

Карпов  
Андрей Александрович

**ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА  
РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ МИОКАРДА ПОСЛЕ ИШЕМИЧЕСКОГО  
ПОВРЕЖДЕНИЯ ПРИ ИХ ИНТРАМИОКАРДИАЛЬНОЙ  
ТРАНСПЛАНТАЦИИ**

14.01.05 – кардиология

14.03.03 – патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург

2018

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научные руководители –**

доктор медицинских наук

**Моисеева Ольга Михайловна**

доктор медицинских наук,  
член-корреспондент РАН

**Галагудза Михаил Михайлович**

**Официальные оппоненты:**

**Хирманов Владимир Николаевич** - доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины» имени А.М. Никифорова МЧС России, отдел сердечно-сосудистой патологии, заведующий

**Николаев Валентин Иванович** - доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, кафедра патологической физиологии, заведующий

**Ведущая организация** - ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Минобороны Российской Федерации

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г. в \_\_\_\_\_ на заседании диссертационного совета Д 208.054.04 на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Минздрава России (197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д.2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Минздрава России (197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д.2, [www.almazovcentre.ru](http://www.almazovcentre.ru)).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 208.054.04

доктор медицинских наук, профессор

**Недошивин Александр Олегович**

**Актуальность темы исследования и степень ее разработанности**

Инфаркт миокарда (ИМ) – одна из основных причин развития хронической сердечной недостаточности (ХСН), которая по-прежнему остается ключевой проблемой мирового здравоохранения (Ощепкова Е.В. и соавт., 2013; Бунова С.С. и соавт., 2014; Mozaffarian D. et al., 2015).

В острейшем и остром периодах трансмурального ИМ основным подходом к лечению считается применение методик реваскуляризации, таких как коронароангиопластика со стентированием инфаркт-зависимой артерии (Damman P. et al., 2016) и тромболизис (Терещенко С.Н. и соавт., 2010). Однако эффективность этих подходов значительно снижается с течением времени, что делает их недостаточно эффективными в подостром периоде ИМ (Солнышков С.К. и соавт., 2012). Совершенно очевидно, что в лечении подострого ИМ и последующей за ним ХСН значительное место могут занять регенеративные технологии, нацеленные на воссоздание поврежденной ткани миокарда. Одним из актуальных направлений в этой области является клеточная терапия (Маслов Л.Н. и соавт., 2013; Nunez Garcia A. et al., 2015), направленная на восстановление поврежденного миокарда путем доставки в него живых аутологичных или аллогенных стволовых клеток (Голухова Е.З. и соавт., 2007). Среди стволовых клеток и клеток-предшественников наибольший интерес представляют мезенхимные стволовые клетки (МСК) (Соколова И.Б. и соавт., 2010; Lee S. et al., 2015).

На сегодняшний день в качестве основного источника получения МСК рассматривается костный мозг (КМ) (Калинина Н.И. и соавт., 2011), однако эти клетки присутствуют практически во всех тканях взрослого организма. Особого внимания, как объект для клеточной терапии, заслуживают МСК, полученные из жировой ткани (МСК-ЖТ) взрослого организма. Легкая доступность для выделения, значительный пролиферативный потенциал (Dmitrieva R.I. et al., 2012) в сочетании с высоким содержанием стволовых клеток положительно отличает ЖТ от КМ (Повещенко О.В. и соавт., 2008). При этом многие исследователи отмечают большое сходство популяций МСК, полученных из этих двух источников (Петренко А.Ю. и соавт., 2008). Вместе с тем, эффекты МСК-ЖТ на миокард требуют дальнейшего изучения.

Несмотря на всю перспективность этого направления, эффективность клеточной терапии МСК в клинических исследованиях оказалась достаточно низкой: в большинстве исследований прирост систолической функции составлял от 3 до 10 % (de Jong R. et al., 2014; Liu B. et al., 2014; Afzal M.R. et al., 2015). Одним из основных факторов, ограничивающих дальнейшее развитие клеточной терапии, по-прежнему остается недостаточное понимание основных механизмов кардиопротективного действия МСК. Среди возможных механизмов действия рассматривают следующие: выработка МСК биологически активных веществ в зоне повреждения (Куртова А.В. и соавт., 2006; Ratajczak M.Z. et al., 2012), дифференцировка МСК в клетки сосудов (Кирик В.М. и соавт., 2010; Silva G.V. et al., 2005) и в кардиомиоциты (Кругляков К.В. и соавт., 2006; Orlic D. et al., 2001; Toma C. et al., 2002), стимулирующее воздействие на резидентные стволовые клетки сердца (Hatzistergos K.E. et al., 2010). Раскрытие основного механизма кардиопротективного действия МСК позволит оптимизировать дальнейшие пути развития этого терапевтического направления.

Несомненный интерес вызывают попытки модификации самих стволовых клеток. Это открывает перспективы контроля и изменения механизмов действия, повышения выживаемости клеток в условиях ишемии и получения принципиально новых

кардиопротективных свойств МСК (Samper E. et al., 2013). Одним из наиболее перспективных направлений в области модификации МСК может быть создание многоклеточных единиц трансплантации на основе стволовых клеток (Miyahara Y. et al., 2006; Chen C.H. et al., 2006). Применение многоклеточных единиц трансплантации способно не только повысить эффективность клеточной терапии путем сохранения межклеточных контактов и защиты от иммунной системы, но и способствовать раскрытию механизмов протективного действия МСК. Заключение стволовых клеток в микрокапсулы из полупроницаемой мембраны предотвращает прямой контакт этих клеток с микроокружением, что исключает роль дифференцировки стволовых клеток как механизма действия. С другой стороны, полупроницаемая структура микрокапсулы сохраняет возможность свободной диффузии сигнальных молекул в обоих направлениях, не препятствуя реализации паракринных механизмов (Levit R. D. et al., 2013). Таким образом, применение данной технологии может способствовать более глубокому пониманию фундаментальных механизмов действия МСК на миокард после ишемического повреждения.

### **Цель исследования**

Определить эффекты мезенхимных стволовых клеток из разных источников на процесс постинфарктного ремоделирования миокарда и оценить вклад секреторируемых стволовыми клетками паракринных факторов в реализацию кардиорепаративного действия мезенхимных стволовых клеток для повышения эффективности клеточной терапии ишемической болезни сердца.

### **Задачи исследования**

1. Сравнить эффект интрамиокардиальной трансплантации мезенхимных стволовых клеток из костного мозга и жировой ткани на ремоделирование сердца после ишемического-реперфузионного повреждения.
2. Изучить влияние мезенхимных стволовых клеток из костного мозга на морфофункциональные параметры сердца при постинфарктном ремоделировании на модели перманентной окклюзии левой коронарной артерии.
3. Разработать протокол микроинкапсулирования мезенхимных стволовых клеток в полупроницаемые микрокапсулы с заданной скоростью биodeградации и сохранением оптимального состояния инкапсулированных стволовых клеток при их интрамиокардиальной трансплантации.
4. Изучить вклад паракринных факторов в процесс постинфарктного ремоделирования миокарда после трансплантации стволовых клеток с помощью методики микроинкапсулирования клеток на модели ишемического повреждения.
5. Исследовать аритмогенную активность нативных и инкапсулированных мезенхимных стволовых клеток при их интрамиокардиальной трансплантации.

### **Научная новизна**

Показано, что интрамиокардиальная трансплантация мезенхимных стволовых клеток из костного мозга после ишемического-реперфузионного повреждения миокарда

сопровождалась более выраженным улучшением морфофункциональных параметров сердца по сравнению с применением мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани.

Выявлена способность мезенхимных стволовых клеток из костного мозга при их трансплантации в перинфарктную область уменьшать размер рубца и увеличивать систолическую функцию левого желудочка.

Разработан протокол микроинкапсулирования клеточных продуктов, в том числе мезенхимных стволовых клеток, в полупроницаемые микрокапсулы из альгината натрия с заданной скоростью биодеградации без снижения жизнеспособности клеток и их секреторной функции для изучения и безопасного применения паракринных факторов, секретируемых стволовыми клетками.

Обоснована ведущая роль секретируемых мезенхимными стволовыми клетками паракринных факторов в механизме реализации благоприятных эффектов клеточной терапии на миокард путем сравнения эффектов нативных и микроинкапсулированных стволовых клеток. Продемонстрирована аритмогенная безопасность применения нативных и микроинкапсулированных мезенхимных стволовых клеток при их интрамиокардиальной трансплантации.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Разработан протокол микроинкапсулирования клеточных продуктов, в том числе мезенхимных стволовых клеток, позволяющий изолированно изучать механизмы действия секретируемых стволовыми клетками паракринных факторов *in vivo* и *in vitro*.

На основании полученных данных обоснована концепция о главенствующей роли паракринных факторов в реализации кардиопротективных эффектов мезенхимных стволовых клеток из костного мозга в связи с отсутствием значимых отличий в эффективности между нативными и микроинкапсулированными стволовыми клетками.

Наибольшее влияние мезенхимных стволовых клеток из костного мозга на размер рубца и систолическую функцию левого желудочка после инфаркта миокарда по сравнению с мезенхимными стволовыми клетками из жировой ткани обосновывает предпочтительность исследования этой популяции клеток для клинического применения в терапии инфаркта миокарда.

Отсутствие аритмогенного действия нативных и микроинкапсулированных мезенхимных стволовых клеток при их интрамиокардиальной трансплантации крысам служит предпосылкой обоснования их аритмогенной безопасности при применении в клинической практике.

Полученные данные могут быть использованы для разработки технологии лечения больных с сердечной недостаточностью ишемического генеза, основанной на применении комбинации паракринных факторов, секретируемых мезенхимными стволовыми клетками.

### **Методология и методы исследования**

Набор использованных методов исследования соответствует современному методическому уровню экспериментальных и лабораторных исследований. Примененные методы статистической обработки данных являются современными и отвечают поставленной цели и задачам исследования.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. Применение мезенхимных стволовых клеток из костного мозга уменьшает размер рубца и улучшает систолическую функцию левого желудочка после инфаркта миокарда.
2. Эффективность применения мезенхимных стволовых клеток при инфаркте миокарда зависит от их происхождения.
3. Защитное действие мезенхимных стволовых клеток на миокард после ишемического повреждения в основном реализуется за счет паракринного механизма.

## **Степень достоверности и апробация результатов**

Основные результаты диссертационного исследования представлены в виде докладов на научных конференциях и симпозиумах: XVII межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2011), XIX международная медико-биологическая конференция молодых исследователей (Санкт-Петербург, 2016), Конгресс Европейского кардиологического общества 2017 (Барселона, 2017).

Результаты диссертационной работы включены в отчет о научно-исследовательской работе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Минздрава России по теме государственного задания "Тестирование эффектов клеточной терапии при моделировании различных ишемических состояний на животных" (2012–2014 гг.).

Исследование было отмечено стипендией Президента Российской Федерации студентам и аспирантам, обучающимся по очной форме обучения на 2016–2017 учебный год, приказ Министерства образования и науки Российской Федерации № 579 от 17.05.2016.

По результатам исследования опубликованы 10 печатных работ, из них 7 статей, в том числе: 4 – в изданиях, включенных в «Перечень рецензируемых научных изданий» Высшей Аттестационной Комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации, 2 – в рецензируемых международных журналах; 3 тезиса в сборниках трудов научных конференций.

Результаты и выводы диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедре хирургических болезней ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России. Получен патент на изобретение №2618435 «Способ микроинкапсулирования стволовых клеток».

## **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Работа содержит 13 таблиц и 16 рисунков. Список литературы включает 264 источника, из них 51 – отечественный и 213 – зарубежных.

## Содержание работы

### Материалы и методы исследования

Эксперименты были проведены на 139 самцах крыс стока Wistar массой 250–300 г (питомник «Рапполово», г. Санкт-Петербург). Все эксперименты проведены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (США).

*Выделение и культивирование мезенхимных стволовых клеток из костного мозга и жировой ткани.* Костный мозг для выделения МСК получали из большеберцовых, бедренных и плечевых костей с помощью промывания полости трубчатых костей фосфатным буфером. Для получения МСК из ЖТ использовалась околопочечная жировая клетчатка. Клетки КМ и ЖТ помещались в 100 мм культуральный флакон и культивировались в  $\alpha$ -MEM (PanEco, Россия) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США), глутамина и антибиотиков. Смена культуральной среды производилась раз в два дня. Исследование иммунофенотипа МСК проводилось посредством анализа экспрессии поверхностных мембранных маркеров методом проточной цитофлуориметрии с помощью установки Guava easyCyte 5 (LLC Merck, США). Клетки исследовались на предмет экспрессии маркера мезенхимных клеток: CD90; кроме того, исключалось наличие маркера гемопоэза CD45. Способность МСК к направленной дифференцировке оценивалась качественно, посредством визуального анализа наличия в культуре клеток, дифференцированных в остеогенном и адипогенном направлениях.

*Моделирование ишемического и ишемического-реперфузионного повреждения миокарда путем окклюзии левой коронарной артерии в хроническом эксперименте у крыс.* На первом этапе исследования производилось моделирование ишемического-реперфузионного повреждения миокарда. Для этого крысы были наркотизированы путем внутрибрюшинного введения хлоралгидрата (Acros Organics, США) в дозе 450 мг/кг. Искусственная вентиляция легких осуществлялась через интубацию трахеи с предварительной обработкой гортани 2 % раствором лидокаина (частота дыхания – 60/мин., дыхательный объем – 3 мл/100 г массы тела). В ходе эксперимента у животных выполнялась запись электрокардиограммы (Кардиотехника-8, ЗАО «Инкарт», СПб) в стандартных отведениях. Доступ к сердцу производился через четвертое межреберье с предварительным диагональным рассечением кожи от мечевидного отростка до средней аксиллярной линии и последующим разведением грудных мышц. Далее выполнялось рассечение перикарда и наложение проленовой лигатуры (Ethicon, 6-0, Германия) на ствол левой коронарной артерии (ЛКА). В случае моделирования ишемического-реперфузионного повреждения натяжение лигатуры производилось с помощью окклюдера сроком на 40 минут с последующим снятием окклюдера для обеспечения реперфузии. При воспроизведении перманентной ишемии коронарная артерия перевязывалась постоянным хирургическим узлом. Наступление ишемии верифицировали визуально и по электрокардиографическим критериям: элевации сегмента ST, наступлению ишемических аритмий. В дальнейшем производилось послойное ушивание раны.

*Модель изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу.* Грудная клетка вскрывалась широким чрездиафрагмальным билатеральным доступом, быстро вырезалось сердце и помещалось в ледяной (2–4 °С) раствор Кребса-Хенселейта, содержащий (в mM): глюкозы 11, NaCl 118, KCl 4,7, CaCl<sub>2</sub> 3,0, MgSO<sub>4</sub> 1,2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, NaHCO<sub>3</sub> 25. После остановки сердца его присоединяли к аппарату Лангендорфа и

осуществляли ретроградную перфузию через канюлю, введенную в аорту, раствором Кребса-Хенселейта под постоянным давлением гидростатического столба 80 мм рт. ст. Температуру перфузионного раствора, насыщенного газовой смесью, содержащей 95 % O<sub>2</sub> и 5 % CO<sub>2</sub>, поддерживали равной 37 ± 0,5 °С. рН раствора поддерживали на уровне 7,4. После завершения подготовки препарата изолированного сердца его помещали в термостатическую камеру. Тотальная ишемия воспроизводилась путем временной остановки поступления перфузата к сердцу. Длительность тотальной ишемии в эксперименте составила 30 минут, последующая реперфузия – 120 минут. В ходе эксперимента регистрировали исходные функциональные показатели изолированного сердца, а именно, конечно-диастолическое давление (КДД), пульсовое давление (ПД) в левом желудочке (ЛЖ), частоту сердечных сокращений и коронарный поток. В ходе периода глобальной ишемии осуществляли мониторинг среднего давления в ЛЖ, что позволило оценивать амплитуду и скорость наступления ишемической контрактуры. Регистрация гемодинамических показателей проводилась с помощью программного обеспечения PhysExr (ООО «Кардиопротект», Россия).

*Методика интрамиокардиальной трансплантации мезенхимных стволовых клеток в периинфарктную область.* Трансплантация стволовых клеток производилась в различные сроки после ишемического повреждения: через 30 минут и через 7 дней после начала ишемии в зависимости от протокола эксперимента. В случае интрамиокардиальной трансплантации через 30 минут, ушивание раны производилось после введения МСК, повторного операционного вмешательства не выполнялось. При интрамиокардиальной трансплантации через 7 дней на первом этапе моделировалось ишемическое-реперфузионное повреждение с дальнейшим ушиванием раны. Через 7 дней производилось повторное операционное вмешательство. Общая анестезия и хирургический доступ к сердцу были идентичны первому этапу. В обоих случаях клеточные препараты и контрольный раствор (фосфатный буфер) вводились интрамиокардиально в периинфарктную область с помощью инсулинового шприца в 3–5 различных точек, общим объемом 0,1 мл.

*Трансторакальное эхокардиографическое исследование сердца (ЭХО-КГ).* Для выполнения исследования использовалась эхокардиографическая ультразвуковая установка высокого разрешения (MyLabTouchSL 3116; Esaot; Италия) с сосудистым линейным датчиком (частота 13 МГц, глубина сканирования – 2 см). Перед проведением ЭХО-КГ животных наркотизировали путем внутривентрального введения хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. Основными параметрами, оцениваемыми при исследовании, были: толщина передней стенки ЛЖ в диастолу (мм), толщина задней стенки ЛЖ в диастолу (мм), конечный диастолический размер ЛЖ (мм), конечный систолический размер ЛЖ (мм), фракция укорочения (ФУ) ЛЖ (%).

*Телеметрическая регистрация ритма сердца.* Для длительной регистрации ЭКГ использовалась телеметрическая установка (PowerLab, Австралия) с программным обеспечением LabChart (США). На первом этапе после наркотизации (внутрибрюшинного введения хлоралгидрата в дозе 450 мг/кг) производилась имплантация телеметрического датчика в брюшную полость животного, при этом один электрод фиксировался к мышцам брюшной стенки, второй проводился подкожно в область правой половины грудной клетки. Через семь дней адаптации животным производилась интрамиокардиальная трансплантация стволовых клеток и регулярная запись ЭКГ в течение 1 часа на 1, 7 и 21 сутки. В ходе анализа записи оценивалось общее количество нарушений ритма, количество одиночных, парных и групповых суправентрикулярных экстрасистол (ЭС), эпизодов суправентрикулярных

пароксизмальных тахикардий (ПТ), одиночных и парных желудочковых ЭС, эпизодов желудочковой тахикардии и фибрилляции желудочков (ФЖ).

*Гистологическая оценка размера рубца и ремоделирования миокарда.* Наркотизированному животному производилось вскрытие грудной клетки широким чрездиафрагмальным билатеральным доступом и введение в полость левого предсердия 10 % раствор хлорида калия до полной остановки сердечной деятельности в фазе диастолы. Сердце извлекалось из полости перикарда, промывалось физиологическим раствором для удаления крови из камер. Фиксация проводилась в растворе забуференного 10 % формалина в течение 24 часов. Полость ЛЖ поперечно ниже лигатуры разделялась на три равные части, после чего выполнялась проводка, заливка в парафин и изготовление гистологических блоков по стандартному протоколу (Меркулов Г.А. и соавт., 1961). Срезы толщиной 3–5 мкм окрашивались гематоксилином и эозином, Picro Sirius Red (abcam, США) для морфологического исследования. Исследование препаратов проводилось с помощью микроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия) при увеличении от  $\times 5$  до  $\times 40$ . Результаты микроскопии оценивали с помощью программного обеспечения «ВидеоТест-Морфология» (ВидеоТест, СПб). В качестве оценочных критериев рубца и ремоделирования ЛЖ использовались: толщина рубцовой/передней стенки левого желудочка (мм), толщина межжелудочковой перегородки (мм), процент площади рубца от общей площади стенок ЛЖ (%), индекс гипертрофии (отношение толщины межжелудочковой перегородки к толщине рубцовой стенки), индекс дилатации (отношение площади полости ЛЖ к площади всего левого желудочка в процентах).

*Микроинкапсулирование мезенхимных стволовых клеток в полупроницаемые капсулы из альгината натрия.* Для микроинкапсулирования МСК крыс использовалась установка Encapsulator B-390 (BUCHI, Швейцария). В качестве полимерной основы микрокапсулы был выбран альгинат натрия (Sigma Aldrich, США). Суспензия, содержащая  $2 \times 10^6$  МСК в 1 мл 1 % раствора альгината натрия, подавалась на вход установки Encapsulator B-390 с заданными параметрами работы: частота вибрации 3000 Гц, напряжение электродов 2000 В, давление 450–500 мбар, диаметр используемой форсунки – 120 мкм. Указанные параметры обеспечивают образование микрокапсул с диаметром  $250 \pm 50$  мкм. Микрокапсулы стабилизировались с помощью различных координирующих агентов (2,2 % и 1,2 % растворы хлорида бария ( $\text{BaCl}_2$ ), 1,5 % раствор хлорида кальция ( $\text{CaCl}_2$ ), раствор, содержащий 50 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  и 50 ммоль/л  $\text{BaCl}_2$ ). После инкубации в стабилизирующем растворе в течение 10 минут, микрокапсулы отмывались физиологическим раствором. Оценка изотоничности (осмоляльности) стабилизирующих растворов производилась с помощью осмометра OSMOMAT 030 (GONOTEC; Германия). Жизнеспособность клеток *in vitro* оценивалась через 30 мин и через 5 дней после микроинкапсулирования с помощью витального красителя LIVE/DEAD Kit (Life Technologies, США).

*Иммуноферментный анализ цитокинового профиля нативных и микроинкапсулированных мезенхимных стволовых клеток.* Для оценки *in vitro* секреторной активности нативных и микроинкапсулированных МСК-КМ использовался набор для иммуноферментного анализа (ИФА) TGF- $\beta 1$  Rat ELISA Kit (Life Technologies, США). Определение концентрации цитокина производилось в культуральной среде на 5 день после инкапсуляции. Анализ полученных результатов производился с помощью спектрофотометра Model 680 (Bio-Rad, США).

*Определение количества клеток в микрокапсуле с помощью конфокальной микроскопии.* Количество клеток в микрокапсулах определялось с помощью конфокальной микроскопии Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия) с лазером 405 нм и программным обеспечением Leica Application Suite Advanced Fluorescence (Leica

Microsystems, Германия). Стволовые клетки перед инкапсулированием окрашивались флуоресцентным красителем DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид).

*In vitro* оценка стабильности микрокапсул. Стабильность полученных микрокапсул оценивалась в динамике при инкубации их в фосфатном буфере на 1, 5, 10, 14 и 21 день. Для оценки использовались 20 капсул из каждой временной точки. Размер, четкость края и визуальная плотность определялись с помощью светового микроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия) при увеличении  $\times 40$  и  $\times 100$ .

*Определение уровня лейкоцитов периферической крови у крыс.* Для определения уровня лейкоцитов периферической крови производился забор крови из ретроорбитального венозного сплетения. Анализ образцов производился с помощью автоматического ветеринарного гематологического анализатора Abacus Junior 5 (Vet) (Diatron, Венгрия).

### **Статистическая обработка полученных результатов**

Анализ данных производился с помощью статистического пакета Statistica 7.0 (StatSoft; США). Первичный анализ различий данных в опытных группах производился с помощью многомерного непараметрического критерия Краскела-Уоллиса (Nonparametric One-way ANOVA), значения  $p < 0,05$  рассматривали в качестве значимых. Последующий анализ различий в парах выполнялся с помощью метода множественных сравнений по критерию Краскела-Уоллиса для показателей со статистически значимой разницей по данным многомерного анализа. Значения  $p < 0,05$  рассматривали в качестве значимых.

Данные представлены в виде "среднее  $\pm$  стандартное отклонение".

### **Результаты исследования и их обсуждение**

#### **Выделение и культивирование МСК из костного мозга и жировой ткани**

Первичные культуры МСК-КМ и МСК-ЖТ крыс были получены и охарактеризованы. Клетки имели характерную морфологию МСК и демонстрировали высокую скорость пролиферации. Проточная цитометрия подтвердила характерный иммунофенотип как популяции МСК-КМ, так и МСК-ЖТ (CD 45- / CD90+). Пластичность клеток, оцененная на уровне 3 пассажа, демонстрировала способность дифференцировки в остеогенном и адипогенном направлениях. Репликативное старение МСК и результирующая кривая роста имели ожидаемую форму.

#### **Сравнение эффектов интрамиокардиальной трансплантации МСК костного мозга и жировой ткани на ремоделирование сердца после ишемического-реперфузионного повреждения миокарда**

Для сравнения эффектов МСК-КМ и МСК-ЖТ на первом этапе производилось моделирование ишемического-реперфузионного повреждения миокарда. Через 7 дней все животные случайным образом были разделены на 4 группы:

1. Ложнооперированные животные (ЛО,  $n = 15$ ) – крысы, которым на первом этапе производилась ложная операция (не подвергшиеся ишемическому-реперфузионному повреждению); в область миокарда, соответствующую перинфарктной, вводился фосфатный буфер.

2. ИМ (n = 20) – крысы, перенесшие на первом этапе ишемическое-реперфузионное повреждение; в периинфарктную область вводился фосфатный буфер.
3. МСК-КМ (n = 17) – в периинфарктную область вводился МСК костного мозга.
4. МСК-ЖТ (n = 14) – в периинфарктную область вводился МСК жировой ткани.

Препарат (МСК в количестве  $1 \times 10^6$  в фосфатном буфере, объем 0,1 мл) в группах МСК-КМ, МСК-ЖТ либо фосфатный буфер в группе ложнооперированных животных и в группе ИМ вводился в 3–5 различных точек миокарда. Введение МСК-КМ и МСК-ЖТ не вызывало достоверных изменений картины ЭКГ. В послеоперационном периоде инфекционных осложнений и смертельных исходов ни в одной группе выявлено не было. По данным модели изолированного сердца на 14 день после трансплантации МСК было показано, что исходное КДД, ПД в ЛЖ и коронарный кровоток во всех исследуемых группах значимо не отличались (рисунок 1 А-В). На 20 минуте тотальной ишемии давление в ЛЖ в экспериментальных группах составило: МСК-КМ –  $79 \pm 17$  мм рт. ст., МСК-ЖТ –  $58 \pm 29$  мм рт. ст., контрольный инфаркт  $54 \pm 23$  мм рт. ст., ложнооперированные животные –  $82 \pm 10$  мм рт. ст.; на 30 минуте: МСК-КМ –  $68 \pm 10$  мм рт. ст., МСК-ЖТ –  $57 \pm 23$  мм рт. ст., контрольный инфаркт –  $53 \pm 22$  мм рт. ст., ложнооперированные животные –  $73 \pm 12$  мм рт. ст (рисунок 1 Г).

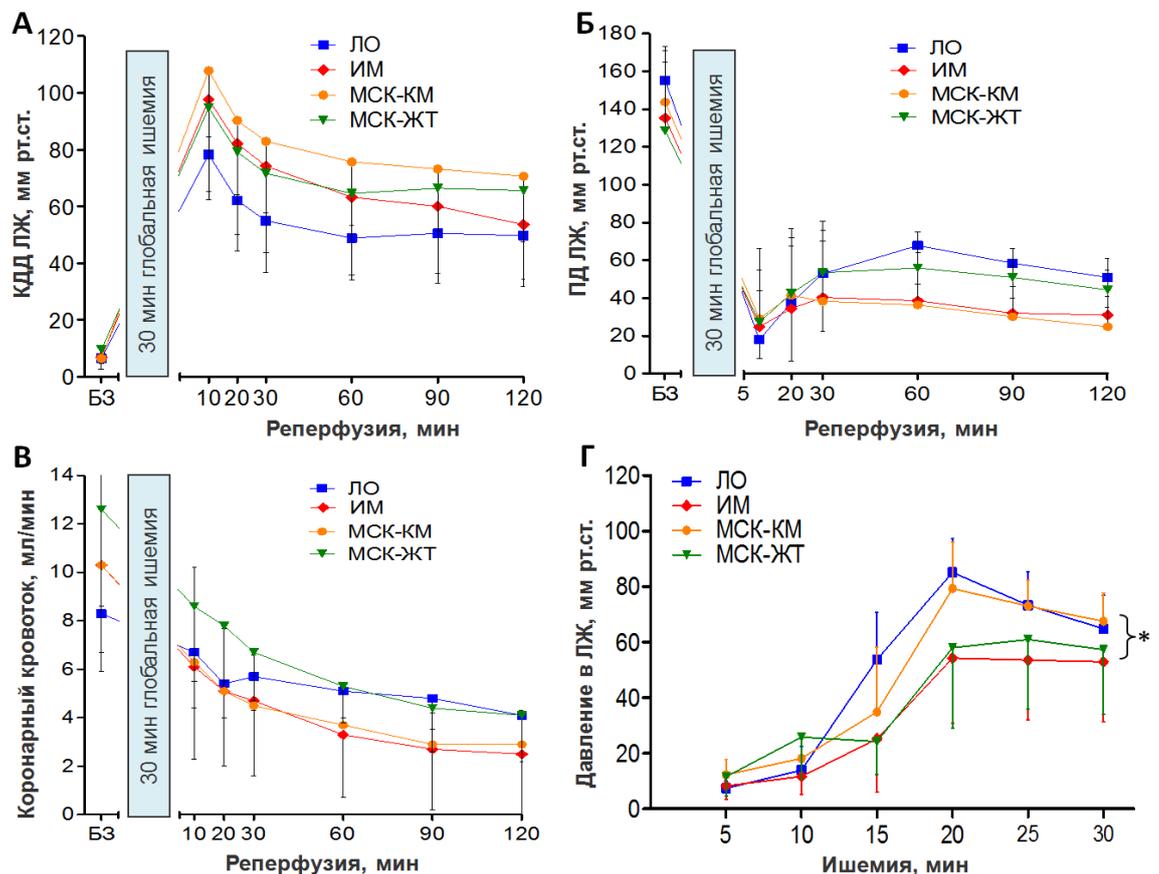


Рисунок 1 – Функциональные показатели изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу при 30 минутной глобальной ишемии и последующей 120 минутной реперфузии. А – конечное диастолическое давление в левом желудочке (КДД ЛЖ); Б – пульсовое давление в левом желудочка (ПД ЛЖ); В – коронарный кровоток; Г – среднее давление в левом желудочка в течение 30 минут глобальной ишемии. \* – среднее давление в левом желудочке значимо меньше в группах МСК-ЖТ и ИМ по сравнению с МСК-КМ и ложнооперированными животными ( $p < 0,05$ )

При морфологическом исследовании сердца было выявлено значимое уменьшение площади рубца в группе МСК-КМ ( $22 \pm 5\%$ )  $p < 0,005$  и МСК-ЖТ ( $32 \pm 6\%$ )  $p = 0,011$  в сравнении с группой контрольного инфаркта ( $37 \pm 3\%$ ). Инфаркт лимитирующее действие было значимо выше в группе МСК-КМ по сравнению с МСК-ЖТ ( $p < 0,005$ ) (рисунок 2).

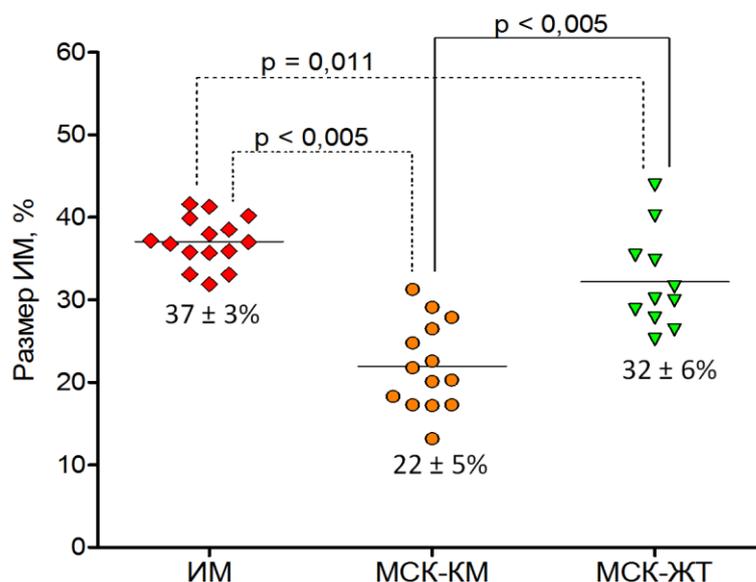


Рисунок 2 – Размер рубца левого желудочка в опытных группах через 21 день после моделирования инфаркта миокарда. Определяется значимо большее инфаркт-лимитирующее действие МСК-КМ по сравнению с МСК-ЖТ ( $p < 0,005$ ). Значимое отличие МСК-КМ ( $p < 0,005$ ) и МСК-ЖТ ( $p = 0,011$ ) от контрольного ИМ

### Обоснование оптимального протокола микроинкапсулирования МСК в полупроницаемую мембрану из альгината натрия с заданными параметрами биodeградации

Получены альгинатные капсулы с диаметром  $225 \pm 25$  мкм.

Для выбора оптимального стабилизирующего раствора производилось сравнение 2,2 % и 1,2 % растворов  $\text{BaCl}_2$ , 1,5 % раствора  $\text{CaCl}_2$ , раствора, содержащего 50 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  и 50 ммоль/л  $\text{BaCl}_2$  по показателям осмоляльности, стабильности капсул в фосфатном буфере и жизнеспособности инкапсулированных МСК.

По результатам оценки осмоляльности стабилизирующих растворов изотоническими свойствами обладали растворы: 1,5 %  $\text{CaCl}_2$ , 2,2 %  $\text{BaCl}_2$  и раствор, содержащий 50 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  и 50 ммоль/л  $\text{BaCl}_2$ . (Таблица 1). В дальнейшем именно эти растворы использовались для стабилизации внешней оболочки микрокапсул.

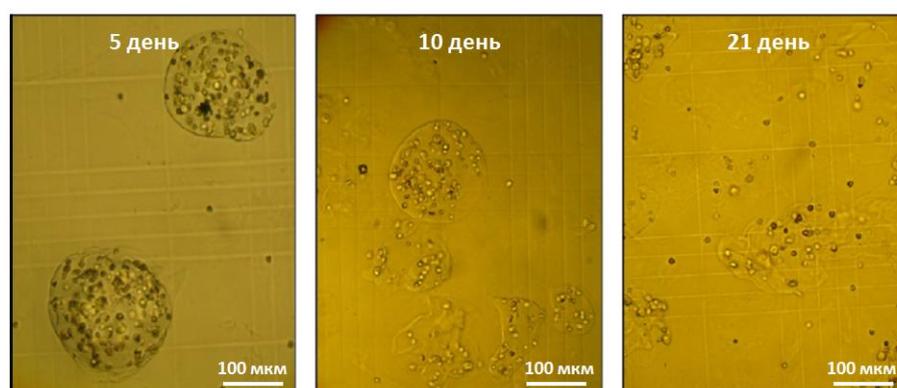
Таблица 1 – Осмоляльность растворов для стабилизации микрокапсул

Раствор	Осмоляльность, осмоль/кг
Бидистиллированная вода	0,001
0,9 % NaCl	0,290
1,5 % CaCl <sub>2</sub>	0,248
1,2 % BaCl <sub>2</sub>	0,132
2,2 % BaCl <sub>2</sub>	0,230
50 ммоль/л CaCl <sub>2</sub> и 50 ммоль/л BaCl <sub>2</sub>	0,238

Анализ стабильности капсул в фосфатном буфере показал, что при использовании 1,5 % раствора CaCl<sub>2</sub> набухание капсул происходило уже на первый день, а полное разрушение на 5 день наблюдения. При использовании 2,2 % раствора BaCl<sub>2</sub> срок биodeградации микрокапсул значительно увеличивался: легкое набухание происходило к 14 дню наблюдения, полного разрушения микрокапсул не было зафиксировано в течение всего срока наблюдения (21 день). При использовании раствора, содержащего 50 ммоль/л CaCl<sub>2</sub> и 50 ммоль/л BaCl<sub>2</sub> легкое набухание происходило на 5 день наблюдения, полное разрушение к 21 дню наблюдения (Таблица 2), что соответствует оптимальным срокам биodeградации при имплантации микрокапсул в миокард (рисунок 3).

Таблица 2 – Стабильность микрокапсул на разных сроках наблюдения при использовании различных стабилизирующих растворов

Временные точки	1,5 % CaCl <sub>2</sub>	2,2 % BaCl <sub>2</sub>	50 ммоль/л CaCl <sub>2</sub> и 50 ммоль/л BaCl <sub>2</sub>
1 день	выраженное	стабильны	стабильны
5 день	полное разрушение	стабильны	легкое набухание
10 дней	полное разрушение	стабильны	выраженное набухание
14 дней	полное разрушение	легкое набухание	выраженное набухание
21 день	полное разрушение	легкое набухание	полное растворение

Рисунок 3 – Динамика биodeградации микрокапсул, стабилизированных раствором, содержащим 50 ммоль/л CaCl<sub>2</sub> и 50 ммоль/л BaCl<sub>2</sub>

Исследование жизнеспособности микроинкапсулированных клеток показало большую выживаемость МСК внутри микрокапсул, стабилизированных 2,2 % раствором BaCl<sub>2</sub> и раствором, содержащим 50 ммоль/л CaCl<sub>2</sub> и 50 ммоль/л BaCl<sub>2</sub> по сравнению с

1,5 % раствором  $\text{CaCl}_2$  в динамике: через 30 минут –  $71 \pm 5$  %,  $76 \pm 6$  % и  $48 \pm 4$  %, соответственно; через 5 дней –  $63 \pm 6$  %,  $68 \pm 9$  % и  $18 \pm 2$  %, соответственно. С другой стороны, гибель подавляющего большинства стволовых клеток совпадала со временем полного разрушения микрокапсул, стабилизированных раствором, содержащим 50 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  и 50 ммоль/л  $\text{BaCl}_2$  к 21 дню (рисунок 4).

Количество клеток в капсуле, оцененное с помощью конфокальной микроскопии, составляло  $35 \pm 2$ .

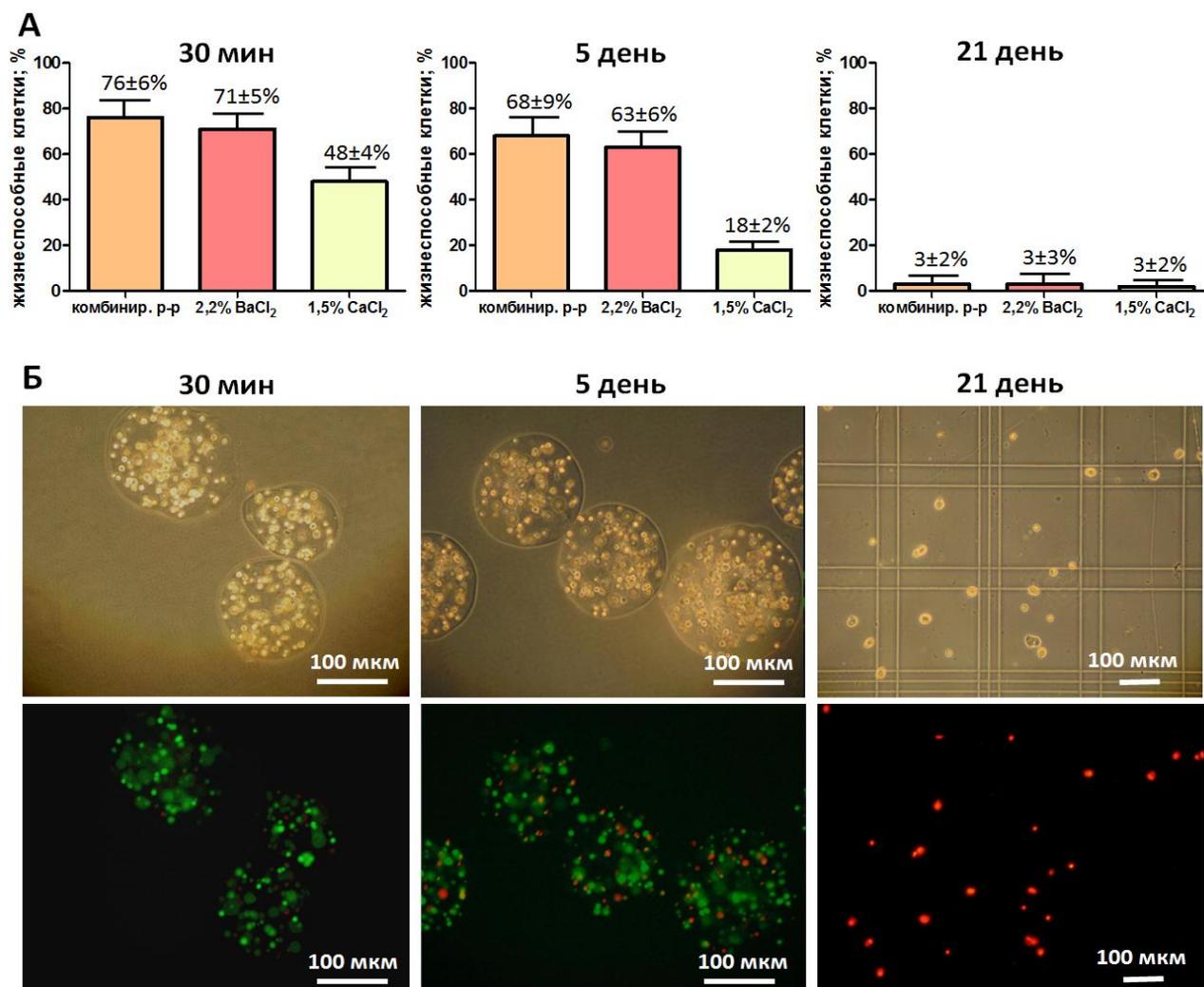


Рисунок 4 – Жизнеспособность микроинкапсулированных МСК.

А – количественная оценка процентной доли жизнеспособных МСК при использовании различных стабилизирующих растворов в разные сроки после микроинкапсулирования (30 минут, 5 день, 21 день); Б – репрезентативные микрофотографии микрокапсул, стабилизированных раствором, содержащим 50 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  и 50 ммоль/л  $\text{BaCl}_2$ , окрашенных на жизнеспособность в разные сроки после микроинкапсулирования (30 минут, 5 день, 21 день). Верхняя панель – световая микроскопия, нижняя панель – флуоресцентная окраска с помощью витального красителя LIVE/DEAD Kit (Life Technologies, США)

По данным анализа секреторной активности нативных и микроинкапсулированных МСК с помощью ИФА были получены сопоставимые показатели секреции  $\text{TGF}\beta$  1, что указывает на свободную проницаемость микрокапсулы для сигнальных молекул (рисунок 5).

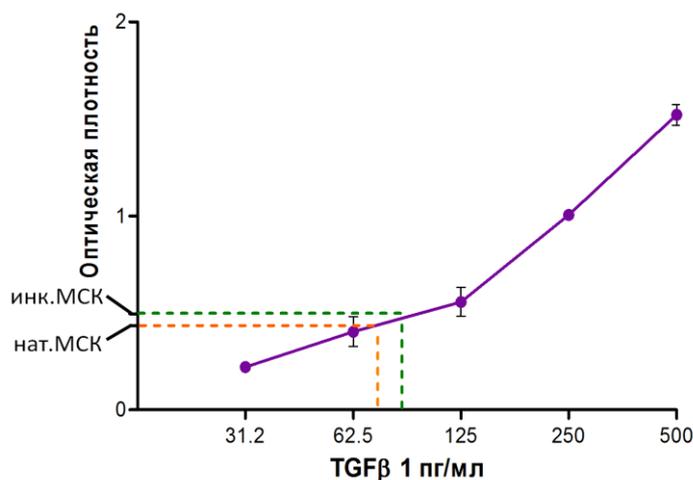


Рисунок 5 – Концентрация TGFβ 1 в культуральной среде, полученной от нативных (нат.МСК) и микроинкапсулированных МСК (инк.МСК) на 5-й день после инкапсуляции, оцененная с помощью иммуоферментного анализа

Оценка безопасности интрамиокардиальной трансплантации микроинкапсулированных МСК проводилась в экспериментах на 20 крысах самца стока Wistar массой  $225 \pm 25$  г. Все животные случайным образом были разделены на 3 группы:

1. Контроль ( $n = 7$ ): производилась интрамиокардиальная инъекция фосфатного буфера в объеме 0,1 мл в 3–5 точек передней стенки ЛЖ.
2. Микроинкапсулированные МСК (инк.МСК) ( $n = 8$ ): производилась интрамиокардиальная инъекция суспензии микрокапсул, содержащих  $2 \times 10^6$  МСК по тому же протоколу.
3. Неоперированные животные ( $n = 5$ ): животные не подвергались оперативному вмешательству.

При анализе данных уровень лейкоцитов периферической крови на 3 день после операции в группе введения микрокапсул не отличался от группы контроля ( $15,9 \pm 1,2$  ( $\times 10^9/\text{л}$ ) и  $15,6 \pm 2,3$  ( $\times 10^9/\text{л}$ ), соответственно) и был значительно выше, чем у неоперированных животных ( $3,9 \pm 0,7$  ( $\times 10^9/\text{л}$ )). На 7 день после трансплантации уровень лейкоцитов в обеих группах снизился до значений, характерных для неоперированных животных ( $4,2 \pm 0,8$  ( $\times 10^9/\text{л}$ ) и  $4,9 \pm 0,5$  ( $\times 10^9/\text{л}$ ), соответственно) (рисунок 6).

Эхокардиографические показатели в обеих группах на 7 день после операции значимо не отличались от неоперированных животных (Таблица 3). Глобальная систолическая функция в группе контроля и в группе инк.МСК была сохранена, локальных нарушений сократимости после интрамиокардиальных инъекций выявлено не было.

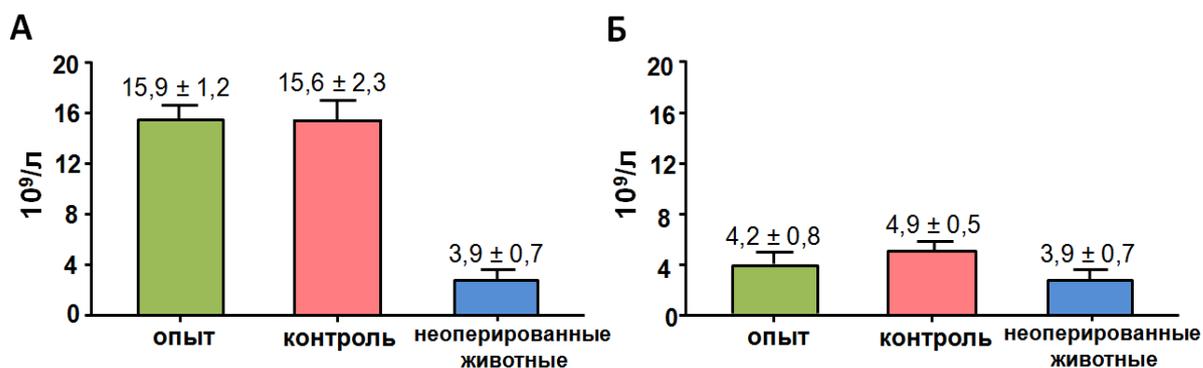


Рисунок 6 – Уровень лейкоцитов в периферической крови на разных сроках после интрамиокардиального введения. А – через 3 дня; Б – через 7 дней

Таблица 3 – Сравнительный анализ морфофункциональных показателей сердца крысы через 7 дней после интрамиокардиальной инъекции в сравнении с неоперированными животными по данным эхокардиографии

Показатели	Неоперированные животные	Группа контроля	инк.МСК
ПСЛЖд (мм)	1,8 ± 0,12	1,7 ± 0,21	1,8 ± 0,17
ЗСЛЖд (мм)	1,8 ± 0,11	1,8 ± 0,13	1,9 ± 0,14
КДР (мм)	4,9 ± 0,13	5,0 ± 0,11	5,0 ± 0,15
КСР (мм)	1,2 ± 0,06	1,4 ± 0,05	1,3 ± 0,04
Нарушения локальной сократимости	нет	нет	нет
ФВ (%)	71,3 ± 5,21	72,1 ± 2,61	68,9 ± 4,55

ПСЛЖд – передняя стенка левого желудочка в диастолу; ЗСЛЖд – задняя стенка левого желудочка в диастолу; КДР – конечный диастолический размер; КСР – конечный систолический размер; ФВ – фракция выброса

### **Оценка эффекта микроинкапсулированных МСК на процесс постинфарктного ремоделирования сердца и изучение механизмов положительного влияния МСК на миокард при ишемическом повреждении**

Опыты проводились на 37 крысах-самцах стока Wistar массой  $225 \pm 25$  г.

Моделирование ишемического повреждения выполнялось путем наложения лигатуры на ствол ЛКА.

Все животные были разделены на 4 группы:

1. Ложнооперированные животные (ЛО) ( $n = 8$ ) – производилось вскрытие грудной клетки без наложения лигатуры на ЛКА. В область миокарда, соответствующую перинфарктной, вводился фосфатный буфер.
2. Контрольный инфаркт (Контр.ИМ) ( $n = 11$ ) – через 30 минут после начала ишемии в перинфарктную зону вводился фосфатный буфер, объем 0,1 мл.
3. Микрокапсулы (Капсулы) ( $n = 10$ ) – в перинфарктную зону вводились пустые микрокапсулы в фосфатном буфере, объем 0,1 мл.
4. Нативные МСК (нат.МСК) ( $n = 11$ ) – в перинфарктную зону вводились неинкапсулированные МСК в количестве  $2 \times 10^6$  в фосфатном буфере, объем 0,1 мл.
5. Микроинкапсулированные МСК (инк.МСК) ( $n = 7$ ) – в перинфарктную зону вводились микроинкапсулированные МСК в количестве  $2 \times 10^6$  стволовых клеток в фосфатном буфере, объем 0,1 мл.

По данным ЭХО-КГ, выполненного в день моделирования ИМ, значимых различий между опытными группами во ФУ ЛЖ выявлено не было ( $p = 0,099$ ) (рисунок 7 А), что указывает на одинаковые условия перед началом введения во всех исследуемых группах. Напротив, значения ФУ ЛЖ всех опытных групп были значимо ниже ( $p < 0,001$ ), чем в группе ЛО, что указывает на эффективность выполненной модели ишемического повреждения миокарда.

На 14 и 28 день после ИМ в группе нат.МСК и в группе инк.МСК ФУ ЛЖ была значимо выше по сравнению с Контр.ИМ: 14 день:  $p = 0,001$  и  $p = 0,033$ , соответственно; 28 день:  $p < 0,001$  и  $p = 0,006$ , соответственно. Значимых различий между эффектами нат.МСК и применением инк.МСК на ФУ ЛЖ выявлено не было: 14 день –  $p = 0,186$ ;

28 день –  $p = 0,314$  (рисунок 7 Б-Г). Применение пустых микрокапсул не приводило к значимому увеличению ФУ на всех сроках наблюдения.

По данным гистологического исследования сердца значимые различия были получены по показателю процента площади рубца от общей площади стенок ЛЖ между Контр.ИМ и нат.МСК ( $p = 0,015$ ) и Контр.ИМ и применением инк.МСК ( $p = 0,03$ ) (рисунок 8 А,Б). Значимых различий между использованием нативных МСК и инк.МСК получено не было ( $p = 0,637$ ).

Значения толщины межжелудочковой перегородки (МЖП) ( $p = 0,670$ ), толщины рубцовой стенки ( $p = 0,460$ ), индекса гипертрофии ( $p = 0,670$ ) и индекса дилатации ( $p = 0,176$ ) по данным многомерного непараметрического критерия Краскела-Уоллиса между опытными группами значимо не различались (рисунок 8 В-Д).

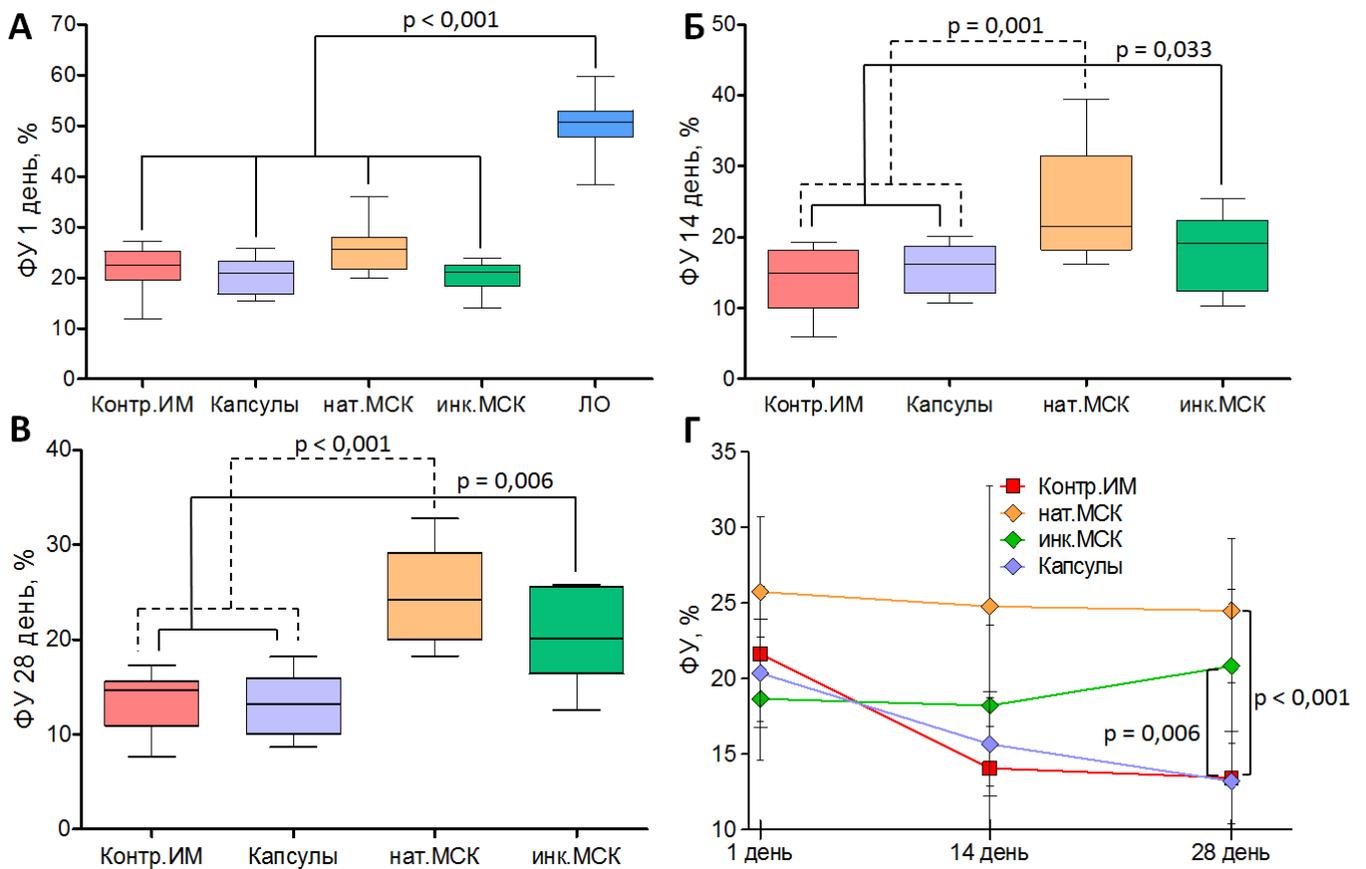


Рисунок 7 – Изменение систолической функции левого желудочка в разные сроки ИМ по данным ЭХО-КГ. А – фракция укорочения (ФУ) ЛЖ в первый день после ишемического повреждения; Б – ФУ ЛЖ через 14 дней; В – ФУ ЛЖ через 28 дней; Г – динамика изменения ФУ ЛЖ в течение всего времени наблюдения

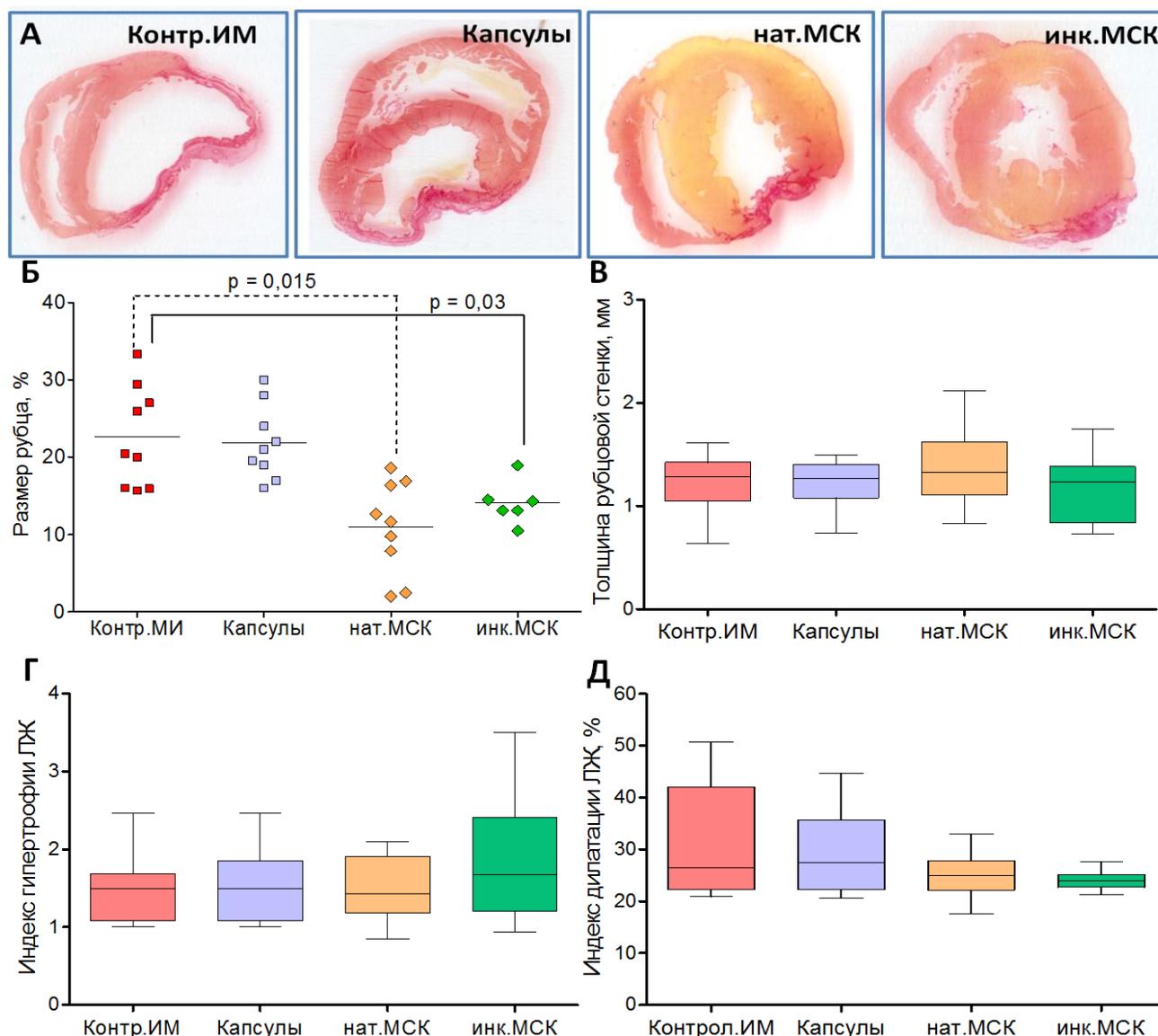


Рисунок 8 – Показатели размера рубца и ремоделирования ЛЖ по данным гистологического исследования сердца. А – репрезентативные срезы сердца, исследуемых групп (окраска: Picro Sirius Red); Б – процент площади рубца от общей площади стенок ЛЖ; В – толщина рубцовой стенки; Г – индекс гипертрофии ЛЖ; Д – индекс дилатации ЛЖ

### Оценка аритмогенной безопасности применения нативных и микроинкапсулированных МСК

Опыты проводились на 6 крысах-самцах стока Wistar массой  $225 \pm 25$  г. На первом этапе производилась имплантация телеметрического датчика (PowerLab, Австралия). Через семь дней после этого животных случайным образом разделяли на 3 группы:

1. Ложнооперированные (ЛО) ( $n = 2$ ) – производился доступ до сердца с введением в область передней стенки ЛЖ фосфатного буфера в объеме 0,1 мл.
2. Нативные МСК (нат.МСК) ( $n = 2$ ) – в область передней стенки ЛЖ вводились неинкапсулированные МСК в количестве  $2 \times 10^6$  в фосфатном буфере, объем 0,1 мл.
3. Микроинкапсулированные МСК (инк.МСК) ( $n = 2$ ) – в область передней стенки ЛЖ вводились микроинкапсулированные МСК в количестве  $2 \times 10^6$  в фосфатном буфере, объем 0,1 мл.

Телеметрическая регистрация ЭКГ производилась в течение 1 часа на 1, 7 и 21 сутки после интрамиокардиальной инъекции (рисунок 9 А).

В результате анализа полученных данных жизнеугрожающих аритмий (ФЖ, желудочковая тахикардия) ни в одном из случаев выявлено не было. В 1 день после интрамиокардиальной инъекции во всех группах отмечалось достоверно большее общее количество нарушений ритма ( $p = 0,004$ ) (рисунок 9 Б) и количество одиночных предсердных экстрасистол ( $p = 0,004$ ) по сравнению с другими временными точками наблюдения. Ни в одной из исследуемых временных точек значимых различий между группами по всем оцениваемым показателям выявлено не было. Оценка характера желудочковых нарушений ритма не была целесообразна из-за их малого числа.

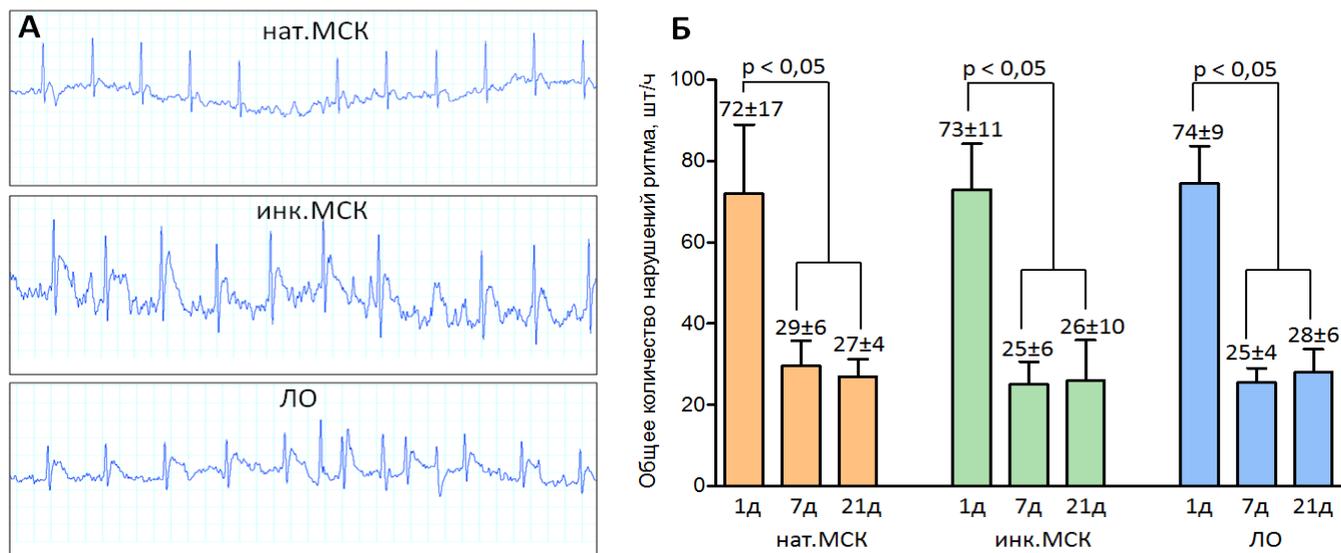


Рисунок 9 – Частота нарушений ритма у неинфарктных животных, получавших свободные или микроинкапсулированные МСК. А – типичные примеры аритмий, зарегистрированных в ходе телеметрического мониторинга; Б – общее количество эпизодов нарушения ритма за 1 ч, зарегистрированных в различные сроки после операции (1, 7 и 21 день)

## Выводы

1. Мезенхимные стволовые клетки из костного мозга обладают более выраженным инфаркт-лимитирующим действием по сравнению с мезенхимными стволовыми клетками из жировой ткани (на 31 %) при их интрамиокардиальной трансплантации на седьмой день после ишемического-реперфузионного повреждения миокарда.
2. Применение мезенхимных стволовых клеток из костного мозга уменьшает размер рубца и улучшает систолическую функцию левого желудочка при интрамиокардиальной трансплантации в периинфарктную зону на модели окклюзии левой коронарной артерии.
3. Микрокапсулы из альгината натрия, содержащие мезенхимные стволовые клетки и стабилизированные в растворе, содержащем 40–60 ммоль/л хлорида кальция и 40–60 ммоль/л хлорида бария, обеспечивают оптимальное состояние стволовых клеток и характеризуются заданными сроками биодegradации, что позволяет

использовать их для изучения вклада паракринных факторов в кардиорепаративный эффект мезенхимных стволовых клеток.

4. Влияние нативных и микроинкапсулированных мезенхимных стволовых клеток на размер рубца и систолическую функцию сердца после инфаркта миокарда значительно не различается; это доказывает, что паракринные факторы, секретируемые мезенхимными стволовыми клетками, представляют собой основной механизм кардиорепаративного действия мезенхимных стволовых клеток на миокард после ишемического повреждения.
5. Нативные и микроинкапсулированные мезенхимные стволовые клетки при их интрамиокардиальной трансплантации не обладают аритмогенной активностью.

### **Практические рекомендации**

1. Мезенхимные стволовые клетки из костного мозга можно рассматривать как перспективные для создания биомедицинских клеточных продуктов для клеточной терапии ишемического-реперфузионного повреждения сердца в подостром периоде инфаркта с целью уменьшения размера рубца и предотвращения развития хронической сердечной недостаточности.
2. Микроинкапсулированные мезенхимные стволовые клетки не уступают в эффективности нативным стволовым клеткам и могут быть в перспективе использованы для изучения паракринных эффектов, повышения иммунотолерантности и безопасности клеточной терапии.
3. Отсутствие аритмогенного действия нативных и микроинкапсулированных мезенхимных стволовых клеток при их интрамиокардиальной трансплантации экспериментальным животным служит основанием для оценки их аритмогенной безопасности при применении в клинической практике.
4. Для терапии ишемической болезни целесообразно применение комбинации паракринных факторов, секретируемых мезенхимными стволовыми клетками, что создает потенциальную альтернативу применению самих стволовых клеток.

### **Список основных работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Карпов, А.А. Моделирование постинфарктной сердечной недостаточности путем окклюзии левой коронарной артерии у крыс: техника и методы морфофункциональной оценки / А.А. Карпов, Д.Ю. Ивкин, А.В. Драчева и др. // Биомедицина. – 2014. – Т.1, №3. – С. 50 – 66.
2. Karpov, A.A. The effect of bone marrow - and adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation on myocardial remodeling in the rat model of ischaemic heart failure / A.A. Karpov, Yu.K. Uspenskaya, S.M. Minasian et al. // International Journal of Experimental Pathology. – 2013. – V.94, №3 – P. 169 – 177.
3. Карпов, А.А. Модификация мезенхимальных стволовых клеток как способ повышения эффективности клеточной терапии ишемического повреждения миокарда / А.А. Карпов, А.В. Драчева, Д.В. Буслова и др. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2015. – Т. 101., № 9. – С. 985 – 998.

4. Karpov, A.A. Can the outcomes of mesenchymal stem cell-based therapy for myocardial infarction be improved? Providing weapons and armour to cells. / A.A. Karpov, D.V. Udalova, M.G. Pliss et al. // *Cell Proliferation*. – 2016. – V.50, №4.
5. Карпов, А.А. Микроинкапсулирование мезенхимных стволовых клеток как инструмент для изучения механизмов клеточной терапии при инфаркте миокарда / А.А. Карпов, М.В. Пузанов, Ф.Р. Альмухаметова и др. // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. – 2017. – Т. 16., № 2. – С. 75 – 82.
6. Эйвазова, Ш.Д. Подходы к морфометрической оценке ремоделирования сердца после инфаркта миокарда / Ш.Д. Эйвазова, А.А. Карпов, Д.В. Мухаметдинова и др. // *Трансляционная медицина*. – 2016. – Т.3, №6. – С. 62 – 72.
7. Карпов, А.А. Роль мезенхимных стволовых клеток в терапии ишемического повреждения сердца / А.А. Карпов, Ю.К. Успенская, Д.Д. Ваулина // *Бюллетень Федерального Центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова*. – 2012. – № 5. – С. 30 – 37.
8. Карпов, А.А. Исследование кардиопротективного действия мезенхимальных стволовых клеток на миокард крыс после ишемически-реперфузионного повреждения / С.М. Минасян, А.А. Билибина, А.А. Карпов и др. // материалы XVII межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» — 2011. – С. 107 – 109.
9. Карпов, А.А. Микроинкапсулирование мезенхимных стволовых клеток как безопасная стратегия модификации клеточной терапии инфаркта миокарда / А.А. Карпов, М.В. Пузанов, Ф.Р. Альмухаметова и др. // Тезисы XIX международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье» — 2016. – С. 256 – 257.
10. Karpov, A. Secretion of paracrine factors is the only mechanism of cardioprotection by mesenchymal stem cells in myocardial infarction: evidence from microencapsulation studies / A. Karpov, M. Puzanov, F. Almukhametova et al. // *European Heart Journal* — 2017. – Vol. 38. – e-Supplement 1 – P2556.

### Список сокращений

- ЖТ – жировая ткань  
 ЗСЛЖд – задняя стенка левого желудочка в диастолу  
 ИМ – инфаркт миокарда  
 ИФА – иммуноферментный анализ  
 инк.МСК – микроинкапсулированные мезенхимные стволовые клетки  
 КДД – конечное диастолическое давление  
 КДР – конечный диастолический размер  
 КМ – костный мозг  
 Контр.ИМ – Контрольный инфаркт  
 КСР – конечный систолический размер  
 ЛЖ – левый желудочек  
 ЛКА – левая коронарная артерия  
 ЛО – ложнооперированные животные  
 МЖП – межжелудочковая перегородка  
 МСК – мезенхимные стволовые клетки  
 МСК-КМ – мезенхимные стволовые клетки из костного мозга

МСК-ЖТ – мезенхимные стволовые клетки из жировой ткани  
нат.МСК – нативные мезенхимные стволовые клетки  
ПД – пульсовое давление  
ПСЛЖд – передняя стенка левого желудочка в диастолу  
ПТ – пароксизмальная тахикардия  
ФВ – фракция выброса  
ФЖ – фибрилляция желудочков  
ФУ – фракция укорочения  
ХСН – хроническая сердечная недостаточность  
ЭКГ – электрокардиография  
ЭС – экстрасистола  
ЭХО-КГ – эхокардиографическое исследование сердца  
BaCl<sub>2</sub> - хлорид бария  
CaCl<sub>2</sub> – хлорид кальция  
DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндолил дигидрохлорид  
TGF-β1 – трансформирующий фактор роста бета 1