

*Е.А. Шуман<sup>1,2</sup>, А.В. Коротков<sup>1,2</sup>, О.Г. Макеев<sup>1,2</sup>*

## **ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕННО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ МОДЕЛИРУЕМОЙ ИШЕМИИ СЕРДЦА**

<sup>1</sup> ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,  
г. Екатеринбург, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский  
университет», г. Екатеринбург, Российская Федерация

В последние годы большие надежды в области терапевтического ангиогенеза связаны с разработкой технологии клеточной терапии [1, 2, 3].

Однако, при оценке ее эффективности в двойных слепых плацебо-контролируемых исследованиях, получены неоднозначные результаты [4, 5, 6, 7]. Так, в исследованиях «ASTEMI», «BOOST» и «REPAIR-AMI» «TOPCARE-CHD» зарегистрированное увеличение фракции выброса (ФВ) через 18 месяцев вернулось к изначальным показателям за счет увеличения ФВ в контрольной группе.

Поскольку не во всех контролируемых исследованиях по клеточной терапии оценивали перфузию миокарда, говорить о вкладе стимуляции ангиогенеза в улучшение функции сердца до сих пор затруднительно. В тоже время, результаты экспериментальных работ, которые явились основой для проведения клинических испытаний, позволяют утверждать, что стимуляция неоваскуляризации при введении клеток является одним из основных механизмов их терапевтического эффекта.

Одной из причин недостаточной эффективности клеточной терапии может быть снижение ангиогенной активности аутологичных прогениторных клеток у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС), особенно у пациентов пожилого возраста.

Учитывая весьма существенный вклад паракринных меха-

низмов в индукцию неоваскуляризации, вполне возможно, что именно секреторная активность клеток, а не их дифференцировочные свойства, определяет ангиогенную и тканепротективную эффективность. Если это так, то усиление паракринных эффектов трансплантируемых клеток путем их генетической трансформации с помощью генетических конструкций, может быть перспективным подходом к повышению эффективности клеточной терапии.

Использование генетически модифицированных ММСК и прогениторных клеток — сочетание генной и клеточной терапии — позволяет усилить положительные стороны каждого метода и, вероятно, нейтрализовать отрицательные. Введение в культивируемые клетки генов дает шанс снизить гибель клеток после трансплантации, а также количество клеток, необходимое для достижения эффекта. Возможность *in vitro* помещать в клетки генетические конструкции, отбирать и вводить определенное количество модифицированных клеток позволяет повысить эффективность трансфекции при прямой генной терапии и исключить иммунный ответ и неизбежные риски, связанные, например, с неконтролируемой генетической рекомбинацией при использовании аденовирусных векторов.

Исследований, направленных на изучение эффективности применения ММСК, предварительно трансфецированных векторами, обеспечивающими эпигеномную экспрессию генов репрограммирования, для терапии коронарной недостаточности в доступной литературе нами не отмечено.

Тем более отсутствуют данные о возможности применения клеток, полученных путем трансфецирования ММСК «коктейлем Яманаки». Тем не менее следует ожидать, что данные клетки могут обладать значимо большим регенераторным потенциалом в отношении клеток миокарда.

С учетом вышесказанного, целью работы явилась оценка эффективности применения ММСК, трансфецированных невирусными векторами, несущими гены клеточного репрограммирования: OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-MYC, и KLF4.

### **Материалы и методы**

В качестве вектора нами были использованы не интегрирующиеся в геном клеток плазмидные векторы генов факторов транскрипции: OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-MYC, и KLF4 (Dana Farber Cancer Institute, Wisconsin National Primate Research Center, University of Wisconsin-Madison).

### ***Процедура трансфекции***

ММСК выделяли из жировой ткани кролика методом, описанным нами ранее. В наших исследованиях для репрограммирования ММСК были использованы не интегрирующиеся в геном клеток плазмидные векторы генов факторов транскрипции: OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-MYC, и KLF4. Полученные клетки трансфецировали с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen) по стандартному протоколу. Выбор не интегрирующихся в геном плазмид, а не вирусных векторов, обладающих наибольшей эффективностью репрограммирования, был обусловлен сугубо практическими соображениями — возможностью их клинического использования, так как применение вирусов с встроенными генами способно привести и к негативным последствиям, обусловленным их встраиванием в геном с возможной рекомбинацией и/или развитием генетической нестабильности.

Следует отметить, что используемый протокол трансфекции отличается высокой эффективностью. Так, экспрессия вводимых генов в среднем, составила 4,47% от экспрессии гена домашнего хозяйства Abl.

### ***Имплантация трансфецированных клеток***

Эксперименты проводили на взрослых кроликах-самцах породы Шиншилла весом 2,8-3,2 кг. Моделирование окклюзии передней нисходящей артерии сердца осуществляли путем ее неполной (80%) перевязки на матроне. Сразу после перевязки в миокард в область ишемии равномерно по площади вводили  $10^6$  предварительно трансфецированных клеток с последующим ушиванием раны.

Спустя 30 суток после вмешательства проводили исследования парциального давления кислорода в миокарде методом полярографии, и далее на иссеченных участках миокарда определяли число капилляров, их диаметр, обменную поверхность и емкость капиллярного русла.

Статистический анализ проведен в программе RStudio (Version 1.1.463 – © 2009-2018 RStudio, Inc.). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты

Результаты морфологического исследования микроциркуляторного русла биоптата ишемизированного миокарда кроликов через 30 суток после однократного внутримиокардиального введения физиологического раствора (группа животных №1), ММСК (группа животных №2) и после однократного внутримиокардиального введения репрограммированных ММСК ЖТ в физиологическом растворе в количестве  $10^6$  клеток на  $\text{см}^2$  (группа животных №3) представлены в таблице 1.

Известные данные литературы об эффектах внутримиокардиального введения ММСК позволяли ожидать от проведенного эксперимента если не изменения диаметра открытых капилляров, являющегося видоспецифичным и консервативным параметром, то роста числа и длины капилляров. Однако в нашем исследовании в ишемизированном миокарде наблюдается лишь тенденция к увеличению числа капилляров и их длины (на 12,5%). Единственным показателем, соответствующим критерию достоверности отличий, стала площадь обменной поверхности капилляров, возросшая на 17,7% (таблица 1). Вместе с тем, данный показатель отражает не столько сам процесс обмена, сколько расчетную поверхность, через которую обмен потенциально возможен.

При этом физиологическая значимость увеличения площади обменной поверхности капилляров должна быть подтверждена результатами функциональных тестов, в частности увеличением парциального давления кислорода в зоне ишемии, измеряемом непосредственно в ткани на «открытом сердце» поляро-

графическим методом. Не менее информативным показателем является уровень радиоактивности биоптата сердца после тугого посмертного заполнения сосудистого русла раствором радиоактивного уранила через прокол ниже места окклюзии передней нисходящей ветви левой коронарной артерии.

Таблица 1  
Морфо-функциональные показатели микроциркуляторного русла ишемизированного миокарда кролика через 30 суток после лигирования артерии

Параметры микроциркуляторного русла миокарда	Контрольная группа (модель коронарной недостаточности)	Введение ММСК	Введение репрограммированных ММСК-ЖТ
	Группа животных № 1	Группа животных № 2	Группа животных № 3
Число капилляров n (на 1 мм <sup>2</sup> среза)	3661,0±92,0	3870,0±181,1	3880,1±191,9
Диаметр открытых капилляров d (мкм)	6,50±0,30	6,81±0,34	6,92±0,35
Длина функционирующих капилляров L (мм/мм <sup>2</sup> )	2120,0±80,0	2384,0±126,0	2362,0±68,0*
Площадь обменной поверхности капилляров S (мм <sup>2</sup> /мм <sup>3</sup> )	43,30±0,94	50,98±2,72*	51,32±1,68*
pO <sub>2</sub> (mmHg)	18,0±4,8	21,6±1,3	20,08,18±3,3
Радиоактивность уксуснокислого уранила-238 на грамм ткани (сухой вес), кБк	0,79±0,06	0,78±0,04	0,74±0,05

\* отличия опытной группы от контрольной (p≤0,05).

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии физиологической значимости продемонстрированного возрастания площади обменной поверхности капилляров миокарда. На это указывают несущественные колебания показателей pO<sub>2</sub>

и накопления радионуклида в сосудистом русле, не превышающего полутора процентов.

Приведенные данные, несмотря на достаточно точное следование методологии исследования группы Дж. Брайна [3], принятого нами за прототип, не подтверждают ангиостимулирующий эффект трансфенцированных ММСК при моделируемой ишемии миокарда. Впрочем, это не дает оснований категорично отвергать саму возможность дифференцировки инъецированных в ткани аутологичных ММСК в те или иные ткани миокарда. По-видимому, речь может идти об ином (не ангиопротективном) векторе дифференцировки мультипотентных клеток, реализуемом, вероятно, на другом гуморальном фоне, и/или временном диапазоне.

Еще одной возможной причиной отсутствия ангиогенных эффектов ММСК-ЖТ может быть их недостаточный потенциал мультипотентности в отношении дифференцировки в отдельные типы клеток-предшественников. Однако увеличение потенциальности ММСК является не тривиальной задачей, для решения которой методология Синья Яманаки является безальтернативным подходом [4].

В тоже время, достижимость репрограммирования ММСК позволяет рассматривать сразу два возможных механизма индукции: аутокринный, предусматривающий трансдифференцировку ММСК в ишемизированной ткани в прогениторные клетки-предшественники эндотелиоцитов, кардиомиоцитов, пейсмейкерных клеток и перицитов, и паракринный, реализация которого связана с изменением клеточного микроокружения кардиомиоцитов за счет белков, кодируемых введенными в ММСК эмбриональными генами и экскретируемыми в околоклеточную среду в том числе в виде экзосом с малыми интерферирующими РНК, отвечающими за регуляцию пролиферации. Так или иначе, но в доступных литературных источниках практически отсутствуют сведения о том, какой эффект репрограммирование трансплантируемых в миокард клеток оказывает на новообразование сосудов.

Репрограммирование ММСК, достигаемое посредством

трансфекции плазмидами с встроенным геном, максимально расширяет их дифференцировочный потенциал вплоть до способности к образованию клеток основных зародышевых листков. Это может иметь большое значение для преодоления ограниченности взрослых мультипотентных прогениторов, сокращая дистанцию до эмбриональных плюрипотентных клеток. Однако полученные результаты не подтверждают дифференцировку репрограммированных ММСК в составляющие микрососудистого русла. Так, изменение числа капилляров, не превышающее шести процентов по сравнению с контрольной группой, достоверно не отличается от показателей первой и второй групп с введением ММСК-ЖТ. Диаметр капилляров так же остается в пределах статистической погрешности.

В то же время длина функционирующих капилляров и расчетная площадь обменной поверхности капилляров достоверно выше на 11,4 и 18,5% соответственно по сравнению с контрольной группой животных, но не с группой с введением ММСК. Между тем, функциональные показатели микрососудистого русла ( $pO_2$  и объемная радиоактивность уранила-238) не подтверждают физиологическую значимость зарегистрированных превышений уровней контрольной группы.

Полученные результаты проведенного эксперимента не позволили получить убедительных доказательств того, что репрограммированные ММСК, обладающие большим дифференцировочным потенциалом, способны к формированию микрососудистого русла в ишемизированном миокарде.

Полученные данные согласуются с целым рядом публикаций, авторы которых объясняют отсутствие позитивного результата исходя из того, что все успешные данные показаны на клетках мышей, в то время как репрограммирование клеток других млекопитающих сопровождается существенными трудностями. Следует отметить, что набор факторов репрограммирования, использованный авторами работ, в которых было зарегистрировано успешное репрограммирование, не всегда, даже в условиях культуры, способен репрограммировать клетки-предшественники миоцитов в кардиомиоциты.

Кроме того, в цитируемых работах успех или неуспех репрограммирования оценивался по появлению новообразованных кардиомиоцитов, но не новых сосудов, для чего были использованы факторы прямого репрограммирования фибробластов сердца именно в кардиомиоциты. Вместе с тем, без восстановления кровоснабжения — неоангиогенеза такой подход неприемлем. Авторы работ отмечают, что новообразованные кардиомиоциты если и появляются, то только по периферии зоны ишемии.

В параишемической зоне фиксируется наибольшее новообразование микрососудов. Это, с одной стороны свидетельствует о значении комплекса гуморальных факторов, выделяемых ишемизированными и разрушенными клетками миокарда, а с другой — о важной роли умеренной гипоксии, имеющей место в периинфарктной зоне. Сочетание двух составляющих способно индуцировать как новообразование кардиомиоцитов, так и микрососудов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Brakenhielm E, Richard V. Therapeutic vascular growth in the heart. *Vasc Biol.* 2019 Mar 28;1(1):H9-H15. doi: 10.1530/VB-19-0006. PMID: 32923948; PMCID: PMC7439849.
2. Sharma V, Dash SK, Govarathanan K, Gahtori R, Negi N, Barani M, Tomar R, Chakraborty S, Mathapati S, Bishi DK, Negi P, Dua K, Singh SK, Gundamaraju R, Dey A, Ruokolainen J, Thakur VK, Kesari KK, Jha NK, Gupta PK, Ojha S. Recent Advances in Cardiac Tissue Engineering for the Management of Myocardium Infarction. *Cells.* 2021 Sep 25;10(10):2538. doi: 10.3390/cells10102538. PMID: 34685518; PMCID: PMC8533887.
3. Brian J. Ford. *Genes, the fight for life*, ISBN 0-304-35019-2. UK, Cassells, 1999. ISBN 0-304-35019-2. USA, Sterling Publications, 1999
4. Shinya Yamanaka. *Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges.* *Cell Stem Cell.* 2020. 27(4), 523-531.
5. Merentie M, Lottonen-Raikaslehto L, Parviainen V, Huusko J, Pikkarainen S, Mendel M, Laham-Karam N, Kärjä V, Rissanen



R, Hedman M, Ylä-Herttuala S. Efficacy and safety of myocardial gene transfer of adenovirus, adeno-associated virus and lentivirus vectors in the mouse heart. *Gene Ther.* 2016 Mar;23(3):296-305. doi: 10.1038/gt.2015.114. Epub 2015 Dec 24. PMID: 26704723.

6. Mari Isomi, Taketaro Sadahiro, Masaki Ieda, Progress and Challenge of Cardiac Regeneration to Treat Heart Failure, *Journal of Cardiology*, Volume 73, Issue 2, 2019, Pages 97-101, ISSN 0914-5087, <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2018.10.002>

7. Vajda J, Milojević M, Maver U, Vihar B. Microvascular Tissue Engineering-A Review. *Biomedicines.* 2021 May 21;9(6):589. doi: 10.3390/biomedicines9060589. PMID: 34064101; PMCID: PMC8224375.