

**ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЕ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ  
СВОЙСТВА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КАК  
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО  
ДЕЙСТВИЯ ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА**

ХУЛУП Г.Я.\*, МАСТИЦКАЯ СЮ.\*, ЗАФРАНСКАЯ М.М.\*,  
ЛАМОВСКАЯ Н.В.\*, НИЖЕГОРОДОВА Д.Б.  
ИВАНЧИК Г.И.\*, ДЕНЕКЕ Б.\*\*

*ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного  
образования»\*,  
Междисциплинарный центр клинических исследований (IZKF) "BioMAT",  
Технический университет земли Северный Рейн-Вестфалия (RWTH-  
Aachen) \*\**

**Резюме.** Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются перспективной клеточной популяцией для регенерации ишемических повреждений миокарда. В работе приведены результаты анализа эффективности протоколов кардиомиогенной дифференцировки МСК *in vitro*, а также информационно-аналитический обзор литературных данных по иммуномодулирующим и секреторным свойствам клеток.

Показано, что, несмотря на значительную пластичность МСК костного мозга и способность подвергаться частичной дифференцировке в кардиомиоцит-подобные клетки при манипуляциях *in vitro*, данные клетки не приобретают функциональные характеристики полноценных кардиомиоцитов.

Механизмы положительного эффекта трансплантации МСК на регенерацию миокарда могут быть связаны с их влиянием на процессы ремоделирования и ангиогенеза вследствие секреции противовоспалительных цитокинов, трофических и ростовых факторов.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, кардиоспецифическая дифференцировка *in vitro*, иммуносупрессия.

**Ключевые слова:** Мезенхимальные стволовые клетки, кардиомиоциты, ангиогенез

**Abstract.** Human mesenchymal stem cells (hMSCs) are a promising cell population for regenerative therapy of ischemic heart disease. In our study we have analyzed different published protocols of cardiac differentiation of hMSCs. The comprehensive review of MSCs immunomodulatory properties and ability to produce growth factors is given. We found that hMSCs do not generate functionally active cardiomyocytes *in vitro*, although the cells demonstrate high plasticity and respond to induction of the cardiac differentiation pathways in the way of stochastic increase of certain cardiac-specific genes' expression. It seems that the beneficial effects of MSCs transplantation in infarcted heart are mediated by their contribution to angiogenesis and remodelling processes and anti-inflammatory cytokines and growth factors production rather than by cardiac differentiation.

**Адрес для корреспонденции:** Республика Беларусь, 220013, г.Минск, ул. П. Бровки, 3/3, Белорусская медицинская академия последипломного образования - Мастицкая С.Ю.

Пластиность и низкая иммуногенность мезенхимальных стволовых клеток (МСК), легкость в получении и наращивании количества клеток *in vitro* обусловливают большой интерес к изучению возможностей применения МСК в клеточно-опосредованной регенерации тканей, в частности, в клеточной кардиомиопластике [1-4]. Экспериментальные работы и клинические испытания показали положительный эффект трансплантации МСК при инфаркте миокарда [1, 5-8].

Механизмы положительного действия, предположительно, связаны с дифференцировкой МСК в кардиомиоциты и, как следствие, пластической функцией клеток, а также с противовоспалительным действием МСК, продукцией факторов роста и противоапоптотических цитокинов. Тем не

менее, в последние годы появляются работы, опровергающие данные о способности МСК к трансдифференцировке в кардиомиоциты [9, 10]. Несмотря на множество работ по направленной кардиомиогеной дифференцировке МСК *in vitro*, результаты данных исследований являются зачастую противоречивыми и невоспроизводимыми [5, 7, 11-13]. Таким образом, механизм положительного действия трансплантированных МСК на последствия инфаркта миокарда остается нераскрытым. Цель работы - осветить биологические свойства МСК, лежащие в основе их кардиопротекторного действия и оценить потенциал МСК к дифференцировке в функционально активные кардиомиоциты *in vitro*.

### **Методы**

*Выделение и культивирование МСК.* Для выделения МСК из КМ пунктат КМ с добавлением равного объема фосфатного буфера Дульбекко насылаивали на градиент плотности Lymphoflot (Sigma). После центрифугирования мононуклеары отмывали двукратно, полученные клетки ресуспендировали в полной питательной среде (DMEM, 10% ЭТС, 100 U/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 тМ L-глутамина) и засевали в культуральные чашки. Клетки культивировали при 37°C в 5% СО<sub>2</sub> и 20% О<sub>2</sub> атмосфере, смену среды производили каждые 3-4 дня.

*Направленная кардиомиогенная диффе-ренцировка МСК.* МСК культивировали в диф-ференцировочном коктейле, включающем 60% DMEM-LG, 28%MCDB-201 (Sigma, Германия), 10% FCS (PAA Laboratories, Linz, Австрия), 1mg/ml бычьего инсулина, 0.55mg/ml человеческого трансферрина, 0.5ug/ml селенита натрия, 50mg/ml бычьего сывороточного альбумина, 0.47ug/ml линолевой кислоты, 0,1 тМ аскорбиновой кислоты, 1пМ дексаметазона (все компоненты производства Sigma, Германия), 100U/ml пенициллина G, 100ug стрептомицина (PAA Laboratories, Linz, Австрия) или в среде IMDM (Sigma, Германия) с добавлением 10% FCS, 100U/ml пенициллина G, 100ug стрептомицина

(PAA Laboratories, Linz, Австрия), 1% незаменимых аминокислот (NEAA), 0,1% р-меркаптоэтанола. Трехмерное культивирование МСК в дифференцировочных средах по принципу висящих капель проводили, как описано ранее [14]. Для выяснения роли деметилирования ДНК и деацетилирования гистонов в индукции кардиомиогенной дифференцировки МСК клетки культивировали в присутствии 5-азасцитидина и трихостатина А в концентрациях 1 цМ и 0,1 цМ соответственно на протяжении 10 суток. Для получения совместной культуры МСК с Cor. AT клетками МСК 2-го пассажа и мышиные кардиомиоциты предсердий (Cor.AT® клетки, AXIOGENESIS AG: [www.axiogenesis.com](http://www.axiogenesis.com)) были посеваны в лунки 48-луночного планшета в соотношении 5000:3000. Клетки культивировали в среде CorAT® (AXIOGENESIS AG).

*Иммунофлуоресцентные исследования.* Для характеристики клеток в иммунофлуоресцентных исследованиях были использованы моноклональные антитела к сердечному тропонину I (Abeam), тяжелой цепи миозина (Upstate), коннексину-43 (Alpha Diagnostic), Nkx2.5 (Dako), GATA4 (Santa Cruz), миоглобину (Dako), актину гладкой мускулатуры (Dako), CD44 (Beckton Dickinson), а также вторые антитела, конъюгированные с флюорохромом AlexaFluor-546 (Molecular Probes, Guttingen, Германия).

Обратная транскрипция и ПЦР. Общую РНК выделяли из культур клеток с помощью набора RNeasy Kit (QUAGEN, Германия). РНК миокарда человека использовали в качестве положительного контроля. Для получения ДНК из общей РНК (обратной транскрипции) был использован набор реагентов Superscript III (Invitrogen, Канада). Для характеристики клеток применяли праймеры к следующим кардиоспецифическим маркерам: тяжелая цепь миозина MYH7B (5'-

AGGAGAAGCGCAACGCAGAGT-3', 5'-TGCTGCACCTTGCAGAACTTG-3), транскрипционные факторы Mef2A (5'-GC AGCAGCACCCACCTAGG-C3', 5'-CTGCTGCTGCTGCTGGAAAG-3'), Mef2D (5'- TGCCCCACTGCCTAC CAG, 3', 5'-GGACACCGGTTCTGACTTGATG-3') и Nkx2.5 (5' CAAGGA CCCTAG CCGAAAG-Y, 5'- CCTGCGTGGACGTGAGTTTC-3').

Поставлена 40-цикловая программа ПЦР с использованием Tag-полимеразы (Promega, США). Каждый цикл ПЦР состоял из процесса денатурации в течение 60 секунд при 99°C, отжига праймеров при температуре 58 или 60°C в течение 2 мин и экстензии при 71°C в течение 2 мин. Полученные ДНК-продукты были фракционированы по размеру с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле.

*Статистический анализ данных.* Результаты определения экспрессии генов MYH7B, Nkx2.5, MEF2A и MEF2D с помощью ПЦР-анализа были выражены в баллах от 0 до 4 в соответствии с интенсивностью свечения ДНК-продукта в агарозном геле. Полученные данные были подвергнуты кластерному анализу. В качестве меры сходства между культурами использовано Евклидово расстояние. Кластерный анализ по алгоритму «среднее присоединение» выполнен с помощью программы PRIMER 6 (PRIMER-E Ltd., 2006) [15].

### **Характеристика МСК**

Стромальные клетки костного мозга были впервые описаны Фридленштейном как фибробластоподобная популяция мононуклеарных клеток ККМ, обладающих адгезивными свойствами и способностью к дифференцировке в остеоциты [16]. Впоследствии было показано, что данные клетки дифференцируются также в различные другие мезодермальные клеточные линии, в том числе хондроциты, теноциты и миобlastы, и благодаря этому свойству был введен термин «мезенхимальные стволовые клетки» [17]. Подобные клетки были также обнаружены и в других тканях, в том числе жировой ткани, плаценте,

амниотической жидкости, фетальных тканях и пуповинной крови. Выделенные и культивируемые *in vitro* МСК экспрессируют ряд поверхностных маркеров: CD 105 (SH2, или эндоглин), CD73 (SH3 или SH4), CD90, CD166, CD44 и CD29 [2] и являются негативными по маркерам гемопоэтических и эндотелиальных клеток CD11b, CD14, CD31 и CD45 [2]. В настоящее время не существует специфического маркера, который позволяет выделить чистую популяцию МСК из ККМ, и методы получения МСК основаны на адгезии их к культуральному пластику. В результате получаемая культура клеток является гетерогенной, а дифференцировочные и иммуномодулирующие свойства культур МСК могут значительно варьировать в разных исследованиях.

### **Кардиомиогенный потенциал МСК *in vivo* и *in vitro***

Начиная с 1999 года, когда Makino et al. [12] впервые показали, что обработка МСК 5-азацитидином приводит к дифференцировке их в кардиомиоцитподобные клетки, способные спонтанно сокращаться в культуре, было опубликовано множество работ, посвященных кардиомиогенной дифференцировке МСК. Было показано, что МСК костного мозга могут дифференцироваться в кардиомиоцитподобные клетки *in vitro* под действием целого ряда факторов - ростовых факторов TGF $\beta$ I, ILGF, PDGF, bFGF, неспецифических индукторов дифференцировки (динорфина В, инсулина, аскорбиновой, ретиноевой кислот, 5-аза-цитидина и др.) [7].

На нескольких экспериментальных моделях инфаркта миокарда была доказана регенерация ткани и улучшение функционального состояния миокарда после трансплантации МСК костного мозга. В исследовании Tomita et al. показано, что клетки, предварительно обработанные 5-азацитидином, успешно интегрировались в ткань миокарда и были способны к полноценной дифференцировке в кардиомиоциты в модели криодеструкции ткани миокарда у крыс [7]. В двух других исследованиях

без использования 5-азацитидина показано, что МСК приобретают фенотип дифференцированных кардиомиоцитов при непосредственной их трансплантации в неповрежденный миокард крыс под действием факторов микроокружения [20,21]. Тем не менее, даже при условии трансплантации большого количества МСК, число прижившихся клеток было чрезвычайно низким. Результатом аутологичной трансплантации МСК после модели ишемии-реперфузии миокарда у свиней было улучшение функции левого желудочка [22], интракоронарная доставка МСК в сердца здоровых собак в другом исследовании, напротив, приводила к острой ишемии миокарда и подострому микроинфаркту миокарда [23]. В работе Yoon et al. [24] трансплантация клеток нефракционированного костного мозга вызывала значительную интрамиокардиальную кальцификацию, вероятно, вследствие спонтанной дифференцировки МСК в остеоциты. Направленная дифференцировка МСК в кардиомиоциты *in vitro*.

На основе анализа мирового опыта по направленной дифференцировке МСК в кардиомиоциты *in vitro* нами было проведено комплексное исследование кардиомиогенных дифференцировочных свойств МСК с целью разработки наиболее эффективного протокола. Были охвачены все принципиальные направления, включая использование ростовых факторов, химических индукторов дифференцировки, биоматериалов подложки, методик совместного культивирования с кардиомиоцитами, условий двух- и трехмерного культивирования. Кроме того, было изучено влияние 5-азацитидина и трихостатина А в сочетании с упомянутыми методиками на степень трансдифференцировки МСК в кардиомиоциты. 5-азацитидин - деметилирующий агент, вещество, применяемое в ряде опубликованных работ для увеличения дифференцировочного потенциала МСК [7, 12, 25]. Физиологически, стволовые клетки взрослого организма находятся в состоянии покоя в норме и участвуют в процессах reparации и дифференцировки лишь под

воздействием определенных стимулов - при повреждении тканей, воспалительных процессах.

Гиперметилирование ДНК и плотная упаковка хроматина посредством деацетилирования гистонов (низкомолекулярные белки, связанные с ДНК) являются важными механизмами репрессии активности некоторых генов в стволовых клетках [12,26-28]. Для активации механизмов спонтанной дифференцировки МСК, в дополнение к дифференцировочным протоколам, мы использовали комбинацию веществ 5-азасцитидина (оказывает деметилирующее действие на ДНК) и трихостатина А (ингибитор деацитилаз). В результате выявлялась спонтанная активация экспрессии кардиоспецифических генов в МСК как следствие процессов деметилирования и ацетилирования, но не происходило значимого увеличения эффективности применяемых дифференцировочных протоколов. Не наблюдалась поперечная исчерченность клеток и их спонтанная сократительная активность, которые характерны для кардиомиоцитов. Результаты наших исследований не согласуются с результатами, полученными Makino et al. [12] и Nassiri et al. [25], что может быть обусловлено стохастическими эффектами обработки клеток 5-азасцитидином, зависящими от таких факторов, как состояние донора клеток, источник получения клеток, методы выделения и первичной обработки клеток и т.п.

В другом исследовании Shiota et al. показали, что обработанные 5-азасцитидином МСК приобретают кардиомиогенный потенциал только при условии применения специальной трехэтапной методики выделения, включающей формирование сфер [29]. На 21-й день после обработки 5-азасцитидином в такой культуре МСК авторы наблюдали одиночные шарообразные сокращающиеся клетки [29].

При последующей трансплантации клеток, обработанных 5-азасцитидином, в миокард мышей после инфаркта только незначительная

доля МСК интегрировались в ткань миокарда как полноценные кардиомиоциты (менее 0,001% от всех трансплантированных клеток) [29], что является дополнительным доказательством того, что положительный эффект МСК не может быть исключительно следствием их кардиомиогенного потенциала. При проведении сравнительного анализа эффективности кардиомиогенных дифференцировочных сред с использованием химических индукторов дифференцировки, а также в среде IMDM в двух- и трехмерной культуре нами показано, что трехмерное культивирование в присутствии комбинации индукторов дифференцировки инсулина (1mg/ml), дексаметазона (1пM) и аскорбиновой кислоты (0,1 тM) является наиболее перспективной технологией направленной дифференцировки МСК в кардиомиоцитподобные клетки.

Такие клетки демонстрировали повышенный уровень экспрессии кардиоспецифических маркеров -генов транскрипционного фактора Nkx2.5 и тяжелой цепи миозина (MYH7B) по сравнению с клетками, культивируемыми в других дифференцировочных средах ( $P=0,036$ , дисперсионный анализ сходства). При исследовании дифференцировки культур МСК в динамике, а также при пересеве культур установлено, что экспрессия генов кардиоспецифических белков и транскрипционных факторов мезенхимальными стволовыми клетками в протоколах направленной дифференцировки *in vitro* носит временный характер (увеличивается на 15-сутки культивирования в дифференцировочной среде и достоверно понижается к 27-м суткам;  $P = 0,01$ , дисперсионный анализ сходства).

Внеклеточный матрикс выполняет множество физиологических функций в процессах роста и дифференцировки клеток, поэтому биоматериалы, структурно и молекулярно воссоздающие микроокружение терапевтической ткани-мишени, активно используются при разработке

протоколов направленной дифференцировки стволовых клеток. Мы изучили ряд трехмерных гелеобразных биополимеров в качестве культуральной системы для дифференцировки МСК в кардиомиоциты на основе анализа их биологической совместимости с МСК (в качестве критериев использованы цитотоксичность биоматериала, морфология, изнеспособность, апоптоз и пролиферация клеток) [30]: Resomer® RG 503 (poly(D,L-lactid-coglycolic acid)), Коллаген, PCL (polycaprolactone), Texin® 950 (ароматический термопластический полиуретан на основе полиэстера), PEA C (polyesteramide type C) (German Wool Research Institute RWTH, Aachen, Германия). Наиболее эффективными в качестве подложки для культивирования клеток в протоколе кардиомиогенной дифференцировки МСК оказались Resomer® RG 503 и Texin® 950. Именно при культивировании на данных биоматериалах в МСК наблюдалась максимальная экспрессия кардиоспецифических генов MYH7B, Nkx2.5 и MEF2D ( $P = 0,05$ , дисперсионный анализ сходства).

Для выяснения критической роли факторов тканевого микроокружения (локальная продукция цитокинов и факторов роста, а также непосредственные межклеточные контакты и электромеханическое взаимодействие с резидентными кардиомиоцитами) в кардиомиогенной дифференцировке МСК была использована методика совместного культивирования МСК с мышевыми атриовентрикулярными кардиомиоцитами (Сог.АТ® клетки).

Иммунофлуоресцентные исследования не выявили увеличения экспрессии кардиоспецифических маркеров человеческими МСК при совместном культивировании с кардиомиоцитами. В отличие от результатов исследований M. Xu et al. [31], которые исследовали совместные культуры мышевых стромальных клеток ККМ и крысиных неонатальных кардиомиоцитов, в нашем эксперименте МСК человека не формировали щелевых контактов с кардиомиоцитами при совместном

культивировании. Экспрессия транскрипционного фактора GATA4 была значительно выше в МСК, чем в Сог.АТ клетках, в то время как интенсивность свечения ядер кардиомиоцитов при окраске моноклональными антителами к Nkx2.5 была значительно выше, чем ядер МСК. Экспрессия миоцит-специфического маркера миоглобина была высокой во всех МСК, однако только в некоторых отдельных клетках, находящихся в непосредственном контакте с Сог.АТ кардиомиоцитами, наблюдался организованный паттерн структурного распределения белка в цитоплазме. Кардиоспецифический белок тропонин I с четкой внутриклеточной структурной организацией экспрессировался в Сог.АТ кардиомиоцитах, но имел диффузное распределение в человеческих МСК. Экспрессия тяжелой цепи миозина также не была характерной для МСК - иммунофлуоресцентный анализ выявил диффузное распределение данного протеина в МСК без характерной для кардиомиоцитов структурной организации.

Все МСК демонстрировали высокий уровень экспрессии лимфоцитарного дифференцировочного антигена CD44. В то же время, кардиомиоциты были негативны по данному маркеру, что служит дополнительным доказательством отсутствия полноценной трансдифференцировки МСК в клетки миокарда.

Таким образом, несмотря на высокую экспрессию кардиоспецифических генов МСК при совместном культивировании с кардиомиоцитами, полноценная трансдифференцировка МСК не была достигнута.

По результатам собственных исследований, а также анализа современных публикаций, посвященных данной теме, мы приходим к выводу о том, что невозможно добиться полноценной кардиомиогенной дифференцировки МСК, несмотря на их высокую пластичность, которая в данном случае выражается в виде стохастического увеличения экспрессии

кардиоспецифических генов в ответ на индукцию кардиомиогенных путей дифференцировки *in vitro*.

### **Иммуномодулирующие и секреторные свойства МСК**

На сегодняшний день опубликовано множество работ, посвященных изучению антиапоптотического, противовоспалительного, проангиогенного действия МСК в процессах ремоделирования миокарда после инфаркта. МСК оказывают локальное иммуномодулирующее действие, супрессируя активность широкого спектра клеток иммунной системы, в том числе NK-клеток, В-лимфоцитов, естественных киллеров и антигенпрезентирующих клеток. Трансплантация МСК в перинфарктную зону снижает экспрессию генов и продукцию провоспалительных цитокинов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6. Такой же эффект наблюдается и в отношении матриксной металлопротеиназы-1 (ММР-1) и тканевого ингибитора ММР-1 (ТИМР-1), что ведет к затуханию процессов воспаления и патологического ремоделирования в миокарде, таких, как замещение инфарктной зоны рубцовой тканью, гипертрофия и апоптоз миоцитов, дисфункция эндотелия [1].

Помимо VEGF (сильный активатор ангиогенеза) и IGF-I (антиапоптотическое действие в отношении кардиомиоцитов) [32], МСК секрецируют ряд других важных паракринных факторов, которые предотвращают апоптоз, активируют ангиогенез и участвуют в реорганизации матрикса, например, FGF (ангиогенный, противофиброзный, антиапоптотический эффекты), HGF (ангиогенная, антиапоптотическая, митогенная, противофиброзная активность), адреномедуллин (ангиогенная, антиапоптотическая, противофиброзная активность) [21].

Исследования иммунологических свойств МСК свидетельствуют в пользу значительной роли данных клеток как иммуномодуляторов в поддержании периферической толерантности, формировании иммунопривилегированного стромального микроокружения для

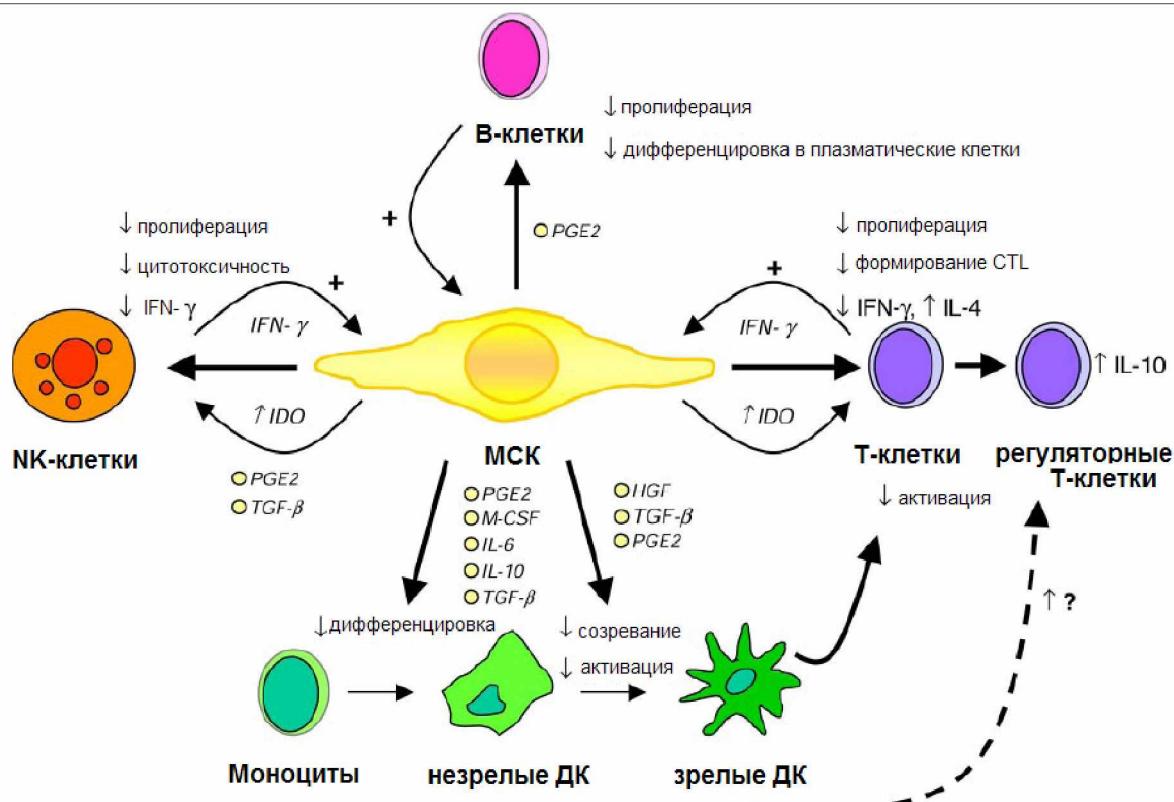
примитивных стволовых клеток ККМ [33], трансплантационном иммунитете, развитии аутоиммунных процессов, а также явлении иммунологической привилегированности плода при беременности [34].

В настоящее время точный механизм иммуносупрессионного действия МСК недостаточно изучен. Как растворимые факторы, так и клеточно-опосредованные механизмы могут быть вовлечены в супрессивную активность МСК [34-36]. Такими факторами могут выступать трансформирующий ростовой фактор-Р (TGF-Р) и фактор роста гепатоцитов (HGF) [37], а также простагландин Е2 (PGE2) [4].

Показано, что МСК конститтивно продуцируют PGE2, и этот процесс усиливается при совместном культивировании с мононуклеарами периферической крови. Еще одним фактором, вовлеченным в супрессию пролиферации Т-клеток, является фермент, расщепляющий триптофан - IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) [38], продукты распада которого (кинуренин) индуцируют апоптоз Т-лимфоцитов [39]. Механизм иммуносупрессионного действия МСК может быть также связан с индукцией ими анергии Т-клеток вследствие отсутствия экспрессии на МСК поверхностных костимулирующих молекул CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2) [37, 40]. Кроме того, МСК могут реализовывать свою супрессивную активность путем повышения количества регуляторных CD4+CD25+ Т-клеток [41]. Помимо непосредственного супрессивного эффекта в отношении Т-лимфоцитов, одним из ключевых механизмов иммуномодулирующего действия МСК является участие их в регуляции дифференцировки, созревания дифференцировка МСК в кардиомиоциты и функций антиген-презентирующих клеток. МСК ингибируют дифференцировку дендритных клеток и экспрессию ими CD83, HLA-DR и костимулирующих молекул, вследствие чего нарушается активация Т-лимфоцитов такими клетками [42,43]. В присутствии МСК наблюдается также изменение спектра цитокинов, производимых культурой

моноцитов: увеличение продукции противовоспалительных цитокинов (IL-10) и подавление синтеза провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12) [42]. Данные явления могут быть результатом действия цитокинов IL-6, M-CSF и PDE2, продуцируемых МСК [43]. Показано, что МСК угнетают пролиферацию, активацию и дифференцировку В-лимфоцитов [44], вероятно, за счет продукции ГОО и запуска триптофанового пути супрессии пролиферативного ответа эffекторных клеток [36, 38]. МСК угнетают цитотоксическую активность естественных киллеров (NK-клеток) в отношении клеток, экспрессирующих молекулы HLA класса I [45], а также IL-2 или IL-15-индуцированную пролиферацию и продукцию IFN- $\gamma$  [41, 45].

Таким образом, МСК значительно модулируют функции целого ряда иммунных клеток *in vitro*. Наиболее важными эффектами МСК в созревании иммунного ответа при трансплантационном иммунитете являются полное угнетение пролиферации Т-клеток.



Иммунорегуляторные свойства МСК описаны в ряде экспериментальных работ по моделированию аллореактивного иммунного ответа (органная и клеточная трансплантация аутоиммунитета и противоопухолевого иммунитета на животных [40, 47-49]. Кроме того показано, что посредством секреции цитокинов и ростовых факторов МСК оказывает протекционное действие в отношении тканей: подвергающихся ишемически-реперфузным повреждениям [48].

Способность МСК предотвращать развитие РТПХ посредством секреции растворимых факторов, непосредственного клеточного контакта с аллореактивными Т-клетками, либо за счет угнетения функции дендритных клеток, а также участие МСК в reparации поврежденных тканей путем секреции ростовых и трофических факторов, трансдифференировки или fusion-феномена делают их перспективным универсальным материалом в клеточной трансплантологии. Однако для успешного применения МСК в клинических целях необходимо дальнейшее изучение биологических свойств МСК как *in vivo*, так и *in vitro*, т.к. условия культивирования могут значительно повлиять на функциональную активность клеток, а также привести к аккумуляции молекулярных нарушений [50]. Использование же разных методов выделения и культивирования клеток приводит к получению разнородных популяций МСК, значительно отличающихся по характеристикам.

### **Заключение**

Основываясь на результатах научных исследований последних лет о том, что стволовые клетки ККМ интегрируются в ткань миокарда в чрезвычайно низком количестве по механизму слияния с резидентными кардиомиоцитами (fusion-феномен) вне зоны формирования послеинфарктного рубца в экспериментальной модели [10] и не оказывают положительного эффекта на функциональное состояние левого желудочка после инфаркта [9], следует отметить, что выводы о кардиомиогенном

потенциале МСК являются преждевременными. Участие трансплантированных МСК в формировании патологических инкапсулированных структур в миокарде, содержащих очаги кальцификации и оссификации, доказанное в исследовании Breitbach et al. [51], еще более ставит под сомнение тканеспецифичную судьбу трансплантированных МСК и требует осторожности и критичности в интерпретации единичных случаев успешной трансдифференцировки стволовых клеток.

Нами показано, что МСК костного мозга человека не дифференцируются в функционально активные кардиомиоциты *in vitro*, несмотря на то, что некоторые клетки демонстрируют повышенный уровень экспрессии кардиоспецифических генов при культивировании в среде, содержащей индукторы дифференцировки, или при совместном культивировании с нативными кардиомиоцитами. Противоположные результаты, полученные другими исследователями, оказались, по меньшей мере, невоспроизводимыми.

Расхождения между опубликованными данными могут возникнуть вследствие значительных вариаций протоколов выделения и характеристики МСК между разными лабораториями. Поскольку строма костного мозга состоит из различных типов МСК, вариабельность параметров, используемых для сортировки клеток, и их адгезивных свойств, а также последующие условия культивирования могут привести к выделению и росту различных клеточных типов, обладающих разными пролиферативными свойствами в разных исследованиях.

Например, Bedada et al. [26] показали, что стромальные клетки ККМ могут различаться по экспрессии двух популярных клеточных маркеров CD34 и Sca-I без различий в адгезивной способности, пластичности и дифференционном потенциале. На сегодняшний день неизвестно, в какой степени подобные различия в фенотипе влияют на кардиомиогенный потенциал субклонов МСК. Вероятно, успех некоторых

исследований по кардиомиогенной дифференцировке стромальных клеток ККМ достигнут именно благодаря использованию редкой субпопуляции МСК, способных к трансформации в кардиомиоциты. Если данная субпопуляция МСК существует, методики выделения клеток должны быть унифицированы и воспроизводимы, а критерии оценки кардиомиогенной трансдифференцировки - более весомыми, чем простая детекция экспрессии кардиоспецифических генов.

Таким образом, несмотря на то, что МСК костного мозга демонстрируют значительную пластичность и подвергаются частичной дифференцировке при манипуляциях с ними *in vitro*, они неспособны приобретать функциональные характеристики полноценных кардиомиоцитов. Следовательно, механизмы положительного эффекта трансплантации МСК на регенерацию миокарда связаны с их влиянием на процессы ремоделирования и ангиогенеза посредством секреции цитокинов и ростовых факторов, а не с непосредственным участием в клеточной регенерации миокарда. Вследствие своего уникального иммунорегуляторного потенциала и способности к секреции широкого спектра трофических и ростовых факторов, МСК должны рассматриваться как идеальный инструмент генной и регенеративной терапии ишемических повреждений миокарда.

### **Литература**

1. Guo, J. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction / J. Guo [et al.] // Inflammation. - 2007. - Vol. 30. - P. 97-104.
2. Pittenger, M.F. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / M.F. Pittenger [et al.] // Science.-1999.-Vol. 284.-P. 143-146.
3. Sun, S. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method / S. Sun [et al.] // Stem Cells. -2003. - Vol. 21. - P. 527-535.

4. Tse, W.T. Suppression of allogenic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation / W.T. Tse [et al.] // Transplantation. -2003.-Vol. 75.-P. 389-397.
5. Gojo, S. In vivo cardiovaskulogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells / S. Gojo [et al.] // Exp. Cell. Res. - 2003. - Vol. 288. - P. 51 -59.
6. Mackenzie, T.S. Multilineage differentiation of human MSC after in utero transplantation / T.S. Mackenzie, A.W. Flake // Cytotherapy. - 2001. - Vol. 3. - № 5. -P. 403^05.
7. Tomita, S. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation / S. Tomita [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg.-2002.-Vol. 123.-P. 1132-1140.
8. Wang, J.-S. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: Pathophysiologic and therapeutic implications / J.-S. Wang [et al.] Hi. Thorac. Cardiovasc. Surg. -2001. - Vol. 122. -P. 699-705.
9. Kolossov, E. Engrafrment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium / E. Kolossov [et al.] // JEM. -2006. - Vol. 203(10). - P. 2315-2327.
10. Nygren, J.M. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation / J.M. Nygren [et al.] //Nature Medicine. -2004. - Vol. 10(5)-P. 494-501.
11. Bittira, B. In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration / B. Bittira [et al.] // Ann. Thorac. Surg. - 2002. - Vol. 74. - P. 1154-1160.
12. Makino, S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro / S. Makino [et al.] // J. Clin. Investigation.-1999.-Vol. 103.-P. 697-705.

13. Shim, W.S.N. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells / W.S.N. Shim [et al.] // BBRC. - 2004. - Vol. 324. P.48-188.
14. Мастицкая, СЮ. Возможности направленной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека в кардиомиоциты *in vitro* I СЮ. Мастицкая [и др.] // Медицина. - 2009. - № 1 (64). - С. 32-36.
15. Clarke, K.R. PRIMER v6: User Manual / K.R. Clarke, R.N. Gorley. - Plymout: PRIMER-E., 2006. -126 p.
16. Friedenstein, A. J. The development of fibroblast coloni in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow ai spleen cells / A.J. Friedenstein, R.K. Chailakja K.S. Lalykina//Cell. Tissue. Kinet.-1970.-Vol. 3 P. 393-403.
17. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells /A.I. Caplan// Orthop. Res. -1991. - Vol. 9. - P. 641 -650.
18. Heng, B.C. Strategies for directing the differentiation stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitn B.C. Heng [et al.] // Cardiovasc. Res. -2004. - Vol. e -P. 34-42.
19. Ventura, C Hyaluronan mixed esters of butyric a retinoic acid drive cardiac and endothelial fate in tei placenta human mesenchymal stem cells and enhan cardiac repair in infarcted rat hearts / C Ventura [et a Hi. Biol.Chem.- 2007.-Vol.282-№ 19.-P. 1424 14252.
20. Toma, C Human mesenchymal stem cells differentii to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine he / C Toma [et al.] // Circulation. - 2002. - Vol. 105 P. 93-98.
21. Wang, X.-J. The roles of mesenchymal stem cells (MSC therapy in ischemic heart diseases / X.-J. Wang, Q.-P. // BBRC. - 2007. - Vol. 359. - P. 189-193.
22. Shake, J.G. Mesenchymal stem cell implantation u swine myocardial infarct model: engraftment a functional effects / J.G. Shake [et al.] //Ann. Thor; Surg.-2002.-Vol. 73.-P. 1919-1926.

23. Vulliet, PR. Intra-coronary arterial injection mesenchymal stromal cells and microinfarction in dc / PR. Vulliet [et al.] // Lancet. - 2004. - Vol. 363 P. 783-784.
24. Yoon, Y.S. Unexpected severe calcification af transplantation of bone marrow cells in act myocardial infarction / Y.S. Yoon [et al.] // Circulate - 2004.-Vol. 109.-P. 3154-3157.
25. Nassiri, S.M. 2007. The similar effect of transplantat: of marrow-derived mesenchymal stem cells with without prior differentiation induction in experimer myocardial infarction / S.M. Nassiri [et al.] // J. Biom Sci.-2007.-Vol. 14.-P. 745-755.
26. Bedada, F.B. Activation of myogenic differentiat pathways in adult bone marrow-derived stem eel F.B. Bedada [et al.] // Mol. Cell. Biol. - 2005. - Vol. - P. 9509-9519.
27. Christman, J.K. 5-Azacytidine and 5-aza-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylati mechanistic studies and their implications for can therapy / J.K. Christman // Oncogene. - 2002. -1 21.-P. 5483-5495.
28. Yoshida, M. TrichostatinAandtrapoxin: novel chem. probes for the role of histone acetylation in chrom; structure and function / M. Yoshida, S. Horinou T. Beppu//Bioassays. -1995. - Vol. 17. -P. 423-4
29. Shiota, M. Isolation and characterization of b marrow-derived mesenchymal progenitor cells \ myogenic and neuronal properties / M. Shiota [et a / Exp. Cell Res. - 2007. - Vol. 313. - P. 1008-1023.
30. Neuss S. Assessment of stem cell - biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering / S. Neuss [et al.] // Biomaterials. - 2008. - № 29. - P. 302-313.
31. Xu, M. Differentiation of bone marrow stromal cells into the cardiac phenotype requires intercellular communication with myocytes / M. Xu [et al.] // Circulation. -2004. - Vol. 110. -P. 2658-2665.

32. Sadat, S. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF / S. Sadat [et al.] // BBRC. -2007. - Vol. 363. - P. 674-679.
33. Bacigalupo, A. T-cell suppression mediated by mesenchymal stem cells is deficient in patients with severe aplastic anemia / A. Bacigalupo [et al.] // Exp. Hematol. -2005. - Vol. 33. - P. 819-827.
34. Rasmusson, I. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells / I. Rasmusson [et al.] // Transplantation. - 2003. -Vol. 76.-P. 1208-1213.
35. Le Blanc, K. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes / K. Le Blanc [et al.] // Scand. J. Immunol. - 2004. -Vol. 60.-P. 307-315.
36. Krampera, M. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells / M. Krampera [et al.] // Stem Cells.-2006.-Vol. 24.-P. 386-398.
37. Di Nicola, M. Human bone marrow stromal cells suppress T lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli / M. Di Nicola [et al.] // Blood. - 2002. - Vol. 99. -P. 3838-3843.
38. Meisel, R. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation / R. Meisel [et al.] // Blood. -2004. - Vol. 103. - P. 4619-4621.
39. Plumas, J. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells / J. Plumas [et al.] // Leukemia. -2005. -Vol. 19.-P. 1597-1604.
40. Zappia, E. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy / E. Zappia [et al.] // Blood - 2005. - Vol. 106.-РЛ 755-1761.

41. Aggarwal, S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / S. Aggarwal, M.F.Pittenger//Blood.-2005.-Vol. 105.-P. 1815-1822.
42. Jiang, X.X. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells / X.X. Jiang [et al.] // Blood. - 2005. -Vol. 105.-P. 4120-4126.
43. Nauta, A.J. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells / A.J. Nauta [et al.] // J. Immunol. -2006.-Vol. 177.-P. 2080-2087.
44. Corcione, A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions / A. Corcione [et al.] // Blood. - 2006. -Vol. 107.-P. 367-372.
45. Sotiropoulou, PA. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells / PA. Sotiropoulou [et al.] // Stem Cells. -2006. - Vol. 24. -P. 74-85.
46. Nauta, A.J. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells / A.J. Nauta, W.E. Fibbe // Blood. -2007. - Vol. 110. - P. 3499-3506.
47. Bartholomew, A. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo / A. Bartholomew [et al.] // Exp. Hematol. -2002.-Vol. 30.-P. 42-48.
48. Togel, F. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation independent mechanisms / F. Togel [et al.] //Am. J. Physiol. Renal. Physiol. -2005. - Vol. 289. -P.F31-F42.
49. Yanez, R. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AD-MSC) have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of graft-versus host disease (GVHD) / R. Yanez [et al.] // Stem Cells. -2006. - Vol. 24. - P. 2582-2591.
50. Rombouts, W.J. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture / W. J. Rombouts, RE. Ploemacher //Leukemia.-2003.-Vol. 17.-P. 160-170.

51. Breitbach, M. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts / M. Breitbach // Blood.-2007.-Vol. 110.-P. 1362-1369.