенной дифференцировки, в СКС наблюдали внутриклеточное накопление липидных капель (рис. 2). Таким образом, СКС, полученные из участка миокарда, имели свойства стволовых клеток — способность к активной пролиферации и дифференцировке в кардиогенном, остеогенном и адипогенном направлениях.

Пролиферативная активность СКС. Для подтверждения гипотезы о том, что ПИК имеют боль-

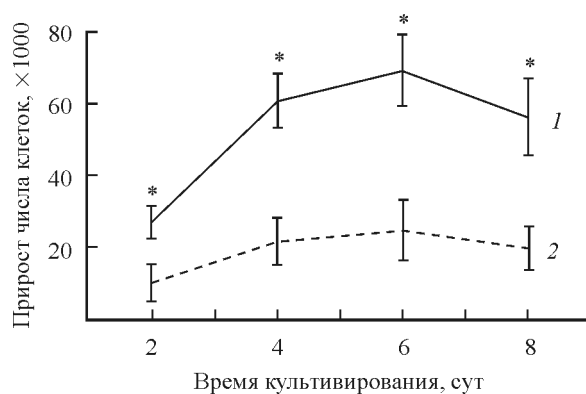


Рис. 3. Скорость пролиферации ПИК (кривая 1) и ЗК (кривая 2).

СКС выделены на 3-и сут после индукции инфаркта; плотность посева клеток 10^3 кл./см²; показаны средние величины и стандартные отклонения (вертикальные отрезки). Достоверность различий между контрольной группой и группой ПИК показана звездочкой.

шую склонность к активной пролиферации, был проведен функциональный тест на скорость роста полученных клеток (рис. 3). Скорость пролиферации ПИК оказалась выше скорости роста популяции ЗК ($P < 0.05$).

Скорость миграции СКС. Одним из механизмов регенерационного ответа является миграция клеток к очагу повреждения (Черноиваненко и др., 2013). В связи с этим был проведен функциональный тест на способность к миграции полученных клеток методом скретч-теста с последующим количественным анализом (рис. 4, а, б). ПИК имели большую склонность к миграции в область царапины по сравнению с популяцией ЗК ($P < 0.05$).

Дифференцировочный потенциал СКС. В качестве маркеров, отражающих специфичную дифференцировку, мы оценивали изменения экспрессии генов тропонина *TNNT2*, маркера зрелых кардиомиоцитов, и виментина *Vim*, одного из маркеров фибробластов (рис. 5, а). В ишемизированной зоне на 3-и сут после индукции инфаркта экспрессия *TNNT2* понижалась, а экспрессия *Vim* возрастала, что указывает на начавшийся после инфаркта процесс замещения погибших кардиомиоцитов.

Мы сравнили способность к дифференцировке СКС, происходящих из перинфарктной зоны миокарда, и СКС из здорового участка миокарда. При индукции кардиогенной дифференцировки экспрессия *TNNT2* была выше (рис. 5, б) в СКС из перинфарктной зоны по сравнению с СКС из ЗК миокарда. При индукции остеогенной дифференцировки экспрессия *BMP2* (bone morphogenetic protein 2 — маркер остеогенной дифференцировки) и *Runx2* (runt-related transcription factor 2 — маркер остеогенной дифференцировки) была более выраженной (рис. 5, в) в ПИК по сравнению с ЗК. При индукции адипогенной дифференцировки экспрессия *Fabp4* (fatty acid binding



Рис. 5. Динамика экспрессии генов-маркеров в тканях (а) и клетках (б—г) методом количественного ПЦР-анализа.

ЗК — клетки из здорового участка миокарда, ПИК — перинфарктные клетки. По вертикали — относительное количество мРНК для каждого гена, измеренное по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$; звездочкой показаны достоверные различия между группами ЗК и ПИК при $P < 0.05$. а — анализ экспрессии мезодермального и кардиогенного маркеров при инфаркте миокарда в ишемизированных и здоровых тканях. б — оценка экспрессии гена тропонина T2, кодирующего кардиально-специфичную изоформу тропонина I в клетках, полученных из ишемизированных и здоровых участков миокарда, при кардиогенной дифференцировке. в — анализ экспрессии *BMP2* (bone morphogenetic protein 2 — маркер остеогенной дифференцировки) и *Runx2* (runt-related transcription factor 2 — маркер остеогенной дифференцировки) в дифференцированных СКС в остеогенном направлении. г — оценка экспрессии адипогенного маркера *Fabp4* (fatty acid binding protein 4) при дифференцировке ишемизированных и здоровых клеток.

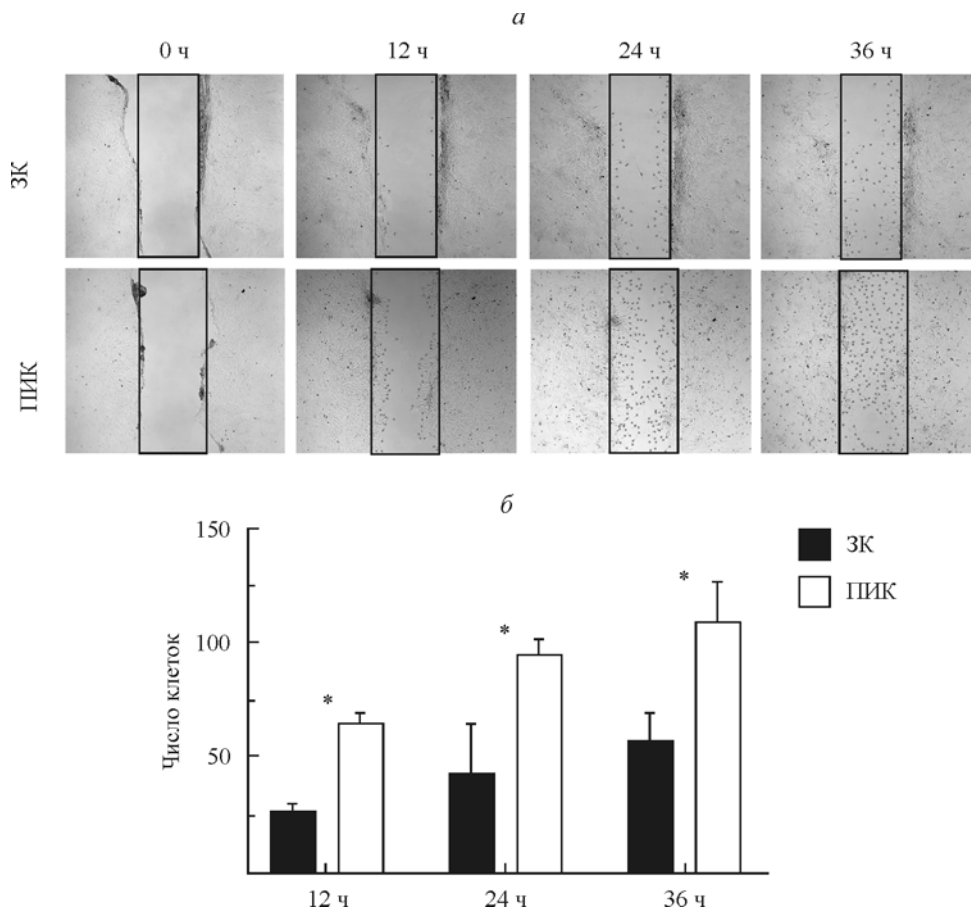
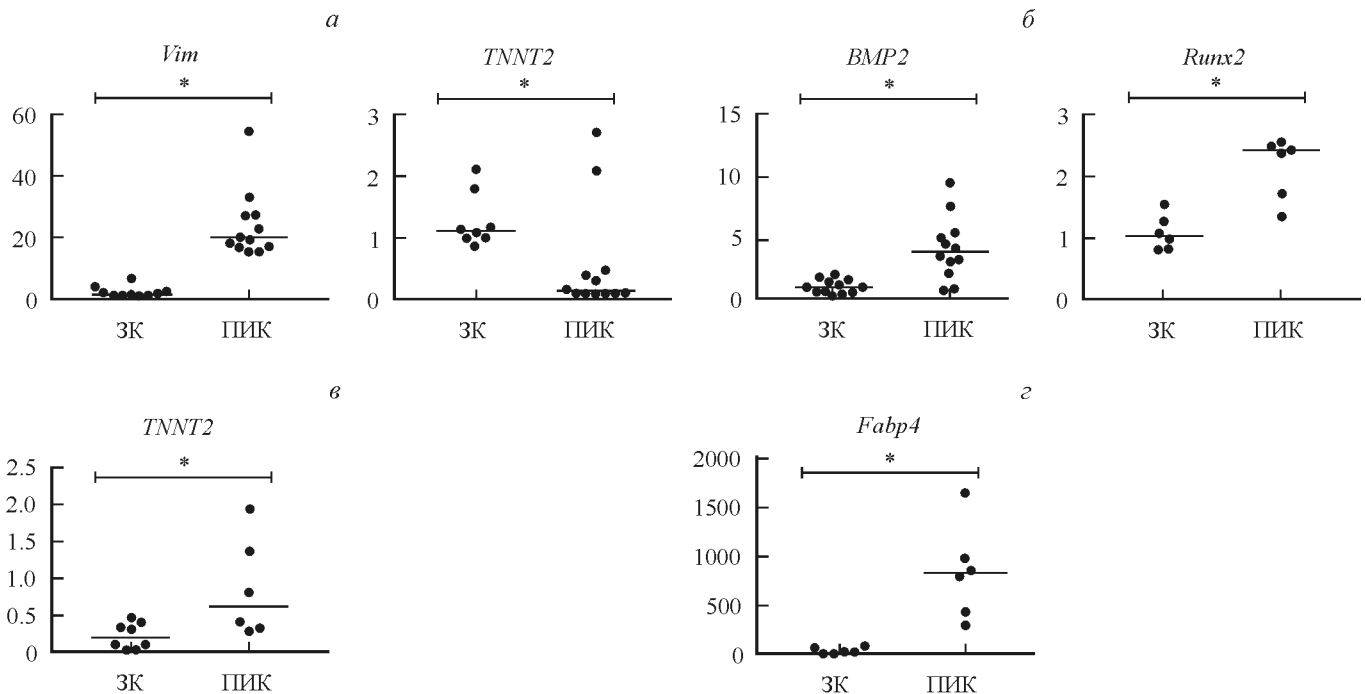


Рис. 4. Миграция (*a*) и количественный анализ (*б*) СКС в скретч-тесте из перинфарктных и здоровых участков миокарда. *a* — мигрирующие клетки в область царапины (выделена *прямоугольником*). ЗК — клетки из здорового участка миокарда, ПИК — перинфарктные клетки. При образовании клеточного монослоя наносили царапину и считали число клеток через 12, 24 и 36 ч. *б* — скорость миграции СКС. Показана медиана с диапазоном (стандартное отклонение); *звездочкой* показаны достоверные различия между группами ЗК и ПИК на каждом сроке при $P < 0.05$.



protein 4 — маркер адипогенной дифференцировки) была выше (рис. 5, з) в ПИК, чем в ЗК. Таким образом, повышенная экспрессия кардиогенных, остеогенных и адипогенных маркеров характерна для периинфарктных СКС, что говорит о более выраженном потенциале данных клеток к дифференцировке по трем направлениям.

Обсуждение

Регенеративный потенциал СКС является актуальной темой исследований последних лет в связи с определенными неудачами в области применения нерезидентных стволовых клеток при острых и хронических заболеваниях сердца. Нашей целью было сравнить СКС, полученные из периинфарктного и здорового участков миокарда, и выяснить, обладают ли эти клетки выраженной пролиферацией, способностью к миграции и дифференцировке. Ранее было показано (Beltrami et al., 2001), что при инфаркте миокарда значительное количество делящихся кардиомиоцитов находится ближе к очагу повреждения, нежели в остальной части сердца. Зависит ли активация СКС от гипоксического стресса? Недавно было продемонстрировано (Bellio et al., 2016, 2017), что культивирование СКС в среде с пониженной концентрацией кислорода переводит клетки в состояние покоя с последующим ограничением к самообновлению и дифференцировке. Хотя имеются и противоположные данные (Nakada et al., 2016): постепенное снижение концентрации кислорода благоприятно влияет на регенеративные процессы в сердце *in vivo* с уменьшением фиброза миокарда. Результаты данных исследований убеждают в возможности активации СКС именно в микросреде поврежденного миокарда.

Мы предположили, что СКС из периинфарктной зоны могут иметь более выраженный потенциал к регенерации в сравнении с СКС из здорового участка, не подверженного гипоксическому стрессу. Для подтверждения данной гипотезы мы индуцировали инфаркт миокарда у крыс путем лигирования коронарной артерии и получили периинфарктные СКС, которые ранее не были детально охарактеризованы. Мы наблюдали выраженную пролиферативную и миграционную активность ПИК по сравнению с контрольной популяцией в ходе культивирования и проведения функциональных тестов. В ряде работ было показано, что СКС способны к дифференцировке в кардиогенном (Oh et al., 2003; Barile et al., 2007a, 2007b), остеогенном и адипогенном (Gambini et al., 2011) направлениях. Мы также получили дифференцировку СКС в трех направлениях, которую наблюдали при помощи иммуноцитохимического окрашивания клеток. При оценке экспрессии специфических маркеров кардиогенной, остеогенной и адипогенной дифференцировки мы получили более высокий уровень активации клеток, происходящих из периинфарктной зоны, в отличие от контрольной популяции, происходящей из здорового миокарда.

Таким образом, ишемическое повреждение миокарда приводит к активации внутреннего регенеративного потенциала СКС *in vivo*, наиболее выраженное в периинфарктной зоне. Полученные данные способствуют последующему углубленному рассмотрению и активному изучению феномена активации СКС из периинфарктного участка миокарда. Возможно, что дальнейшее использование ПИК в терапевтических целях даст новый виток возможностей в регенеративной медицине сердечно-сосудистых заболеваний.

Список литературы

- Карпов А. А., Ивкин Д. Ю., Драчева А. В., Питухина Н. Н., Успенская Ю. К., Ваулина Д. Д., Усков И. С., Эйвазова Ш. Д., Минасян С. М., Власов Т. Д., Бурякина А. В., Галагудза М. М. 2014. Моделирование постинфарктной сердечной недостаточности путем окклюзии левой коронарной артерии у крыс: техника и методы морфофункциональной оценки. *Биомедицина*. 1 (3) : 32—48. (Karpov A. A., Ivkin D. Yu., Dracheva A. V., Pitukhina N. N., Uspenskaya Yu. K., Vaulina D. D., Uskov I. S., Eyvazova Sh. D., Minasyan S. M., Vlasov T. D., Buryakina A. V., Galagudza M. M. 2014. Rat model of post-infarct heart failure by left coronary artery occlusion: technical aspects, functional and morphological assessment. *Biomedicina*. 1 (3) : 32—48.)
- Костина Д. А., Воронкина И. В., Смагина Л. В., Гаврилюк Н. Д., Моисеева О. М., Иртюга О. Б., Успенский В. Е., Костарева А. А., Малашичева А. Б. 2013. Исследование функциональных свойств гладкомышечных клеток при аневризме аорты. *Цитология*. 55 (10) : 725—731. (Kostina D. A., Voronkina I. V., Smagina L. V., Gavriluk N. D., Moiseeva O. M., Irtiuga O. B., Uspensky V. E., Kostareva A. A., Malashicheva A. B. 2013. Functional properties of smooth muscle cells in ascending aortic aneurysm. *Tsitologiya*. 55 (10) : 725—731.)
- Перепелина К. И., Смолина Н. А., Забирник А. С., Дмитриева Р. И., Малашичева А. Б., Костарева А. А. 2017. Влияние мутаций в гене *LMNA* на миогенную дифференцировку первичных сателлитных клеток и клеток линии C2C12. *Цитология*. 59 (2) : 118—124. (Perpelina K. I., Smolina N. A., Zibirnik A. S., Dmitrieva R. I., Malashicheva A. B., Kostareva A. A. 2017. The role of *LMNA* mutations in myogenic differentiation of primary satellite cells and C2C12 cells. *Tsitologiya*. 59 (2) : 118—124.)
- Худяков А. А., Кураев Д. И., Костарева А. А., Малашичева А. Б. 2013a. Сравнение эффективности методов получения функционально активных кардиомиоцитов человека. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 8 (2) : 46—54. (Khudiakov A. A., Kurapeev D. I., Kostareva A. A., Malashicheva A. B. 2013a. Comparison of different methods for generation of functional human cardiomyocytes. *Cell. Transplant. Tissue Eng.* 8 (2) : 46—54.)
- Худяков А. А., Кураев Д. И., Костарева А. А., Малашичева А. Б. 2013b. Получение предшественников кардиомиоцитов человека из ткани миокарда. *Бюлл. ФЦСКЭ им. В. А. Алмазова*. 18 (1) : 17—20. (Khudiakov A. A., Kurapeev D. I., Kostareva A. A., Malashicheva A. B. 2013b. Isolation of human cardiomyocyte progenitor cells from myocardial tissue. *Byulleten' V. A. Almazov FCSKEN*. 18 (1) : 17—20.)
- Черноиваненко И. С., Минин А. А., Минин А. А. 2013. Роль виментина в миграции клеток. *Онтогенез*. 44 (3) : 186—202. (Chernoivanenko I. S., Minin A. A., Minin A. A. 2013. Role of vimentin in cell migration. *Ontogenez*. 44 (3) : 186—202.)
- Alimperti S., You H., George T., Agarwal S. K., Andreadis S. T. 2014. Cadherin-11 regulates both mesenchymal stem cell differentiation into smooth muscle cells and the development of contractile function *in vivo*. *J. Cell Sci*. 127 : 2627—2638.
- Anversa P., Kajstura J. 1998. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ. Res*. 83 : 1—14.
- Anversa P., Kajstura J., Rota M., Leri A. 2013. Regenerating new heart with stem cells. *J. Clinical Invest*. 123 : 62—70.
- Anversa P., Sussman M. A., Bolli R. 2004. Molecular genetic advances in cardiovascular medicine: focus on the myocyte. *Circulation*. 109 : 2832—2838.
- Augello A., De Bari C. 2010. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Human Gene Therapy*. 21 : 1226—1238.
- Barile L., Chimenti I., Gaetani R., Forte E., Miraldi F., Frati G., Messina E., Giacomello A. 2007a. Cardiac stem cells: isolation, expansion and experimental use for myocardial regeneration. *Nature Clinical Practice. Cardiovasc. Med*. 4 : 9—14.
- Barile L., Messina E., Giacomello A., Marban E. 2007b. Endogenous cardiac stem cells. *Progress Cardiovasc. Dis*. 50 : 31—48.

- Bearzi C., Rota M., Hosoda T., Tillmanns J., Nascimbene A., De Angelis A., Yasuzawa-Amano S., Trofimova I., Siggins R. W., LeCapitaine N., Cascapera S., Beltrami A. P., D'Alessandro D. A., Zias E., Quaini F., Urbanek K., Michler R. E., Bolli R., Kajstura J., Leri A., Anversa P. 2007. Human cardiac stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 104 : 14 068—14 073.
- Bellio M. A., Pinto M. T., Florea V., Barrios P. A., Taylor C. N., Brown A. B., Lamondin C., Hare J. M., Schulman I. H., Rodrigues C. O. 2017. Hypoxic stress decreases c-myc protein stability in cardiac progenitor cells inducing quiescence and compromising their proliferative and vasculogenic potential. *Sci. Rep.* 7 : 9702.
- Bellio M. A., Rodrigues C. O., Landin A. M., Hatzistergos K. E., Kuznetsov J., Florea V., Valasaki K., Khan A., Hare J. M., Schulman, I. H. 2016. Physiological and hypoxic oxygen concentration differentially regulates human c-Kit(+) cardiac stem cell proliferation and migration. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 311 : H1509—H1519.
- 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. 2003. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 114 : 763—776.
- Beltrami A. P., Urbanek K., Kajstura J., Yan S.-M., Finato N., Bussani R., Nadal-Ginard B., Silvestri F., Leri A., Beltrami C. A., Anversa P. 2001. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *New Eng. J. Med.* 344 : 1130—1135.
- Buja L. M. 2005. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc. Pathol.* 14 : 170—175.
- Gambini E., Pompilio G., Biondi A., Alamanni F., Capogrossi M. C., Agrifoglio M., Pesce M. 2011. C-kit+ cardiac progenitors exhibit mesenchymal markers and preferential cardiovascular commitment. *Cardiovasc. Res.* 89 : 362—373.
- Golpanian S., Wolf A., Hatzistergos K. E., Hare J. M. 2016. Rebuilding the damaged heart: mesenchymal stem cells, cell-based therapy, and engineered heart tissue. *Physiol. Rev.* 96 : 1127—1168.
- Kimura W., Xiao F., Canseco D. C., Muralidhar S., Thet S., Zhang H. M., Abdulrahman Y., Chen R., Garcia J. A., Shelton J. M., Richardson J. A., Ashour A. M., Asaithamby A., Liang H., Xing C., Lu Z., Zhang C. C., Sadek H. A. 2015. Hypoxia fate mapping identifies cycling cardiomyocytes in the adult heart. *Nature.* 523 : 226—230.
- Laugwitz K.-L., Moretti A., Lam J., Gruber P., Chen Y., Woodard S., Lin L.-Z., Cai C.-L., Lu M. M., Reth M., Platoshyn O., Yuan J. X.-J., Evans S., Chien K. R. 2005. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature.* 433 : 647—653.
- Le T. Y. L., Chong J. J. H. 2016. Cardiac progenitor cells for heart repair. *Nature Publishing Group.* 2 : 1—4.
- Linke A., Müller P., Nurzynska D., Casarsa C., Torella D., Nascimbene A., Castaldo C., Cascapera S., Bohm M., Quaini F., Urbanek K., Leri A., Hintze T. H., Kajstura J., Anversa P. 2005. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102 : 8966—8971.
- Mocetti T., Leri A., Goichberg P., Rota M., Anversa P. 2015. A novel class of human cardiac stem cells. *Cardiol. Rev.* 23 : 189—200.
- Nakada Y., Canseco D. C., Thet S., Abdisalaam S., Asaithamby A., Santos C. X., Shah A. M., Zhang H., Faber J. E., Kinter M. T., Szweda L. I., Xing C., Hu Z., Deberardinis R. J., Schiattarella G., Hill J. A., Oz O., Lu Z., Zhang C. C., Kimura W., Sadek H. A. 2016. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. *Nature.* 541 : 1—21.
- Oh H., Bradfute S. B., Gallardo T. D., Nakamura T., Gausman V., Mishina Y., Pocius J., Michael L. H., Behringer R. R., Garry D. J., Entman M. L., Schneider M. D. 2003. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 100 : 12 313—12 318.
- Reed G. W., Rossi J. E., Cannon C. P. 2017. Acute myocardial infarction. *Lancet.* 389 : 197—210.
- Severs N. J. 2000. The cardiac muscle cell. *BioEssays: News Rev. Mol. Cell. Develop. Biol.* 22 : 188—199.
- Smith R. R., Barile L., Cho H. C., Leppo M. K., Hare J. M., Messina E., Giacomello A., Abraham M. R., Marbán E. 2007. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation.* 115 : 896—908.
- Towbin J. A. 2007. Scarring in the heart — a reversible phenomenon? *New England J. Med.* 357 : 1767—1768.
- Urbanek K., Torella D., Sheikh F., De Angelis A., Nurzynska D., Silvestri F., Beltrami C. A., Bussani R., Beltrami A. P., Quaini F., Bolli R., Leri A., Kajstura J., Anversa P. 2005. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102 : 8692—8697.
- Wessels A., Pérez-Pomares J. M. 2004. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *Anat. Rec. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 276A : 43—57.
- Zhou S., Schuetz J. D., Bunting K. D., Colapietro A. M., Sampath J., Morris J. J., Lagutina I., Grosveld G. C., Osawa M., Nakauchi H., Sorrentino B. P. 2001. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature Med.* 7 : 1028—1034.

Поступила 27 IX 2017

ACTIVATION OF CARDIAC STEM CELLS IN MYOCARDIAL INFARCTION

P. M. Docshin,¹ A. A. Karpov,² Sh. D. Eyvazova,² M. V. Puzanov,² A. A. Kostareva,²
M. M. Galagudza,² A. B. Malashicheva^{1,2,*}

¹ St. Petersburg University, St. Petersburg, 199034, and

² V. A. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, 197341;

* e-mail: amalashicheva@gmail.com

Development of heart failure due to acute myocardial infarction is accompanied by massive necrotic death of cardiomyocytes in the place of lesion and by subsequent pathological myocardial remodeling. Traditionally, possibilities for heart repair are considered to be severely limited or absent in the postnatal period. Endogenous cardiac stem cells with regenerative potential have recently been described, but the mechanisms of activation of these cells remain poorly understood. The aim of our work was to obtain the cardiac stem cells from the ischemic area of the myocardium and to compare their functional properties with the stem cells isolated from the healthy area of myocardium. RT-PCR was used to quantify the differentiation gene expression in cardiac stem cells. In addition, differentiated cells were stained for specific markers using immunocytochemical method.

Cardiac stem cells originating from the infarction area had a higher proliferative potential and greater propensity to migrate in comparison to the cells originating from healthy myocardial area. The expression level of several specific markers of cardiogenic, osteogenic and adipogenic differentiation upon induction of corresponding differentiation was higher in the cells from the infarction area compared with the cells from healthy myocardium. We conclude that myocardial ischemia activates internal regenerative potential of the cardiac stem cells.

Key words: myocardial infarction, mechanisms of activation of heart repair, cardiac stem cells.
