

Разработка подходов активации прогениторного потенциала резидентных стволовых клеток сердца с целью регенерации ткани миокарда

Актуальность исследования

Инфаркт миокарда является самой частой причиной смертности во всем мире, а аномалии развития сердца, являются наиболее распространёнными врождёнными пороками на сегодняшний день. Оба эти состояния связаны с утратой функциональной ткани миокарда и требуют медицинского вмешательства. Понимание механизмов, при помощи которых возможно реактивировать регенерацию ткани миокарда при его повреждении, является крупной научной проблемой, а разработка новых подходов, связанных с клеточной терапией, к коррекции таких повреждений имеет первостепенное значение для здравоохранения. Настоящий проект направлен на поиск механизмов активации прогениторного потенциала резидентных стволовых клеток сердца *in vivo* и *in vitro*. Конечной целью проекта является поиск способа активации резидентных стволовых клеток сердца для регенерации ткани миокарда при повреждении.

Научная платформа

Инновационные фундаментальные технологии в медицине

Планируемый (ые) научные подразделения исполнители (с указанием руководителя исследования)

Руководитель проекта - к.б.н., зав. НИЛ молекулярной кардиологии и генетики Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России Малашичева А. Б.
Исполнители:
Институт перинатологии и педиатрии
Институт экспериментальной медицины
Институт молекулярной биологии и генетики

Ключевые слова

Резидентные стволовые клетки сердца, врождённые пороки сердца, инфаркт миокарда, регенерация, кардиомиоциты, гипоксия.

Цель проекта

Поиск факторов, активирующих прогениторный потенциал резидентных стволовых клеток сердца

Задачи проекта

- 1.Получение резидентных стволовых клеток сердца из тканей пациентов с врождёнными пороками сердца (тетрада Фалло, ДМПП, ДМЖП); фенотипическая и функциональная характеристика клеток. Соотнесение функциональных свойств клеток с тяжестью порока и его характеристиками (сатурация, фракция выброса). Оценка потенциала резидентных стволовых клеток к дифференцировке в кардиогенном, остеогенном и адипогенном направлениях в зависимости от гипоксического повреждения и возраста пациента. Оценка активации/инактивации ключевых кардиогенных сигнальных путей TGF- β , Wnt, Notch.
2. Исследование активационного воздействия гипоксии на прогениторные свойства резидентных стволовых клеток сердца крысы в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Сравнение клеток, происходящих из здорового и постинфарктного миокарда

3. Исследование активационного воздействия гипоксии на прогениторные свойства резидентных стволовых клеток сердца человека в экспериментах *in vitro*.

Ожидаемые результаты проекта

В результате выполнения проекта мы предполагаем получить новые данные о потенциальных механизмах активации прогениторных свойств резидентных стволовых клеток сердца. Использование уникального клинического материала от пациентов с врожденными пороками сердца, включая пациентов самого раннего возраста с критической гипоксией, позволит сделать фундаментальные заключения о возможностях регенерации ткани миокарда и роли гипоксического повреждения миокарда в активации регенераторного потенциала. Экспериментальная часть проекта на модели инфаркта крыс (гипоксия *in vivo*), а также гипоксическое воздействие на клетки *in vitro* позволят охарактеризовать разные типы гипоксического воздействия и их роль в активации прогениторного потенциала резидентных стволовых клеток сердца. Оценка активности ключевых кардиогенных сигнальных путей TGF- β , Wnt, Notch при гипоксическом воздействии позволит выявить новые потенциальные сигнальные механизмы, вовлечённые в активацию прогениторного потенциала резидентных стволовых клеток миокарда.

Назначение и предполагаемое использование (внедрение) результатов проекта

Результаты проекта будут использованы в дальнейших фундаментальных исследованиях, посвящённых регенерации миокарда, а также в прикладных разработках, имеющих конечной целью активацию резидентных стволовых клеток сердца для регенерации ткани миокарда при повреждении.

Описание предлагаемого научного исследования

Инфаркт миокарда является самой частой причиной смертности во всем мире, а аномалии развития сердца, являются наиболее распространёнными врождёнными пороками на сегодняшний день. Оба эти состояния связаны с утратой функциональной ткани миокарда и требуют медицинского вмешательства. Понимание механизмов, при помощи которых возможно реактивировать регенерацию ткани миокарда при его повреждении, является крупной научной проблемой, а разработка новых, связанных с клеточной терапией подходов к коррекции таких повреждений имеет первостепенное значение для здравоохранения. Настоящий проект направлен на поиск механизмов активации прогениторного потенциала резидентных стволовых клеток сердца *in vivo* и *in vitro*. Конечной целью проекта является поиск способа активации резидентных стволовых клеток сердца для регенерации ткани миокарда при повреждении. На протяжении долгого времени считалось, что сердце в ходе своего развития теряет способность к самообновлению и после рождения представляет собой орган с терминальной клеточной дифференцировкой. На основе этой парадигмы единственным ответом кардиомиоцитов на стресс являлась их гипертрофия или гибель. Однако в сердце взрослого человека смогли выявить репликацию миоцитов, кариогенез, цитокинез и очаги спонтанной регенерации миокарда (Konrad Urbanek et al., 2005). Ак были открыты и описаны так называемые резидентные стволовые клетки сердца, которые по-видимому принимают непосредственное участие в регенерации миокарда при повреждении. Резидентные стволовые клетки сердца представляют собой гетерогенную группу клеток, распределённых по всему сердцу (в предсердиях, желудочках, эпикарде или в перикарде). В норме резидентные стволовые клетки сердца находятся в покое и не участвуют в обновлении популяций кардиомиоцитов. Эти клетки экспрессируют спектр кардиоспецифичных маркеров, таких как тропонин I, GATA4, Nkx2.5 и MEF2C. Выделяют несколько типов популяций резидентных стволовых клеток сердца, такие как: C-Kit+

популяция; cardiospheres/cardiosphere-derived cells (CDCs); эпикард-производные клетки; популяция клеток стенки сердца; stem cell antigen-1 (Sca-1+) популяция; Islet-1 (Isl-1+), экспрессирующие тромбоцитарный фактор роста рецептора- α (PDGFR α +). Группы популяций резидентных стволовых клеток сердца идентифицированы по различным мембранным маркерам (Sca-1, Abcg-2, FLK-1, CD34, CD90 и CD105) и транскрипционными факторами (ISL-1, Nkx2.5, MEF2C и GATA4) в сердце в неонатальный и постнатальный период. Они экспрессируют несколько маркеров, характерных для стволовых клеток (Oct3/4, BMI-1 и Nanog) и, соответственно, являются клоногенными, самообновляющимися и мультипотентными (TYL Le, 2016). Интерес к использованию резидентных стволовых клеток сердца в клинике после их детальной характеристики только увеличивался (Rossio M., 2008); были проведены исследования возможности использования резидентных стволовых клеток сердца в регенерации миокарда после развития сердечной недостаточности в результате острого инфаркта миокарда. Структура и клеточный состав, сформированный в миокарде после инфаркта, доказывает, что клеточная популяция резидентных стволовых клеток сердца быстро реплицируется и дифференцируется при имплантации в пораженные инфарктом ткани сердца. Было показано, что ишемическая сердечная недостаточность временно приводит к активации резидентных стволовых клеток сердца (Konrad Urbanek, 2005). Эндогенные регенеративные свойства миокарда млекопитающих в постнатальный период могут быть активированы путем воздействия системной гипоксии, так как экзогенный кислород вызывает митохондриально-зависимое оксидативное повреждение ДНК, которое участвует в регуляции клеточного цикла резидентных стволовых клеток сердца. (Yujji Nakada, 2016). В представляемом проекте будут подробно изучены различные типы гипоксического воздействия *in vivo* и *in vitro* на регенеративную функцию (прогениторный потенциал) резидентных стволовых клеток:

1. на модели клеток человека, происходящих от пациентов с тетрадой Фалло;
2. на модели клеток крысы, происходящих либо из нормального, либо из постинфарктного миокарда.
3. Будет также исследован эффект экспериментальной гипоксии *in vitro*.

Мы полагаем, что в результате выполнения проекта будет разработан протокол искусственной активации прогениторного потенциала резидентных стволовых клеток сердца с применением гипоксического воздействия и/или активации/инактивации определённых сигнальных путей. Такие активированные клетки в конечном счёте должны будут способствовать регенерации миокарда при повреждении. Будут изучены фундаментальные механизмы такой активации. Будет оформлена заявка на патент по методике метаболического профилирования стволовых клеток с целью повышения эффективности их использования при патологии сердечно-сосудистой системы.

Описание научных подходов и методов, используемых для решения поставленных задач

Механизмы активации прогениторного потенциала резидентных стволовых клеток сердца будут исследованы *in vitro* на клетках, полученных из постоперационных участков миокарда пациентов детского возраста; группы пациентов будут различаться по степени выраженности симптомов гипоксии (так называемы «синие» и «белые» варианты тетрады Фалло). Это позволит оценить вклад гипоксического воздействия на прогениторные свойства клеток; выведение в культуру будет проводиться по стандартным методикам и протоколам, разработанным в лаборатории (Малашичева с соавт. 2015). Для исследования другого типа гипоксического воздействия на прогениторный потенциал *in vivo* будет проведено сравнение функциональных свойств резидентных стволовых клеток, полученных из участков здорового миокарда, и из миокарда, подвергнутого ишемическому повреждению (экспериментальный инфаркт) на модели крыс. Третьим типом гипоксического воздействия будет являться культивирование клеток в условиях

экспериментальной гипоксии (в специальном инкубаторе в присутствии 1% кислорода вместо содержания кислорода в норме 20 %)

Клетки будут охарактеризованы по экспрессии специфических маркеров методом проточной цитофлуориметрии, количественной ПЦР в реальном времени, вестерн блоттингом, иммуноцитохимическими и иммуногистохимическими методами. Прогениторный потенциал будет проанализирован при помощи оценки дифференцировки клеток в адипо- остео- и кардиогенном направлении при помощи перечисленных методик. Будет исследована активность сигнальных путей TGF- β , Notch, Wnt при помощи оценки экспрессии генов и уровня соответствующих белков, а также при помощи анализа активации репортерных конструкций, специфических для изучаемых сигнальных путей.

Применяемые подходы позволят охарактеризовать клеточно-молекулярные звенья, активирующие прогениторный потенциал резидентных стволовых клеток. Конечной целью проекта является создание экспериментальной модели, в которой активация прогениторного потенциала может быть произведена искусственно в эксперименте, и такие клетки будут способны регенерировать ткань миокарда, что предполагается подтвердить на модели инфаркта крысы.