

Перспективы клеточной терапии инфаркта миокарда и сердечной недостаточности на основе клеток кардиосфер

К.В. Дергилев¹, Ю.Д. Василец¹, З.И. Цоколаева^{1,2}, Е.С. Зубкова¹, Е.В. Парфенова^{1,3}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия;

²Научно-исследовательский институт общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», Москва, Россия;

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Аннотация

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной заболеваемости и смертности населения во всем мире. В последние годы внимание исследователей привлечено к использованию клеточной терапии на основе трансплантации стволовых клеток и клеток-предшественников, что явилось многообещающей стратегией восстановления сердца после повреждения. Однако проведенные исследования с использованием внутрикоронарной или внутримиокардиальной трансплантации разных типов стволовых/прогениторных клеток в виде клеточной суспензии показали весьма умеренную эффективность. Это обусловлено низкой степенью интеграции и выживаемости клеток после трансплантации. Для преодоления этих ограничений предложена концепция использования многоклеточных сфероидов, моделирующих естественное микроокружение клеток, что позволяет поддерживать их жизнеспособность и терапевтические свойства. Большой интерес представляет использование так называемых кардиальных сфероидов (кардиосфер) – самопроизвольно формирующихся в низкоадгезивных условиях трехмерных структур, состоящих из гетерогенной популяции прогениторных клеток миокарда и белков внеклеточного матрикса. В обзоре представлены данные о способах создания кардиосфер, направленной регуляции их свойств и репаративного потенциала, а также результаты доклинических и клинических исследований по их применению для лечения заболеваний сердца.

Ключевые слова: кардиосферы, клеточная терапия, регенерация сердца, инфаркт миокарда.

Для цитирования: Дергилев К.В., Василец Ю.Д., Цоколаева З.И. и др. Перспективы клеточной терапии инфаркта миокарда и сердечной недостаточности на основе клеток кардиосфер. *Терапевтический архив.* 2020; 92 (4): 111–120. DOI: 10.26442/00403660.2020.04.000634

Perspectives of cell therapy for myocardial infarction and heart failure based on cardiosphere cells

K.V. Dergilev¹, Iu.D. Vasilets¹, Z.I. Tsokolaeva^{1,2}, E.S. Zubkova¹, E.V. Parfenova^{1,3}

¹National Medical Research Center for Cardiology, Moscow, Russia;

²Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology of the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, Moscow, Russia;

³Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Cardiovascular diseases are the leading cause of morbidity and mortality worldwide. In recent years, researchers are attracted to the use of cell therapy based on stem cell and progenitor cells, which has been a promising strategy for cardiac repair after injury. However, conducted research using intracoronary or intramyocardial transplantation of various types of stem/progenitor cells as a cell suspension showed modest efficiency. This is due to the low degree of integration and cell survival after transplantation. To overcome these limitations, the concept of the use of multicellular spheroids modeling the natural microenvironment of cells has been proposed, which allows maintaining their viability and therapeutic properties. It is of great interest to use so-called cardiac spheroids (cardiospheres) – spontaneously forming three-dimensional structures under low-adhesive conditions, consisting of a heterogeneous population of myocardial progenitor cells and extracellular matrix proteins. This review presents data on methods for creating cardiospheres, directed regulation of their properties and reparative potential, as well as the results of preclinical and clinical studies on their use for the treatment of heart diseases.

Key words: cardiosphere, cell therapy, heart regeneration, myocardial infarction.

For citation: Dergilev K.V., Vasilets Iu.D., Tsokolaeva Z.I., et al. Perspectives of cell therapy for myocardial infarction and heart failure based on cardiosphere cells. *Therapeutic Archive.* 2020; 92 (4): 111–120. DOI: 10.26442/00403660.2020.04.000634

ЛЖ – левый желудочек

МРТ – магнитно-резонансная томография

ФВЛЖ – фракция выброса ЛЖ

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

βFGF (basic fibroblast growth factor) – фактор роста фибробластов

EGF (epidermal growth factor) – эпидермальный фактор роста

IGF-1 (insulin-like growth factor 1) – инсулиноподобный фактор роста-1

MHC (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости

TGFβ – трансформирующий фактор роста β

Введение

Несмотря на совершенствование терапевтических, эндovasкулярных и хирургических методов лечения, сердечно-сосудистые заболевания продолжают лидировать среди причин инвалидности и смертности во всем мире. Важную проблему составляет сердечная недостаточность, которая является следствием многих кардиологических заболеваний

и характеризуется крайне плохим прогнозом, сравнимым с таковым у онкологических больных. Так, ежегодная смертность среди пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) достигает 60%, и только 1/2 менее тяжелых больных выживают в течение 5 лет с момента постановки диагноза. В значительной степени это обусловлено отсутствием средств и методов, которые могли бы обеспечить возможность замещения утраченных клеток миокарда и ак-

тивации эндогенных регенеративных механизмов. В этом направлении особое внимание привлечено к клеточной терапии, с которой связывались большие надежды на восстановление утраченных клеток сердца. Однако первоначальная концепция, основанная на представлениях о внесердечных стволовых клетках, прежде всего клетках костного мозга, как клетках, способных дифференцироваться в кардиомиоциты и восстанавливать миокард, не получила своего подтверждения, а регенеративные эффекты клеток объяснялись их паракриной активностью – способностью секретировать коктейль биологически активных факторов и высвобождать внеклеточные везикулы, переносимые в клетки сердца мРНК и регуляторные микроРНК, запускающие в них регенеративную программу [1–3]. Но для проявления всех этих эффектов трансплантированные клетки должны сохранять жизнеспособность в течение более-менее длительного времени после трансплантации. Однако оказалось, что способ введения клеток в виде суспензии, который использовался при проведении первого поколения клеточной терапии, приводил к гибели значительного количества клеток, что не позволяло реализоваться их регенеративным эффектам. При этом совершенно не учитывалось, что стволовые/прогениторные клетки не функционируют автономно, а в органах и тканях располагаются и функционируют в специфическом микроокружении – «клеточных нишах», которые регулируют их функции непосредственными взаимодействиями с компонентами внеклеточного матрикса и окружающими клетками [4]. Совокупность всех этих сигналов сохраняет активность стволовых клеток, поддерживает возможность обмена стимулами с внешней средой, тем самым обеспечивая клеточный гомеостаз и обновление ткани. В связи с этим для поддержания жизнеспособности и функционирования стволовых клеток после трансплантации необходима разработка методов их культивирования и трансплантации, сохраняющих микроокружение, моделирующее хотя бы отчасти «клеточную нишу» *ex vivo*.

В большинстве проведенных исследований для лечения заболеваний сердца использовались суспензии мононуклеарных клеток костного мозга или периферической крови или клетки мезенхимного фенотипа (мезенхимные стромальные клетки костного мозга и жировой ткани, скелетные миобласты и др.), культивированные в 2D-условиях, т.е. в состоянии, значительно отличающемся от их микроокружения *in vivo*. В условиях 2D-культивирования не может быть обеспечена более естественная для клеток пространственная 3D-организация матрикса, взаимодействие с клетками, направленное воздействие сил поверхностного натяжения кле-

точной мембраны, а также градиентов кислорода и факторов роста. Следствием этого могут быть нарушения основополагающих функций стволовых/прогениторных клеток, уменьшение или полная утрата их репаративного потенциала. К тому же перед введением в сердце клетки переводились в суспензию с помощью обработки протеолитическими ферментами, что нарушало межклеточные взаимодействия и способствовало апоптозу. Последующее попадание суспензии клеток в поврежденную ишемизированную ткань также не обеспечивало поддержания их жизнеспособности. Все это могло стать одной из причин неудовлетворительного эффекта клеточной терапии [5–7]. Преодоление этих проблем возможно путем использования многоклеточных сфероидов, которые обеспечивают трехмерное микроокружение и сохранение естественных межклеточных контактов, метаболического и секреторного регулирования. В данном обзоре представлены результаты исследований уникальной гетерогенной популяции прогениторных клеток миокарда, которые способны самопроизвольно воссоздавать 3D-микроокружение, подобное «клеточным нишам» миокарда, и формировать сфероиды (кардиосферы), служащие инструментом для научных целей и клеточной терапии. В обзоре описаны способ создания таких 3D-конструкций, основы регуляции их свойств и репаративного потенциала, а также результаты доклинических и клинических исследований по их использованию для лечения заболеваний сердца.

Получение кардиосфер и кардиосферообразующих клеток

Кардиосферы представляют собой 3D-сфероиды, имеющие высокий уровень компактизации и состоящие из клеток и белков внеклеточного матрикса. Технология их получения имеет сходство с методикой формирования нейросфер – сфероидов на основе нейральных клеток [8]. Классический алгоритм получения кардиосфер включает культивирование образцов миокарда в течение 14–28 дней в первичной эксплантной культуре с последующей ферментативной обработкой для получения кардиосферообразующих клеток. Затем полученную суспензию клеток высаживают в низкоадгезивные условия на чашки с поли-D-лизином, что приводит к образованию самоорганизующихся клеточных сфероидов. В центральной части сфероида локализуются клетки, экспрессирующие маркеры стволовых клеток Oct4 и c-kit, которые окружены клетками мезенхимного фенотипа (CD105+, CD73+) и сосудистыми/кардиальными клетками-предшественниками (Gata4+, Pecam+, SMA+); **рис. 1, см. на цветной вклейке**. Такая организация клеток в составе сфероидов возникает в результате действия множества факторов. Процесс самоорганизации сфероидов приводит к образованию как внешнего градиента для факторов в среде культивирования клеток (например, питательные вещества, кислород, факторы роста и др.), так и внутреннего градиента клеточных метаболитов и паракринных факторов за счет барьерной функции клеток, а также разного уровня потребления и производства этих факторов [9]. Помимо этого сформированный сфероид создает микроокружение, подоб-

Сведения об авторах:

Василец Юлия Дмитриевна – лаборант-исследователь лаб. ангиогенеза Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии». ORCID: 0000-0002-6367-3785

Цоколаева Зоя Ивановна – ст. науч. сотр. лаб. ангиогенеза Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии», НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФНКЦ РР. ORCID: 0000-0003-2441-6062

Зубкова Екатерина Сергеевна – мл. науч. сотр. лаб. ангиогенеза Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии». ORCID: 0000-0002-0512-3670

Парфенова Елена Викторовна – рук. лаб. ангиогенеза, дир. Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии», лаб. постгеномных технологий в медицине фак-та фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова». ORCID: 0000-0002-0969-5780

Контактная информация:

Дергилев Константин Владимирович – вед. науч. сотр. лаб. ангиогенеза Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии». Тел.: +7(916)659-39-40; e-mail: doctorkote@gmail.com; ORCID: 0000-0003-2712-4997

ное кардиальной микросреде *in vivo*, что обеспечивает более сложные межклеточные взаимодействия и межклеточные контакты, служащие для одновременной доставки дополнительных сигналов, включая механические и биохимические стимулы, которые могут влиять на форму клеток, подвижность, пролиферацию и дифференцировку, а также на экспрессию генов [10, 11]. Немаловажным условием правильной сборки сфероидов являются плотность исходной посадки кардиосферообразующих клеток и время культивирования, что позволяет манипулировать размером сфероидов, обеспечивая некоторую стандартизацию при подготовке клеточного препарата. Кардиосферы размером более 150 мкм при внутрикоронарном введении могут вызывать микрососудистую непроходимость, что существенно ограничивает возможности их применения. Увеличение плотности посадки клеток (с 0,25 до $1,5 \times 10^6$ клеток/75 см² флакон) связано с более высокой долей сфероидов размером более 50 мкм, тогда как более длительное время культивирования в основном увеличивает процент очень крупных сфероидов (>150 мкм). Поэтому высокая плотность посева (20×10^3 КОК/см²) и короткая продолжительность культивирования (48 ч) считаются оптимальными для производства кардиосфер [12]. Вторым важным условием формирования сфероидов является состав среды культивирования, которая включает фетальную сыворотку теленка, эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста фибробластов (β FGF), тромбин и комплексную добавку B27, включающую витамины, антиоксиданты, незаменимые жирные кислоты и гормоны (инсулин, прогестерон, трийодтиронин), которые способствуют увеличению числа образовавшихся кардиосфер [13–17]. Следует также отметить, что в настоящий момент разработаны и активно используются методы получения сфероидов и кардиосферообразующих клеток в соответствии с принципами надлежащей производственной практики (GMPs) без применения ксеногенных добавок, например фетальной сыворотки теленка, которая несет риск заражения инфекционными вирусными/прионными агентами и возможной активации иммунного ответа после трансплантации [18, 19].

Регуляция состояния клеток в составе сфероидов

Если учесть структурную организацию сфероидов, то с определенной долей допущения можно предположить, что она моделирует соответствующее микроокружение, которое характерно для «клеточных ниш». В ее состав входят белки внеклеточного матрикса, формирующие каркас-вместилище для низкодифференцированных клеток, мезенхимных стромальных клеток, а также кардиомиоцитарных и васкулогенных клеток-предшественниц. Такая структурная организация обеспечивает взаимодействие этих компонентов между собой и регулирует индивидуальные функции каждой клетки, что характерно для «клеточных ниш» разных тканей, в том числе сердца. Наиболее сходные характеристики со сфероидом отмечаются в эпикардиальных «клеточных нишах», активность которых контролируется с помощью эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) – биологического процесса, который участвует в эмбриогенезе, воспалении, фиброзе, заживлении ран и канцерогенезе [20]. Образование сфероидов сопряжено с изменением функциональных и фенотипических свойств клеток в результате активации ЭМП [21]. В первичных и вторичных кардиосферах экспрессия генов, ассоциированных с ЭМП (*SNA11*, *TGFBR2* и *SNAI2*), значительно выше, чем в клетках, образующих

кардиосферы, но культивируемых в 2D-условиях. Добавление в среду культивирования мастер-регулятора ЭМП трансформирующего фактора роста β (TGF β) ускорило сборку кардиосфер и увеличивало их количество, в то время как ингибирование TGF β -рецептора нарушало сферообразование и приводило к «разборке» уже существующих сфероидов [22]. Вероятно, активация ЭМП может способствовать приобретению клетками промигранционного фенотипа, развитию цитоскелета, который позволяет создать такую силу поверхностного натяжения, которая обеспечивает самую экономичную в энергетическом отношении шаровидную форму и минимизацию объема формирующегося сфероидов. Формирование такой высококомпактной структуры способствует взаимодействию рецепторов на поверхности клеток с сигнальными молекулами, что приводит к изменению свойств и клеточного состава сфероидов. Оказалось, что сигнальный путь Notch, участвующий в регуляции ЭМП и свойств разных типов клеток, регулирует рост сфероидов. Рецепторы Notch 1 и 2-го типов расположены диффузно на поверхности клеток, в то время как лиганды Jagged1 и Delta-like1 экспрессированы клетками, расположенными во внешнем слое сфер, что косвенно указывает на наличие высокоспецифичной организации в составе сферы клеток разных типов [23]. Стимуляция сигнального пути Notch растворимым лигандом Jagged1, а также обработка клеток аденоассоциированными вирусами, кодирующими NICD (эффекторный домен рецептора Notch1) и Jagged1, вызывали значительное увеличение количества, размеров сфероидов и активацию кардиогенных генов. В то время как блокирование активности Notch-сигналинга путем ингибирования процессинга γ -секретазы с помощью DAPT оказывало обратный эффект. Показано, что формирование CD117+ кардиосферообразующих клеток происходит в значительной степени за счет ЭМП [24]. При этом активация сигнального пути Notch сопровождается утратой низкодифференцированного состояния клеток и запуском дифференцировки. Эти данные хорошо согласуются с особенностями регуляции эпикардиальной «клеточной ниши», в которой передача сигналов Notch стимулирует ЭМП в клетках мезотелия [25, 26], что ведет к образованию CD117+ клеток и поддержанию их низкодифференцированного состояния [27]. В регуляции ЭМП, процессов сборки сфероидов и их репаративных свойств участвуют β -адренорецепторы. Показано, что добавление в среду культивирования β -адреноблокаторов увеличивает адгезивные свойства миокардиальных эксплантов, способствует увеличению кардиосферообразующих клеток и повышает эффективность сборки сфероидов [28]. Обработка кардиосферообразующих клеток β -адреноблокаторами *in vitro* способствовала повышению их миграционных свойств и способности к сферообразованию, что обусловлено активацией ЭМП. Более того, после такого воздействия клетки кардиосфер содержали более низкий процент CD90+ мезенхимных клеток, более высокое соотношение коллаген III/коллаген I, более низкий уровень провоспалительных цитокинов, что указывало на высокий антифибротный и терапевтический потенциал популяции кардиосфер. Помимо обеспечения условий для взаимодействия клеток между собой, с компонентами матрикса и секретируемыми факторами в регуляции состояния кардиосфер принимают участие физические и метаболические факторы. Во внешних клеточных слоях сфероидов по направлению к «ядру» создаются градиент факторов и сниженное парциальное давление кислорода, что позволяет создавать уникальную микросреду, необходимую для сохранения свойств клеток.

Такой механизм регуляции указывает на общие черты с механизмами самоподдержания клеточного гомеостаза в «нишах» стволовых клеток разных тканей [18]. В условиях гипоксии происходят стабилизация α -субъединицы фактора, индуцируемого гипоксией, – HIF (hypoxia-induced factor), ее димеризация и последующий транспорт в ядро, где она регулирует широкий спектр генов, участвующих в процессах клеточного поведения. В условиях гипоксии усиливается выживаемость клеток, образующих сфероиды, они вступают в клеточный цикл, что ведет к увеличению числа прогениторных клеток (CD117+, Sca-1+, Abcg2+) и увеличению размеров сфероидов [29]. Учитывая важную роль гипоксии в регуляции TGF β -сигнального пути и ЭМП [30], возможно, именно такой тип трансформации ответствен за формирование малодифференцированных клеток [31]. Поскольку HIF-1 контролирует транскрипцию генов-регуляторов ангиогенеза, при культивировании кардиосфер в условиях низкого содержания кислорода (3% O₂) наблюдается усиление секреции VEGF и HGF, что значительно увеличивает проангиогенную активность этих клеток [32]. Необходимо отметить, что первичные кардиосферы имеют ряд существенных отличий от вторичных (полученных после дополнительного этапа культивирования в 2D-условиях – разборки и повторной сборки кардиосфер) [33, 34]. Первичные кардиосферы характеризуются высоким уровнем секреции ангиогенных факторов VEGF и HGF, а также инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1). В то же время во вторичных кардиосферах секреция HGF и IGF-1 снижается, но повышается содержание низкодифференцированных Oct4+ и CD117+ клеток [35]. Возможной причиной такого изменения свойств сфероидов после их разборки и повторной сборки является изменение активности ЭМП, что ведет к переклещению между образованием мезенхимных CD105+ клеток и CD117+ прогениторных клеток [36]. Оказалось, что экспрессия мезенхимного маркера CD105 (эндоглина), являющегося рецептором цитокинов семейства TGF β , на поверхности клеток кардиосфер может регулировать активность ЭМП путем воздействия на Alk1/Alk5-сигнальные механизмы. Уменьшение количества CD105+ клеток ведет к снижению секреции всех проангиогенных факторов роста (за исключением VEGF) и подавлению проангиогенной активности сфероидов *in vitro* и *in vivo* [36]. Воздействуя на сигнальные пути, в частности на сигнальный путь ERK, можно манипулировать фенотипом кардиосфер. Ингибирование пути ERK за счет ингибирования рецептора тирозинкиназы-1 и TGF β приводило к увеличению экспрессии транскрипционного фактора Oct4 и уменьшению продукции VEGF клетками кардиосфер. И наоборот, при стимуляции пути ERK с помощью EGF, β FGF и VEGF наблюдалось увеличение секреторной активности клеток кардиосфер. Эффекты двух методов обработки подтверждены *in vivo* после трансплантации вторичных кардиосфер на модели инфаркта миокарда [37]. Таким образом, изменяя воздействие на кардиосферы в процессе их культивирования, можно влиять на их регенеративный потенциал, увеличивая либо паракринную активность, либо содержание низкодифференцированных клеток.

Обобщая изложенное, необходимо подчеркнуть, что сформированные из клеток кардиальных эксплантов сфероиды являются весьма динамичными структурами, обеспечивающими межклеточные взаимодействия и индивидуальную регуляцию активности ЭМП, приводящую к изменению фенотипа, поддержанию «стволовости» клеток в их составе и их паракринной активности.

Способы трансплантации кардиосфер и клеток кардиосфер

Использование трансплантации прогениторных клеток сердца в виде клеточных сфероидов – кардиосфер представляет собой альтернативный способ клеточной терапии, позволяющий трансплантировать клетки в составе своего микроокружения, что существенно повышает их выживаемость и, следовательно, эффективность такого вида лечения по сравнению с традиционной трансплантацией суспензии клеток, культивированных в 2D-условиях. На сегодняшний день проведены многочисленные доклинические исследования по трансплантации кардиосфер и кардиосферообразующих клеток как путем интракоронарного, системного и интрамиокардиального введения, так и эпикардиальной трансплантации тканеинженерных конструкций в виде пластов клеток, клеток в составе носителя (матрикса), а также введение клеток в комбинации с факторами роста, способствующими их выживаемости. Существующий опыт внутривенного введения сфероидов в ходе проведения стентирования [38] показал, что, несмотря на значительный размер сфероидов (от 20 до 150 мкм), не отмечалось развития каких-либо осложнений. Причем введение могло быть выполнено с использованием как методики «stop-flow», так и постоянного введения «continuous-flow» в один или несколько коронарных сосудов с сопоставимой эффективностью [12, 39]. Для обеспечения дополнительной безопасности и предотвращения микрососудистой окклюзии разработан протокол интракоронарного введения кардиосфер или клеток кардиосфер в фосфатно-солевом буфере без ионов кальция с добавлением гепарина и нитроглицерина [40]. Альтернативными способами является трансплантация кардиосфер в составе синтетических носителей [41] или сформированных *in vitro* клеточных пластов («cell sheet»), состоящих из клеток кардиосфер и наработанного ими внеклеточного матрикса. Такие клеточные пласты, своеобразные клеточные пластыри, трансплантируются во время моделирования инфаркта у экспериментальных животных прямо на эпикардиальную поверхность сердца на область инфаркта, что приводит к значительной стимуляции ангиогенеза в перинфарктной зоне, уменьшению постинфарктного ремоделирования и повышению выживаемости животных, что обусловлено скорее всего паракринными эффектами клеток кардиосфер, которые длительно сохраняют свою жизнеспособность и функциональную активность при таком способе трансплантации. Выживаемость и функциональная активность клеток кардиосфер может быть дополнительно повышена путем их метаболического преколонирования – культивирования в условиях гипоксии [42]. Показано, что эпикардиальная трансплантация пластов из клеток кардиосфер приводит к более значительным улучшениям функции левого желудочка (ЛЖ), повышению уровня VEGF и уменьшению постинфарктного фиброза по сравнению с трансплантацией пластов из кардиосфер, культивированных в нормоксических условиях.

Еще одним вариантом доставки клеток кардиосфер является их введение в полость перикарда, что рассматривается в качестве перспективного способа локального воздействия на эпикард при диффузных поражениях миокарда [43]. Такой способ доставки обеспечивает равномерное распределение кардиосфер или их клеток по поверхности сердца, длительное сохранение их жизнеспособности и паракринной активности.

Помимо самих кардиосфер большие перспективы в плане терапии заболеваний сердца связывают с использова-

нием продуктов их жизнедеятельности – так называемой клеточной терапией без клеток (cell therapy without cells). В основе ее лежит использование продуктов секреции кардиосфер и высвобождаемых ими внеклеточных нановезикулов – экзосом, которые в значительной степени отвечают за их терапевтическую эффективность [33]. Секретом кардиосфер богат многочисленными факторами роста и цитокинами (VEGF, β FGF, PDGFBB, HGF, IGF-1, SDF-1 и др.), играющими важную роль в регенеративных процессах. Использование продуктов секреции клеток кардиосфер при доказанных регенеративных эффектах не сопровождается развитием каких-либо побочных реакций, что позволяет применять их для лечения не только поражений миокарда [44], но и других патологий, включая мышечную дистрофию [45], ишемический инсульт [46], поражения кожи [47, 48] и почек [49]. Особый интерес вызывает использование экзосом, высвобождаемых клетками кардиосфер. Введение этих экзосом в миокард мышей с инфарктом эффективно восстанавливало функцию сердца, увеличивало долю жизнеспособного миокарда и уменьшало область рубца, стимулировало репаративный ангиогенез, подавляло воспаление и увеличивало пролиферацию кардиомиоцитов [50]. Это действие было специфично для экзосом клеток кардиосфер, так как экзосомы, полученные из сердечных фибробластов, не обладали подобными эффектами, которые обусловлены уникальным составом микроРНК в экзосомах кардиосфер, в частности высоким содержанием микроРНК 146a, регулирующей пролиферацию кардиомиоцитов, ангиогенез и воспаление. Следует подчеркнуть, что состав микроРНК экзосом кардиосфер значительно отличался от состава микроРНК экзосом сердечных фибробластов именно наличием тех микроРНК, которые задействованы в регуляции регенеративных процессов. Все это делает продукты секреции и внеклеточные везикулы кардиосфер крайне привлекательным новым «инструментом» для терапии заболеваний сердца. С учетом данных о том, что аллогенные кардиосферы обладают регенеративными свойствами и не вызывают тяжелых иммунных реакций, а также того, что кардиосферы могут быть получены и из постмортальных образцов ткани миокарда [51, 52], открываются перспективы создания аллогенных биомедицинских клеточных и бесклеточных продуктов на основе кардиосфер «on shelf».

Доклинические и клинические испытания клеточной терапии на основе кардиосфер

За последние 15 лет исследования регенеративных свойств кардиосфер и их клеток прошли долгий, сложный путь, включающий работы *in vitro* по оптимизации методов культивирования клеток, доклинические исследования на мелких животных (для доказательства концепции) и исследования на крупных животных (для подтверждения концепции, оптимизации дозировки, состава и способа доставки), прежде чем перейти к полноценному клиническому исследованию на пациентах с постинфарктной сердечной недостаточностью. Но перед началом рассмотрения эффектов терапии клетками кардиосфер необходимо остановиться на понятии «ремоделирование», которое сопутствует инфаркту миокарда. Ремоделирование ЛЖ рассматривается как универсальная компенсаторно-приспособительная реакция, включающая изменение компонентов внеклеточного матрикса, объема и функций кардиомиоцитов, архитектоники и геометрии полости ЛЖ, которые находятся под контролем

нейрогуморальных, механических и генетических факторов [53]. Патологическое ремоделирование является неотъемлемым компонентом развития постинфарктной ХСН, мишенями этого процесса служат компоненты внеклеточного матрикса, а также кардиомиоциты и клетки стромы. Выраженное нарушение процессов синтеза и деградации белков внеклеточного матрикса приводит к формированию «патологического микроокружения», которое нарушает естественные процессы репарации и ведет к нарушению структуры и изменению функции ЛЖ. Кроме того, скорость формирования сосудистой сети после инфаркта недостаточна для обеспечения адекватной перфузии миокарда, необходимой для удовлетворения потребностей гипертрофированной сохраненной стенки миокарда, что приводит к дальнейшей потере кардиомиоцитов и образованию фиброзной ткани [54]. Поэтому проангиогенные, антифибротические и противовоспалительные эффекты клеточной терапии выходят на первый план для замедления патологического ремоделирования, что необходимо для обеспечения эффективного лечения постинфарктной сердечной недостаточности. В доклинических исследованиях показано, что трансплантация кардиосфер приводит к уменьшению площади рубцовой ткани и увеличению зоны жизнеспособного миокарда [12]. Впечатляющие результаты по подавлению постинфарктного ремоделирования получены на моделях ХСН как у мелких (грызунов), так и у крупных животных (мини-свиней) [55, 56], что приводило к предотвращению прогрессирующей потери насосной функции сердца. Кроме того, наблюдались улучшение региональной сократимости стенки ЛЖ и уменьшение фиброза как в инфарктной области, так и в неповрежденных участках миокарда. Все это указывает на положительное влияние на неблагоприятное глобальное ремоделирование, а не только на уменьшение площади рубца в области инфаркта. Эти «глобальные» эффекты на ремоделирование ЛЖ и фиброз могут быть связаны с более высоким уровнем интеграции и выживаемости трансплантированных клеток кардиосфер. Длительное обеспечение жизнеспособности кардиосфер обусловлено сбалансированной комбинацией белков внеклеточного матрикса и клеток, которые упакованы в составе сфероидов в достаточно высокой плотности, что позволяет реализоваться их регенеративным свойствам. Кроме того, клетки кардиосфер способны продуцировать ферменты-регуляторы гомеостаза компонентов матрикса – матриксные металлопротеиназы и растворимую форму эндоглина, который ингибирует TGF β 1-индуцированный фиброз [32–34, 38, 57–59]. Доклинические исследования также демонстрируют мягкий, кратковременный иммунный ответ на аллогенные кардиосферы без какого-либо явного отторжения или реакции клеток памяти [56, 60]. Это может быть объяснено тем, что клетки кардиосфер несут на своей поверхности молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) I, но не экспрессируют МНС II и костимулирующие молекулы [51, 61]. Экспрессия МНС I важна, потому что данный антиген защищает клетки от уничтожения естественными киллерами (NK-клетками), в то время как отсутствие МНС II позволяет клеткам кардиосфер избежать прямого распознавания Т-хелперами. МНС I может активировать эффекторные Т-клетки, но при отсутствии костимулирующих молекул вторичный сигнал не будет задействован [62]. Кроме того, клетки кардиосфер экспрессируют на своей мембране лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1), что определяет их иммуносупрессивные свойства [63]. При введении крысам аллогенных клеток кардиосфер наблюдалось снижение уровня провоспалительных и про-

фибротических цитокинов (MCP-1, IL-6, TNF α , TIMP-1), а также количества CD68+ макрофагов и CD45+ лейкоцитов, которые связаны с прогрессированием ХСН [64]. Секрция кардиосферами простагландина E₂, действующего через EP₄-рецептор на лимфоцитах, также способствовала подавлению развития иммунного ответа на аллогенные клетки [65]. Более того, клетки кардиосфер и высвобождаемые ими факторы стимулируют макрофагопосредованную кардиопротекцию путем специфического переключения фенотипа макрофагов с провоспалительного M₁-фенотипа на репаративный M₂-фенотип [66, 67]. Такие выраженные иммуномодулирующие свойства позволили использовать кардиосферы для лечения экспериментального аутоиммунного миокардита. Интракоронарное введение клеток кардиосфер уменьшало воспаление миокарда, инфильтрацию Т-клеток и фиброз, сохраняя сердечную функцию и структуру миокарда у крыс с моделью аутоиммунного миокардита [68]. Несмотря на способность формировать соответствующее микроокружение, противодействовать факторам воспаления и оксидативного стресса, обеспечивая выживаемость клеток кардиосфер после трансплантации, только крайне небольшая их часть способна вступать в дифференцировку с образованием новых кардиомиоцитов и клеток сосудов [33, 51]. Таким образом, терапевтический эффект кардиосфер обусловлен в значительной степени влиянием продуктов их секрции и высвобождаемыми ими везикулами, нежели их прямой дифференцировкой в направлении клеток миокарда [32, 33]. Именно уникальная паракринная функция кардиосфер является основополагающей для запуска эндогенной «программы» регенерации путем стимулирования ангиогенеза, подавления воспаления, аккумуляции эндогенных кардиальных клеток-предшественниц и обеспечения выживаемости и пролиферации резидентных кардиомиоцитов в перинфарктной области [33, 51, 69, 70]. В ряде работ убедительно доказано, что секрция кардиосферами таких факторов, как SDF-1, IGF1 и HGF, стимулирует мобилизацию циркулирующих и резидентных прогениторных клеток в поврежденном миокарде [33, 71], что в совокупности с проангиогенным действием VEGF [32] ведет к формированию новой сосудистой сети [58]. Помимо этого HGF и IGF1 активируют в кардиомиоцитах сигнальный путь Akt, подавляющий их апоптоз и обеспечивающий выживаемость [32, 33], поддержание энергетического баланса митохондрий [72] и пролиферацию кардиомиоцитов [58, 73]. Все это в совокупности способствует сохранению жизнеспособного миокарда после ишемического повреждения. Немаловажную роль играет также контактное взаимодействие кардиомиоцитов с клетками кардиосфер и наработанным ими матриксом, что может приводить к запуску их пролиферации через MEK- и PI3K-сигнальные механизмы [74]. Кроме того, как уже упомянуто, кардиосферы высвобождают экзосомы, обогащенные различными микроРНК, обеспечивающими активацию репаративной программы сердца [2, 50, 75]. Такими микроРНК являются: miR-146a и miR-181b с кардиопротективным действием, miR-210 с антиапоптотическим эффектом, miR-132 с проангиогенным эффектом, miR-497 и miR-590, участвующие в регуляции дифференцировки клеток [50, 75, 76].

Таким образом, экспериментальные работы убедительно показали (рис. 2, см. на цветной вклейке), что трансплантация кардиосфер и их клеток у животных с моделированием сердечной патологии предотвращает патологическое ремоделирование сердца, увеличивает глобальную и регионарную сократимость ЛЖ за счет формирования прорегенеративного микроокружения путем ре-

гуляции ремоделирования внеклеточного матрикса, модуляции воспалительного ответа, стимуляции выживаемости и функциональной активности сохраненных клеток миокарда, активации резидентных прогениторных клеток и механизмов репаративного ангиогенеза.

На сегодняшний день имеются результаты нескольких клинических исследований, в которых использовалась трансплантация клеток кардиосфер. Первой работой был проект CADUCEUS – CArdiosphere-Derived aUtologous Stem Cells to Reverse ventricular dysfunction (NCT00893360) [77]. В это проспективное рандомизированное исследование по оценке безопасности, выполнимости и эффективности включались пациенты на 2–4-й неделе после инфаркта миокарда с фракцией выброса 25–45%. Аутологичные клетки кардиосфер получали из эндомикардиальной биопсии и после необходимого культивирования вводили в инфаркт-связанную артерию через 1,5–3 мес после инфаркта с рандомизацией 2:1 (стандартное лечение + клетки кардиосфер или стандартное лечение). В исследование включены 25 больных (17 – клетки кардиосфер, 8 – контроль). Никаких осложнений в течение 24 ч после инфузии не отмечено. Через 6 мес ни один пациент не умер, не наблюдалось развития опухолей сердца. Достоверных различий в частоте побочных эффектов в опытной и контрольной группах не отмечено. У больных, получивших инфузию клеток кардиосфер, наблюдали достоверное уменьшение массы рубца и увеличение доли жизнеспособного миокарда, возрастание региональной сократимости и регионального утолщения стенки в систолу по сравнению с контрольной группой. Однако конечный диастолический и систолический объемы и фракции выброса ЛЖ (ФВЛЖ) не различались в опытной и контрольной группах. Таким образом, показано, что интракоронарная инфузия аутологичных клеток кардиосфер после инфаркта миокарда безопасна и выполнима, способствует увеличению доли жизнеспособного миокарда, что косвенно указывает на терапевтическую регенерацию. Через 1 год в этих группах больных сохранялись те же различия: в группе с введением клеток кардиосфер были меньше размер рубца и больше доля жизнеспособного миокарда (магнитно-резонансная томография – МРТ), улучшалась региональная функция в области инфаркта [70], но общая ФВЛЖ достоверно не различалась с контрольной группой.

Безопасность и предварительная оценка эффективности трансплантации аутологичных клеток кардиосфер также оценивались в исследовании TICAP (Transcoronary Infusion of Cardiac Progenitor Cells in Patients with Single Ventricle Physiology; NCT01273857) [78] у педиатрических пациентов с синдромом гипоплазии левых отделов сердца. Клетки вводили в три основные коронарные артерии 10 пациентам в возрасте около 2 лет после паллиативной хирургии. Контроль – 8 аналогичных пациентов без введения клеток. Никаких осложнений процедуры не отмечено. Через 18 мес у пациентов с клеточной терапией зарегистрированы улучшения функции ЛЖ (МРТ), уменьшение симптомов сердечной недостаточности и увеличение массы тела по сравнению с контрольной группой.

Однако, несмотря на обнадеживающие результаты первых испытаний аутологичной клеточной терапии клетками кардиосфер, ее применение сопряжено с техническими и логистическими трудностями в получении клеточного материала, что делает актуальным разработку аллогенных клеточных продуктов на основе кардиосфер. Показано, что клетки кардиосфер обладают благоприятным иммунологическим антигенным профилем и гипоиммуногенны *in vitro*.

Преклинические исследования на иммунологически не совместимых животных продемонстрировали, что трансплантация аллогенных клеток кардиосфер без иммуносупрессии безопасна и эффективно стимулирует эндогенные регенеративные механизмы, так же как и аутологичная трансплантация. Потенциально клеточная терапия на основе аллогенных клеток кардиосфер имеет большие перспективы более широкого клинического применения, так как дает возможность получения высокостандартизированного аллогенного биомедицинского клеточного продукта «off-the-shelf» (прямо с полки). Два последующих клинических исследования тестировали безопасность и эффективность трансплантации аллогенных клеток кардиосфер – ALLSTAR и DYNAMIC.

ALLSTAR (ALLogenic Heart STem Cells to Achieve Myocardial Regeneration; NCT01458405) [79] – многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование 1/2 фазы по оценке безопасности и эффективности в уменьшении размера инфаркта при внутривенном введении аллогенных клеток кардиосфер пациентам с инфарктом миокарда и дисфункцией ЛЖ ишемического генеза. Дизайн исследования предполагал последовательный переход от I к II фазе. Сначала в I фазу, которая представляла собой открытое нерандомизированное исследование безопасности с возрастающими дозами клеточного препарата, включены 14 пациентов. Затем во II фазу, которая уже была двойным слепым плацебо-контролируемым исследованием, включались 120 пациентов (клетки/плацебо 2:1). Первичная конечная точка по безопасности определялась через 1 мес, по эффективности (II фаза) – через 12 мес, как изменение размера инфаркта (МРТ). Несмотря на то, что предварительная оценка показала уменьшение размера рубца и улучшение функции сердца после использования клеточного препарата, дальнейший набор пациентов прекращен без обоснования причин.

В одноцентровом открытом исследовании DYNAMIC (Dilated cardiomyopathy iNtervention With Allogeneic Myocardially-regenerative Cells; NCT02293603) [80] оценивалась безопасность введения аллогенных клеток кардиосфер в несколько коронарных артерий у пациентов с сердечной недостаточностью и низкой фракцией выброса (HFrEF). В него включены 14 больных с ФВЛЖ $\leq 35\%$ и тяжелой сердечной недостаточностью (NYHA III–IV), несмотря на проводимую максимальную медикаментозную терапию. Клетки вводили в три основные коронарные артерии в дозах 37,5–75 млн. Через 72 ч после введения не выявлено никаких побочных эффектов. Два пациента умерли через 9 и 12 мес от прогрессирующей сердечной недостаточности. У остальных пациентов (12 человек с исходной фракцией выброса 22,9%) через 1 год отмечалось достоверное увеличение фракции выброса до 26,8% наряду с уменьшением систолического объема, снижением класса NYHA и улучшением качества жизни.

В многоцентровом открытом рандомизированном контролируемом исследовании HOPE-Duchenne – фаза I/II (NCT02485938) [81] аллогенные клетки кардиосфер трансплантировали в коронарные артерии больных с миодистрофией Дюшена и выраженным фиброзом миокарда. Включены 25 пациентов (13 – клеточная терапия и 12 – контроль). Частота развития побочных эффектов не различалась в исследуемых группах. Через 12 мес в группе клеточной терапии отмечены значимое уменьшение доли фиброза и увеличение систолического утолщения нижней стенки ЛЖ. Более того, у пациентов значимо улучшалась функция верхних конечностей.

Таким образом, имеющиеся данные по клинической оценке внутривенной трансплантации клеток кардиосфер (как аллогенных, так и аутологичных) у больных с инфарктом миокарда и сердечной недостаточностью в результате ишемической кардиомиопатии, врожденного порока сердца, фиброза миокарда при миодистрофии Дюшена показали хороший профиль безопасности и предварительные данные по эффективности в уменьшении размера инфаркта, увеличении доли жизнеспособного миокарда и улучшении региональной функции, снижении класса сердечной недостаточности. В то же время существенного улучшения ФВЛЖ по сравнению с контролем не обнаружено. Здесь необходимо отметить, что ФВЛЖ зависит от многих параметров, включающих нагрузку объемом, геометрию желудочков, характер электрической активации, и поэтому, возможно, не является наиболее подходящим сурrogатным маркером для оценки эффективности клеточной терапии [82]. Необходимы новые более крупные исследования и более длительные наблюдения для оценки влияния этого метода лечения на смертность и сердечно-сосудистые осложнения.

Заключение

В настоящее время проведено множество исследований с разными типами стволовых/прогениторных клеток, которые, несмотря на безопасность такой терапии, продемонстрировали весьма скромные клинические результаты. Это позволило переосмыслить концепцию клеточной терапии и привело к пониманию того, что успешное восстановление тканей путем трансплантации клеток требует скоординированной активации сложной цепи взаимосвязанных клеточных и молекулярных событий. Оказалось, что для запуска процессов восстановления необходимо восполнить в составе миокарда естественное клеточное микроокружение, которое позволит стимулировать входение кардиомиоцитов в клеточный цикл, активировать воспроизведение сосудистых клеток и процессы неогенеза, а также мобилизовать клетки-предшественницы. И уже сформированное микроокружение путем специализированных биологических сигналов будет координировать процессы ремоделирования и управлять функциями клеток. В связи с этим наличие 3D-моделей «сердечной ниши» *ex vivo* представляет собой уникальный инструмент не только для изучения биологии клеток сердца и понимания патогенеза заболеваний, но и для биотехнологического скрининга и в качестве инструмента для клеточной терапии. Кардиосферы являются уникальной системой, которая без использования внешних воздействий и синтетических компонентов способна выстроить самоорганизованную микроткань, которая с определенной долей допущения моделирует естественные «клеточные ниши» миокарда. В ней прекрасно реализованы возможность гипоксической и метаболической регуляции, аутокринная/паракринная активность, которая в совокупности с возможностью трансформации путем ЭМП позволяет регулировать клеточный состав и свойства сфероидов. Не следует забывать, что такая система сохраняет способность воспринимать сигналы внешнего воздействия, обеспечивая своевременный ответ и перестройку, что позволяет создавать как персонализированный инструмент для индивидуального пациента и стадии заболевания, так и сложные микротканевые платформы для диагностики и скрининга лекарств. В настоящее время получены данные о возможности создания кардиосфер на основе трансформации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [83], что позво-

лит проводить обогащение состава сфероидов определенными типами клеток, например зрелыми или генетически отредактированными с помощью технологии CRISPR/Cas9 кардиомиоцитами, что позволит воспроизвести полноценную микросреду «кардиальных ниш». Учитывая возможности стандартизации алгоритма получения кардиосфер, перед учеными открываются значительные перспективы для формирования сфероидов строго определенного состава, размеров, с сохранением специфических характеристик, что позволит перейти к этапу тканевой инженерии с целью проведения тканезаместительной терапии. Несмотря на 15-летнюю историю изучения кардиосфер и многообещающие результаты клинических исследований, перед исследователями стоит ряд нерешенных вопросов, связанных с механиз-

мами их самоорганизации, регуляции их свойств и объяснением механизмов действия. В связи с этим только решение вышеуказанных задач, а также взаимовыгодное сотрудничество фундаментальных исследователей и клиницистов позволят убедиться в безопасности и откроет возможность перехода на следующий уровень – персонафицированной тканевой инженерии сердечной ткани с использованием клеток кардиосфер.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта
РФФИ 18-015-00430.*

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Ashur C, Frishman WH. Cardiosphere-Derived Cells and Ischemic Heart Failure. *Cardiol Rev.* 2018;26(1):8-21. doi: 10.1097/CRD.0000000000000173
- Barile L, Gherghiceanu M, Popescu LM, et al. Ultrastructural evidence of exosome secretion by progenitor cells in adult mouse myocardium and adult human cardiospheres. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:354605. doi: 10.1155/2012/354605
- Bernardo BC, Ooi JY, Lin RC, McMullen JR. miRNA therapeutics: a new class of drugs with potential therapeutic applications in the heart. *Future Med Chem.* 2015;7(13):1771-92. doi: 10.4155/fmc.15.107
- Khodayari S, Khodayari H, Amiri AZ, et al. Inflammatory Microenvironment of Acute Myocardial Infarction Prevents Regeneration of Heart with Stem Cells Therapy. *Cell Physiol Biochem.* 2019;53(5):887-909. doi: 10.33594/000000180
- Menasché P. Cell therapy trials for heart regeneration – lessons learned and future directions. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(11):659-71. doi: 10.1038/s41569-018-0013-0
- Zuppinge C. 3D culture for cardiac cells. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(7 Pt B):1873-81. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.11.036
- Afzal MR, Samanta A, Shah ZI, et al. Adult Bone Marrow Cell Therapy for Ischemic Heart Disease: Evidence and Insights From Randomized Controlled Trials. *Circ Res.* 2015;117(6):558-75. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.304792
- Gil-Perotín S, Duran-Moreno M, Cebrián-Silla A, et al. Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay. *Anat Rec (Hoboken).* 2013;296(9):1435-52. doi: 10.1002/ar.22746
- Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(3):211-24. doi: 10.1038/nrm1858
- Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(10):839-45. doi: 10.1038/nrm2236
- Pedersen JA, Swartz MA. Mechanobiology in the third dimension. *Ann Biomed Eng.* 2005;33(11):1469-90. doi: 10.1007/s10439-005-8159-4
- Gallet R, Tselioui E, Dawkins J, et al. Intracoronary delivery of self-assembling heart-derived microtissues (cardiospheres) for prevention of adverse remodeling in a pig model of convalescent myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Interv.* 2015;8(5):e002391. doi: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.115.002391
- Afzal J, Chan A, Karakas MF, et al. Cardiosphere-Derived Cells Demonstrate Metabolic Flexibility That Is Influenced by Adhesion Status. *JACC Basic Transl Sci.* 2017;2(5):543-60. doi: 10.1016/j.jacpts.2017.03.016
- Aghila Rani KG, Kartha CC. Effects of epidermal growth factor on proliferation and migration of cardiosphere-derived cells expanded from adult human heart. *Growth Factors.* 2010;28(3):157-65. doi: 10.3109/08977190903512628
- Chimenti I, Gaetani R, Forte E, et al. Serum and supplement optimization for EU GMP-compliance in cardiospheres cell culture. *J Cell Mol Med.* 2014;18(4):624-34. doi: 10.1111/jcmm.12210
- Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res.* 2004;95(9):911-21. doi: 10.1161/01.RES.0000147315.71699.51
- Fabrizi C, Angelini F, Chimenti I, et al. Thrombin and thrombin-derived peptides promote proliferation of cardiac progenitor cells in the form of cardiospheres without affecting their differentiation potential. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2011;25(2 Suppl.):43-51.
- Chimenti I, Massai D, Morbiducci U, et al. Stem Cell Spheroids and Ex Vivo Niche Modeling: Rationalization and Scaling-Up. *J Cardiovasc Transl Res.* 2017;10(2):150-66. doi: 10.1007/s12265-017-9741-5
- Jochems CE, van der Valk JB, Stafleu FR, Baumans V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern Lab Anim.* 2002;30(2):219-27. doi: 10.1177/026119290203000208
- Chen T, You Y, Jiang H, Wang ZZ. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. *J Cell Physiol.* 2017;232(12):3261-72. doi: 10.1002/jcp.25797
- Forte E, Chimenti I, Rosa P, et al. EMT/MET at the Crossroad of Stemness, Regeneration and Oncogenesis: The Ying-Yang Equilibrium Recapitulated in Cell Spheroids. *Cancers (Basel).* 2017;9(8):98. doi: 10.3390/cancers9080098
- Forte E, Miraldi F, Chimenti I, et al. TGFβ-dependent epithelial-to-mesenchymal transition is required to generate cardiospheres from human adult heart biopsies. *Stem Cells Dev.* 2012;21(17):3081-90. doi: 10.1089/scd.2012.0277
- Secco I, Barile L, Torrini C, et al. Notch pathway activation enhances cardiosphere in vitro expansion. *J Cell Mol Med.* 2018;22(11):5583-95. doi: 10.1111/jcmm.13832
- Zakharova L, Nural-Guvener H, Gaballa MA. Cardiac explant-derived cells are regulated by Notch-modulated mesenchymal transition. *PLoS One.* 2012;7(5):e37800. doi: 10.1371/journal.pone.0037800
- Nemir M, Pedrazzini T. Functional role of Notch signaling in the developing and postnatal heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45(4):495-504. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.02.273
- Grieskamp T, Rudat C, Lüdtker TH, et al. Notch signaling regulates smooth muscle differentiation of epicardium-derived cells. *Circ Res.* 2011;108(7):813-23. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.228809
- Urbaneck K, Torella D, Sheikh F, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(24):8692-7. doi: 10.1073/pnas.0500169102
- Chimenti I, Pagano F, Cavarretta E, et al. B-blockers treatment of cardiac surgery patients enhances isolation and improves phenotype of cardiosphere-derived cells. *Sci Rep.* 2016;6:36774. doi: 10.1038/srep36774
- Amirasouli MM, Shamsara M. Comparing the in vivo and in vitro effects of hypoxia (3% O₂) on directly derived cells from murine cardiac explants versus murine cardiosphere derived cells. *J Stem Cells Regen Med.* 2017;13(2):35-44.
- Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal.* 2014;7(344):re8. doi: 10.1126/scisignal.2005189

31. Tan SC, Gomes RS, Yeoh KK, et al. Preconditioning of Cardiosphere-Derived Cells With Hypoxia or Prolyl-4-Hydroxylase Inhibitors Increases Stemness and Decreases Reliance on Oxidative Metabolism. *Cell Transplant*. 2016;25(1):35-53. doi: 10.3727/096368915X687697
32. Hosoyama T, Samura M, Kudo T, et al. Cardiosphere-derived cell sheet primed with hypoxia improves left ventricular function of chronically infarcted heart. *Am J Transl Res*. 2015;7(12):2738-51.
33. Chimenti I, Smith RR, Li TS, et al. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res*. 2010;106(5):971-80. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.210682
34. Li TS, Cheng K, Lee ST, et al. Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair. *Stem Cells*. 2010;28(11):2088-98. doi: 10.1002/stem.532
35. Cho HJ, Lee HJ, Youn SW, et al. Secondary sphere formation enhances the functionality of cardiac progenitor cells. *Mol Ther*. 2012;20(9):1750-66. doi: 10.1038/mt.2012.109
36. Redgrave RE, Tual-Chalot S, Davison BJ, et al. Cardiosphere-Derived Cells Require Endoglin for Paracrine-Mediated Angiogenesis. *Stem Cell Reports*. 2017;8(5):1287-98. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.015
37. Lee HJ, Cho HJ, Kwon YW, et al. Phenotypic modulation of human cardiospheres between stemness and paracrine activity, and implications for combined transplantation in cardiovascular regeneration. *Biomaterials*. 2013;34(38):9819-29. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.013
38. Lee ST, White AJ, Matsushita S, et al. Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(4):455-65. doi: 10.1016/j.jacc.2010.07.049
39. Tseliou E, Kanazawa H, Dawkins J, et al. Widespread Myocardial Delivery of Heart-Derived Stem Cells by Nonocclusive Triple-Vessel Intracoronary Infusion in Porcine Ischemic Cardiomyopathy: Superior Attenuation of Adverse Remodeling Documented by Magnetic Resonance Imaging and Histology. *PLoS One*. 2016;11(1):e0144523. doi: 10.1371/journal.pone.0144523
40. Johnston PV, Sasano T, Mills K, et al. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2009;120(12):1075-83. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.816058
41. Cheng K, Blusztajn A, Shen D, et al. Functional performance of human cardiosphere-derived cells delivered in an in situ polymerizable hyaluronan-gelatin hydrogel. *Biomaterials*. 2012;33(21):5317-24. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.04.006
42. Tanaka Y, Hosoyama T, Mikamo A, et al. Hypoxic preconditioning of human cardiosphere-derived cell sheets enhances cellular functions via activation of the PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α pathway. *Am J Transl Res*. 2017;9(2):664-73.
43. Blázquez R, Sánchez-Margallo FM, Crisóstomo V, et al. Intrapericardial Delivery of Cardiosphere-Derived Cells: An Immunological Study in a Clinically Relevant Large Animal Model. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149001. doi: 10.1371/journal.pone.0149001
44. Gallet R, Dawkins J, Valle J, et al. Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodeling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2017;38(3):201-11. doi: 10.1093/eurheartj/ehw240
45. Rogers RG, Fournier M, Sanchez L, et al. Disease-modifying bioactivity of intravenous cardiosphere-derived cells and exosomes in mdx mice. *JCI Insight*. 2019;4(7):e125754. doi: 10.1172/jci.insight.125754
46. Lapchak PA, Boitano PD, de Couto G, Marbán E. Intravenous xenogeneic human cardiosphere-derived cell extracellular vesicles (exosomes) improves behavioral function in small-clot embolized rabbits. *Experimental Neurology*. 2018;307:109-17. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.06.007
47. Tseliou E, Fouad J, Reich H, et al. Fibroblasts Rendered Antifibrotic, Antiapoptotic, and Angiogenic by Priming With Cardiosphere-Derived Extracellular Membrane Vesicles. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(6):599-611. doi: 10.1016/j.jacc.2015.05.068
48. Grigorian-Shamagian L, Liu W, Fereydooni S, et al. Cardiac and systemic rejuvenation after cardiosphere-derived cell therapy in senescent rats. *Eur Heart J*. 2017;38(39):2957-67. doi: 10.1093/eurheartj/ehx454
49. Cambier L, Giani JF, Liu W, et al. Angiotensin II-Induced End-Organ Damage in Mice Is Attenuated by Human Exosomes and by an Exosomal Y RNA Fragment. *Hypertension*. 2018;72(2):370-80. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11239
50. Ibrahim AG, Cheng K, Marbán E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Reports*. 2014;2(5):606-19. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.04.006
51. Malliaras K, Li TS, Luthringer D, et al. Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells. *Circulation*. 2012;125(1):10-2. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.042598
52. Hodgkiss-Geere HM, Argyle DJ, Corcoran BM, et al. Characterisation and cardiac directed differentiation of canine adult cardiac stem cells. *Vet J*. 2012;191(2):176-82. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.12.033
53. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling – concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(3):569-82. doi: 10.1016/s0735-1097(99)00630-0
54. Wu QQ, Xiao Y, Yuan Y, et al. Mechanisms contributing to cardiac remodeling. *Clinical Science*. 2017;131(18):2319-45. doi: 10.1042/cs20171167
55. Zhang J, Wu Z, Fan Z, et al. Pericardial application as a new route for implanting stem-cell cardiospheres to treat myocardial infarction. *J Physiol*. 2018;596(11):2037-54. doi: 10.1113/JP275548
56. Yee K, Malliaras K, Kanazawa H, et al. Allogeneic cardiospheres delivered via percutaneous transcatheter injection increase viable myocardium, decrease scar size, and attenuate cardiac dilatation in porcine ischemic cardiomyopathy. *PLoS One*. 2014;9(12):e113805. doi: 10.1371/journal.pone.0113805
57. Tseliou E, Reich H, de Couto G, et al. Cardiospheres reverse adverse remodeling in chronic rat myocardial infarction: roles of soluble endoglin and Tgf- β signaling. *Basic Res Cardiol*. 2014;109(6):443. doi: 10.1007/s00395-014-0443-8
58. Tseliou E, de Couto G, Terrovitis J, et al. Angiogenesis, cardiomyocyte proliferation and anti-fibrotic effects underlie structural preservation post-infarction by intramyocardially-injected cardiospheres. *PLoS One*. 2014;9(2):e88590. doi: 10.1371/journal.pone.0088590
59. Davis DR, Zhang Y, Smith RR, et al. Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue. *PLoS One*. 2009;4(9):e7195. doi: 10.1371/journal.pone.0007195
60. Kanazawa H, Tseliou E, Dawkins JF, et al. Durable Benefits of Cellular Postconditioning: Long-Term Effects of Allogeneic Cardiosphere-Derived Cells Infused After Reperfusion in Pigs with Acute Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(2):e002796. doi: 10.1161/JAHA.115.002796
61. Tseliou E, Pollan S, Malliaras K, et al. Allogeneic cardiospheres safely boost cardiac function and attenuate adverse remodeling after myocardial infarction in immunologically mismatched rat strains. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(10):1108-19. doi: 10.1016/j.jacc.2012.10.052
62. Wood KJ, Issa F, Hester J. Understanding Stem Cell Immunogenicity in Therapeutic Applications. *Trends Immunol*. 2016;37(1):5-16. doi: 10.1016/j.it.2015.11.005
63. Lauden L, Boukouaci W, Borlado LR, et al. Allogenicity of human cardiac stem/progenitor cells orchestrated by programmed death ligand 1. *Circ Res*. 2013;112(3):451-64. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.276501
64. Gallet R, de Couto G, Simsolo E, et al. Cardiosphere-derived cells reverse heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) in rats by decreasing fibrosis and inflammation. *JACC Basic Transl Sci*. 2016;1(1-2):14-28. doi: 10.1016/j.jaccbts.2016.01.003
65. Dutton LC, Dudhia J, Catchpole B, et al. Cardiosphere-derived cells suppress allogeneic lymphocytes by production of PGE2 acting via the EP4 receptor. *Sci Rep*. 2018;8(1):13351. doi: 10.1038/s41598-018-31569-1
66. de Couto G, Liu W, Tseliou E, et al. Macrophages mediate cardioprotective cellular postconditioning in acute myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2015;125(8):3147-62. doi: 10.1172/JCI81321
67. Hasan AS, Luo L, Yan C, et al. Cardiosphere-Derived Cells Facilitate Heart Repair by Modulating M1/M2 Macrophage Polarization and Neutrophil Recruitment. *PLoS One*. 2016;11(10):e0165255. doi: 10.1371/journal.pone.0165255

68. Nana-Leventaki E, Nana M, Poulianitis N, et al. Cardiosphere-Derived Cells Attenuate Inflammation, Preserve Systolic Function, and Prevent Adverse Remodeling in Rat Hearts With Experimental Autoimmune Myocarditis. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2019;24(1):70-7. doi: 10.1177/1074248418784287
69. Malliaras K, Terrovitis J. Cardiomyocyte proliferation vs progenitor cells in myocardial regeneration: The debate continues. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2013;2013(3):303-15. doi: 10.5339/gcsp.2013.37
70. Malliaras K, Makkar RR, Smith RR, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CArdiosphere-Derived aUtologous stem CElls to reverse ventricUlar dySfunction). *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(2):110-22. doi: 10.1016/j.jacc.2013.08.724
71. Maguire G, Friedman P. The Systems Biology of Stem Cell Released Molecules – Based Therapeutics. *ISRN Stem Cells.* 2013;1-12. doi: 10.1155/2013/784541
72. Marunouchi T, Yano E, Tanonaka K. Effects of cardiosphere-derived cell transplantation on cardiac mitochondrial oxygen consumption after myocardial infarction in rats. *Biomed Pharmacother.* 2018;108:883-92. doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.117
73. Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK, et al. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation.* 2010;121(2):293-305. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.871905
74. Xie Y, Ibrahim A, Cheng K, et al. Importance of cell-cell contact in the therapeutic benefits of cardiosphere-derived cells. *Stem Cells.* 2014;32(9):2397-406. doi: 10.1002/stem.1736
75. Barile L, Lionetti V, Cervio E, et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2014;103(4):530-41. doi: 10.1093/cvr/cvu167
76. Jafarzadeh M, Mohammad Soltani B, Ekhteraei Tousi S, Behmanesh M. Hsa-miR-497 as a new regulator in TGFβ signaling pathway and cardiac differentiation process. *Gene.* 2018;675:150-6. doi: 10.1016/j.gene.2018.06.098
77. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet.* 2012;379(9819):895-904. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60195-0
78. Tarui S, Ishigami S, Ousaka D, et al. Transcoronary infusion of cardiac progenitor cells in hypoplastic left heart syndrome: Three-year follow-up of the Transcoronary Infusion of Cardiac Progenitor Cells in Patients With Single-Ventricle Physiology (TICAP) trial. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015;150(5):1198-207,1208.e1-2. doi: 10.1016/j.jtcvs.2015.06.076
79. Chakravarty T, Makkar RR, Ascheim DD, et al. ALLogeneic Heart STem Cells to Achieve Myocardial Regeneration (ALLSTAR) Trial: Rationale and Design. *Cell Transplant.* 2017;26(2):205-14. doi: 10.3727/096368916X692933
80. Chakravarty T, Makkar R, Henry T, et al. Multivessel intracoronary infusion of allogeneic derived cardiosphere cells in cardiomyopathy: long term outcomes of the dilated cardiomyopathy intervention with allogeneic myocardially regenerative cells (DYNAMIC STUDY). *J Am Coll Cardio.* 2016;68(18):B332. doi: 10.1016/j.jacc.2016.09.848
81. Taylor M, Jefferies J, Byrne B, et al. Cardiac and skeletal muscle effects in the randomized HOPE-Duchenne trial. *Neurology.* 2019;92(8):e866-e878. doi: 10.1212/WNL.0000000000006950. PMID: 30674601.
82. Dorobantu M, Popa-Fotea NM, Popa M, et al. Pursuing meaningful endpoints for stem cell therapy assessment in ischemic cardiac disease. *World J Stem Cells.* 2017;9(12):203-18. doi: 10.4252/wjsc.v9.i12.203
83. Fischer B, Meier A, Dehne A, et al. A complete workflow for the differentiation and the dissociation of hiPSC-derived cardiospheres. *Stem Cell Res.* 2018;32:65-72. doi: 10.1016/j.scr.2018.08.015

Поступила 13.02.2020