

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр имени  
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

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

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Моисеева О.М., доктор медицинских наук

Галагудза М.М., доктор медицинских наук,  
член-корреспондент РАН

Санкт-Петербург - 2018

**Оглавление**

Введение .....	6
ГЛАВА 1. Обзор литературы .....	15
1.1. Общие свойства мезенхимных стволовых клеток .....	15
1.2. Предполагаемые механизмы действия мезенхимных стволовых клеток при трансплантации в миокард после ишемического повреждения .....	17
1.2.1. Эффекты биологически активных веществ, секретируемых мезенхимными стволовыми клетками .....	18
1.2.1.1. Неоваскуляризация .....	18
1.2.1.2. Антиапоптотический эффект.....	20
1.2.1.3. Противовоспалительный эффект .....	20
1.2.1.4. Воздействие на внеклеточный матрикс миокарда .....	21
1.2.1.5. Воздействие на метаболизм миокарда .....	22
1.2.2. Дифференцировка мезенхимных стволовых клеток в эндотелиоциты и гладкомышечные клетки сосудов .....	22
1.2.3. Дифференцировка мезенхимных стволовых клеток в кардиомиоциты .....	23
1.2.4. Воздействие на резидентные стволовые клетки сердца .....	25
1.3. Миграция мезенхимных стволовых клеток в зону ишемического повреждения.....	25
1.4. Ответ иммунной системы реципиента на трансплантацию мезенхимных стволовых клеток аллогенного и ксеногенного происхождения.....	26
1.5. Влияние мезенхимных стволовых клеток на морфофункциональные показатели сердца после инфаркта миокарда.....	27

1.6. Аритмогенез при интрамиокардиальной трансплантации мезенхимных стволовых клеток .....	35
1.7. Способы трансплантации мезенхимных стволовых клеток .....	36
1.8. Подходы к модификации мезенхимных стволовых клеток.....	37
1.9. Применение многоклеточных единиц трансплантации на основе мезенхимных стволовых клеток.....	39
1.9.1. Монослой, содержащие мезенхимные стволовые клетки .....	40
1.9.2. Сфероиды из мезенхимных стволовых клеток .....	41
1.9.3. Гидрогелевые каркасы.....	41
1.9.4. Капсулы, содержащие мезенхимные стволовые клетки.....	42
1.10. Клинические исследования, посвященные применению мезенхимных стволовых клеток для лечения ишемической болезни сердца .....	44
1.11. Заключение.....	45
ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования .....	47
2.1. Выделение и культивирование мезенхимных стволовых клеток из костного мозга и жировой ткани.....	47
2.2. Моделирование ишемического и ишемического-реперфузионного повреждения миокарда путем окклюзии левой коронарной артерии в хроническом эксперименте у крыс .....	48
2.3. Модель изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу...	49
2.4. Методика интрамиокардиальной трансплантации мезенхимных стволовых клеток в периинфарктную область .....	50
2.5. Трансторакальное эхокардиографическое исследование сердца .....	50
2.6. Телеметрическая регистрация электрокардиограммы.....	51

2.7. Гистологическая оценка размера рубца и ремоделирования миокарда .....	51
2.8. Микроинкапсулирование мезенхимных стволовых клеток в полупроницаемые капсулы из альгината натрия .....	53
2.9. Иммуноферментный анализ цитокинового профиля нативных и микроинкапсулированных мезенхимных стволовых клеток.....	54
2.10. Определение количества клеток в микрокапсуле с помощью конфокальной микроскопии .....	55
2.11. In vitro оценка стабильности микрокапсул.....	55
2.12. Определение уровня лейкоцитов периферической крови у крыс ....	55
2.13. Статистическая обработка полученных результатов.....	56
ГЛАВА 3. Результаты исследования .....	57
3.1. Выделение и культивирование мезенхимных стволовых клеток из костного мозга и жировой ткани.....	57
3.2. Сравнение эффектов интрамиокардиальной трансплантации мезенхимных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани на ремоделирование сердца после ишемического-реперфузионного повреждения миокарда .....	58
3.3. Обоснование оптимального протокола микроинкапсулирования мезенхимных стволовых клеток в полупроницаемую мембрану из альгината натрия с заданными параметрами биodeградации.....	66
3.4. Оценка эффекта микроинкапсулированных мезенхимных стволовых клеток на процесс постинфарктного ремоделирования сердца и изучение механизмов положительного влияния мезенхимных стволовых клеток на миокард при ишемическом повреждении .....	74
3.5. Оценка аритмогенной безопасности применения нативных и микроинкапсулированных мезенхимных стволовых клеток.....	82

ГЛАВА 4. Обсуждение результатов исследования .....	85
Выводы .....	92
Практические рекомендации.....	93
Список сокращений .....	94
Список литературы .....	97

## Введение

### Актуальность и степень разработанности темы исследования

Инфаркт миокарда (ИМ) и постинфарктная хроническая сердечная недостаточность (ХСН) - одна из основных проблем мирового здравоохранения (Ощепкова Е.В. и соавт., 2013; Бунова С.С. и соавт., 2014; Mozaffarian D. et al., 2015). При этом в России число случаев возникновения сердечно-сосудистых заболеваний и их вклад в смертность среди населения превышают соответствующие показатели в США (Шальнова С.А. и соавт., 2012).

Повреждение миокарда у пациентов с ишемией при отсутствии своевременной реваскуляризации носит необратимый характер и неуклонно приводит к развитию хронической сердечной недостаточности (Осипова О.А., 2006; Сергеева Л. и соавт., 2008; Alpert J.S. et al., 2000). В острейшем и остром периодах трансмурального ИМ основным подходом к лечению остается применение методик реваскуляризации, таких как коронароангиопластика (Терещенко С.Н. и соавт., 2010; Damman P. et al., 2016) и тромболитическая терапия (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., 2012). Кроме того, большинство современных терапевтических подходов для лечения ХСН способны лишь задержать прогрессирование данного заболевания (Bramucci E. et al., 2002; McMurray J.J. et al., 2005; Haack M.L. et al., 2012). На данный момент единственным радикальным вариантом лечения терминальной ХСН ишемического генеза является трансплантация сердца (Кривошеков Е.В., 2010). В то же время, несмотря на непрерывно возрастающее количество пациентов, находящихся в листе ожидания на проведение трансплантации сердца, статистика применения данного вмешательства в последние годы имеет тенденцию к стабилизации на определенном уровне (Gonzalez-Vilchez F. et al., 2015). Это связано как с дефицитом донорских сердец (Готье С.В. и соавт., 2009; Остроумов Е.Н. и соавт.,

2014), так и с наличием достаточно серьезных осложнений трансплантации, в первую очередь, возникновением кризов отторжения (Космачева Е.Д. и соавт., 2014; Шевченко А.О. и соавт., 2015). Совершенно очевидно, что в лечении подострого ИМ и ХСН ишемического генеза основным подходом могут и должны стать регенеративные технологии, нацеленные на воссоздание поврежденной ткани миокарда.

Поэтому актуальным остается поиск принципиально новых подходов к лечению ИМ, одним из которых является клеточная терапия (Маслов Л.Н. и соавт., 2013; Nunez Garcia A. et al., 2015). Клеточная терапия направлена на восстановление поврежденного миокарда путем доставки в него живых аутологичных или аллогенных стволовых клеток (Голухова Е.З. и соавт., 2007).

Благодаря легкой доступности для выделения, относительной иммунопривилегированности, мультипотентности, способности к хоумингу в поврежденную ткань, низкому риску аритмогенности и онкогенности среди стволовых и прогениторных клеток наибольший интерес представляют мезенхимные стволовые клетки (МСК) (Плотников Е.Ю. и соавт., 2009; 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 могут служить преимуществом жировой ткани как источника МСК перед 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. Раскрытие главенствующего 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 (Шевченко Е.К. и соавт., 2010; Samper E. et al., 2013). Одним из наиболее перспективных направлений в области модификации МСК может быть создание многоклеточных единиц трансплантации на основе стволовых клеток (Chen C.H. et al., 2006; Miyahara Y. 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 секретируемых 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.

## **Основные 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.

## **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 периинфарктную 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 биodeградации 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 работы**

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.

### **Степень достоверности результатов**

Результаты исследования получены на большой выборке экспериментальных животных (n=139). В работе использованы современные инструментальные, лабораторные методы исследования и применены статистические подходы, адекватные решению поставленных задач.

### **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.

### **Апробация результатов исследования**

Основные результаты диссертационного исследования представлены в виде докладов на научных конференциях и симпозиумах: XV межгородская конференция молодых ученых (Санкт-Петербург, 2009), 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.).

Часть исследований проводилась в рамках договора № 14.610.21.0001.1 от 06 октября 2014 г. на проведение соисполнителем прикладных научных

исследований и экспериментальных разработок между федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» и федеральным государственным бюджетным учреждением «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России по теме «Изучение безопасности и эффективности применения мезенхимных стволовых клеток костного мозга при сердечной недостаточности и разработка технологий предотвращения иммунного конфликта организма с трансплантируемыми клетками».

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.

### **Внедрение результатов исследования**

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».

### **Публикации**

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.

## **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.

## ГЛАВА 1. Обзор литературы

### 1.1. Общие свойства мезенхимных стволовых клеток

МСК – это мультипотентные стволовые клетки мезодермального происхождения, отвечающие следующим критериям (Dominici M. et al., 2006):

1. Адгезия выделенной культуры к пластику.
2. Экспрессия кластеров дифференцировки (CD)105, CD73, CD90.
3. Отсутствие экспрессии CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79, CD19 и A-DR.
4. Способность дифференцироваться в жировую, костную и хрящевую ткань.

Преимуществами МСК перед другими видами стволовых клеток, потенциально применимых для клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний, являются: легкая доступность для выделения, высокая скорость пролиферации, иммунопривилегированность, способность к хоумингу в поврежденную ткань, низкий риск аритмогенности и онкогенности.

На сегодняшний день основным источником для получения МСК является костный мозг (Калинина Н.И. и соавт., 2011), однако эти клетки присутствуют практически во всех тканях взрослого организма: жировой ткани (ЖТ) (Петренко А.Ю. и соавт., 2008; Zuk P.A. et al., 2001), коже (Toma J.G. et al., 2001), пульпе зуба (Волков А.В., 2005; Gronthos S. et al., 2000; Ducret M. et al., 2016), печени (Najimi M. et al., 2007), синовиальных оболочках (De Bari C. et al., 2001), скелетной мышце (Williams J.T. et al., 1999), легком (Lama V.N. et al., 2007), пуповинной крови (Берсенев А.В., 2006; Сухих Г.Т. и соавт., 2007; Park S.E. et al., 2016), амниотической жидкости (In 't Anker P.S. et al., 2003; Loukogeorgakis S.P. et al., 2016) и плаценте (Шаблий В.А. и соавт., 2012). Кроме того, источником МСК может служить периферическая кровь (Сухих Г.Т. и соавт., 2007; Шахпазян Н.К. и соавт., 2012).

Особого внимания в качестве материала для клеточной терапии заслуживают МСК-ЖТ взрослого организма. Легкая доступность для выделения, в сочетании с высоким содержанием стволовых клеток положительно отличают 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).

Однако, в последнее время проведен целый ряд исследований, посвященных сравнению культуральных, секреторных и дифференцировочных свойств МСК из КМ и ЖТ, которые обнаружили особенности этих популяций. В своей работе С.У. Li и соавт. (2015) отмечают ряд преимуществ МСК-ЖТ в отношении пролиферативной активности, иммуномодулирующего эффекта, а также секреции ряда факторов (фактора роста фибробластов (FGF), интерферона- $\gamma$  (ИНФ- $\gamma$ ) и инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1)). При этом МСК из КМ (МСК-КМ) показали лучшую способность к остеогенной и хондрогенной дифференцировке и более активно секретировали фактор стромальных клеток-1 (SDF-1) и гепатоцитарный фактор роста (HGF). По данным Р.И. Дмитриевой и соавт. (2012) на ранних пассажах (второй – четвертый) МСК-КМ и МСК-ЖТ были сравнимы по таким важным характеристикам, как скорость пролиферации и потенциал к дифференцировке, но существенно отличались по экспрессии CD146<sup>+</sup> ( $25 \pm 5$  % и  $7 \pm 3$  % для МСК-КМ и МСК-ЖТ, соответственно) и уровню секреции сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), SDF-1, моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP-1) и трансформирующего фактора роста- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1). Кроме того, уже на пассажах 3-4 МСК-КМ проявляли признаки репликативного старения, в то время как большинство МСК-ЖТ не проявляли данные признаки до 6–8 пассажа.

В ряде экспериментальных работ *in vivo* на модели ИМ трансплантация МСК-ЖТ приводила к улучшению морфофункциональных показателей сердца после инфаркта (Bagno L.L. et al., 2012; Otto Beitnes J. et al., 2012). При интракоронарном введении МСК-ЖТ по сравнению с контролем регистрировалось увеличение перфузии поврежденного участка миокарда, однако изменения в сократительной способности сердца, оцененные по фракции выброса (ФВ) левого желудочка (ЛЖ), выявлены не были (Lee H.W. et al., 2015). Учитывая противоречивость и разнородность имеющихся данных, выраженность

кардиопротективного действия МСК-ЖТ требует дальнейшего уточнения.

## **1.2. Предполагаемые механизмы действия мезенхимных стволовых клеток при трансплантации в миокард после ишемического повреждения**

Последние годы были отмечены бурным развитием методов клеточной терапии с использованием МСК. Удалось достичь заметных успехов в исследовании культуральных свойств МСК, а также было показано положительное действие МСК при трансплантации в миокард после ишемического повреждения (Hale S.L. et al., 2008). Несмотря на это, до сих пор нет единого подхода в интерпретации механизмов действия и эффективности МСК различного происхождения в процессе постинфарктного ремоделирования сердца (Давыденко В.В. и соавт., 2007; Peng L. et al., 2008). На сегодняшний день существует несколько основных теорий, объясняющих механизм действия МСК на сердце после ишемического повреждения:

1. Выработка МСК биологически активных веществ в зоне повреждения (Куртова А.В. и соавт., 2006; Mirotsoy M. et al., 2011; Ratajczak M.Z. et al., 2012).
2. Дифференцировка МСК в гладкомышечные клетки (ГМК) сосудов и эндотелиоциты (Кирик В.М. и соавт., 2010; Oswald J. et al., 2004; Silva G.V. et al., 2005).
3. Дифференцировка МСК в кардиомиоциты сократительного миокарда (Кругляков К.В. и соавт., 2006; Orlic D. et al., 2001; Toma C. et al., 2002).
4. Стимулирующее воздействие на резидентные стволовые клетки сердца (РСКС) (Конопляников М.А. и соавт., 2012; Mazhari R. et al., 2007; Natzistergos K.E. et al., 2010).

Роль каждого из перечисленных механизмов еще только предстоит уточнить (Gnecchi M. et al., 2008).

### **1.2.1. Эффекты биологически активных веществ, секретируемых мезенхимными стволовыми клетками**

Существует все больше доказательств в пользу гипотезы о том, что секретируемые МСК паракринные факторы, а именно, цитокины и факторы роста (ФР), играют важную роль в процессах репарации миокарда после ишемического повреждения (Хулуп Г.Я. и соавт., 2009; Gneschi M. et al., 2008).

МСК способны секретировать огромное разнообразие цитокинов и ФР (Сагарадзе Г.Д. и соавт., 2015). Среди этих молекул наиболее важными являются: VEGF (Михайличенко В.Ю. и соавт., 2015), FGF, IGF-1, TGF $\beta$  (Головкин А.С. и соавт., 2011), интерлейкин (ИЛ) - 6, HGF, ангиопоэтин - 1 (Ang-1), SDF и тромбоцитарный фактор роста (PDGF) (Uemura R. et al., 2006), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) (Haynesworth S.E. et al., 1996).

Опосредованные МСК паракринные эффекты на миокард многообразны и их можно подразделить на несколько основных групп (Gneschi M. et al., 2008; Mirotso M. et al., 2011; Wen Z. et al., 2011):

1. Неоваскуляризация, индуцированная паракринными факторами.
2. Антиапоптотический эффект.
3. Противовоспалительный эффект.
4. Воздействие на внеклеточный матрикс миокарда.
5. Воздействие на метаболизм миокарда.

#### **1.2.1.1. Неоваскуляризация**

Неоваскуляризация, опосредованная МСК и включающая в себя ангиогенез и артериогенез, имеет значительную роль в восстановлении поврежденного миокарда. Несмотря на доказательства того, что МСК-КМ способны встраиваться в сосудистые структуры, некоторые исследования показывают, что лишь небольшое количество сосудов миокарда содержат клетки донора. Тем не менее, МСК-КМ приводят к значительному увеличению плотности капилляров и

развитию коллатерального кровотока при их трансплантации в ишемизированную зону. Соответственно, предполагается, что возникающее проангиогенное и проартериогенное действие может быть опосредовано секрецией стволовыми клетками соответствующих цитокинов и ФР (Kinnaird T. et al., 2004). Исследования последних лет показали, что в условиях гипоксии МСК активно синтезируют проангиогенные и проартериогенные цитокины, такие как оксид азота, VEGF, FGF, IGF-1 (Nagaya N. et al., 2005; Yoon Y.S. et al., 2005). Эти секретлируемые молекулы способны стимулировать дифференцировку клеток-предшественников эндотелиоцитов в зрелые эндотелиоциты и ГМК (Gnecchi M. et al., 2008).

Y.L. Tang и соавт. (2005) продемонстрировали увеличение выраженности неоваскуляризации в модели ИМ на крысах после трансплантации аутологичных МСК. При этом отмечалось увеличение уровня проангиогенных факторов (FGF, VEGF, SDF-1) в миокарде животных подопытной группы. Усиление неоваскуляризации и, как следствие, улучшение перфузии ишемизированного миокарда было продемонстрировано в работе А.А. Матюкова и соавт. (2006) при аутооттрансплантации МСК. Интрамиокардиальное введение среды, в которой производилось культивирование МСК, животным с ишемическим повреждением сердца приводило к улучшению функциональных возможностей сердца, увеличению плотности капилляров и уменьшению размеров зоны ИМ (Iso Y. et al., 2007).

Неоваскуляризация, индуцированная паракринными факторами МСК, является комплексным процессом, опосредованным различными сигнальными путями. Так, например, молекулярные эффекты, опосредованные SDF-1, которые активируют эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS) (Tang J. et al., 2009), и эффекты HGF, опосредованные через сигнальный путь кальциневрина (Guo Y. et al., 2008), показали свою роль в неоваскуляризации миокарда после ишемии.

### 1.2.1.2. Антиапоптотический эффект

Накопленные данные свидетельствуют о том, что улучшение функциональных показателей сердца частично связано с ингибированием механизмов запуска апоптоза клеток миокарда цитокинами, секретируемыми трансплантированными МСК (Маслов Л.Н. и соавт., 2013). В частности, было показано снижение апоптоза и некроза в культуре кардиомиоцитов крысы в условиях гипоксии при воздействии на них среды, полученной при культивировании МСК в гипоксических условиях (Gnecchi M. et al., 2005).

В экспериментах *in vivo* трансплантация МСК, культивированных в гипоксических условиях, улучшала морфофункциональные показатели сердца после ИМ за счет увеличения уровня Bcl-2 и Bcl-xL, которые подавляют процессы клеточной гибели и апоптоза (Hu X. et al., 2008).

### 1.2.1.3. Противовоспалительный эффект

МСК способны реализовывать положительные эффекты на миокард, сохранивший жизнеспособность после ИМ, за счет регуляции уровня синтеза большого числа противовоспалительных и провоспалительных факторов. Становится все больше доказательств способности трансплантированных МСК уменьшать экспрессию таких провоспалительных цитокинов, как фактор некроза опухолей - альфа (ФНО- $\alpha$ ), ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6. С другой стороны, МСК стимулируют секрецию противовоспалительных субстанций: TGF- $\beta$ , простагландина E2, ИЛ-4, ИЛ-10, HGF, индоламин-2,3-диоксигеназы, монооксида азота, гемоксигеназы 1 (НО-1), растворимого фактора человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) - G5 (Сергеев В.С., 2005; Иванюк Д.И. и соавт., 2011; Рубцов Ю.П. и соавт., 2012; Wen Z. et al., 2011).

В экспериментах *in vitro* паракринное действие МСК на иммунные клетки было продемонстрировано при сокультивировании МСК и Т-лимфоцитов,

разделенных полупроницаемой мембраной (Di Nicola M. et al., 2002). При этом происходило подавление пролиферации Т-лимфоцитов.

Однако предположение о ключевой роли паракринных факторов в противовоспалительном действии МСК рядом авторов подвергается сомнению (Маянская И.В. и соавт., 2013).

#### **1.2.1.4. Воздействие на внеклеточный матрикс миокарда**

Постинфарктное ремоделирование левого желудочка представляет собой основную причину развития терминальной постинфарктной ХСН и смерти. Большинство экспериментов показали, что трансплантация МСК может влиять на ремоделирование внеклеточного матрикса посредством модуляции активности матриксных металлопротеиназ (ММР) и продукции эндогенного ингибитора ММР (ТИМР), а также усиления экспрессии антифибротических факторов, способствующих ослаблению ремоделирования сердца после инфаркта миокарда.

МСК способны напрямую воздействовать на фибробласты сердца, что было показано *in vitro* при добавлении культуральной среды МСК к культуре фибробластов сердца. При этом отмечалось увеличение экспрессии антипролиферативных генов: эластина и миокардина, а также снижение экспрессии генов коллагена I и III типов (Ohnishi S. et al., 2007).

В экспериментах *in vivo* (Berry M.F. et al., 2006; Mias C. et al., 2009) отмечалось уменьшение выраженности фиброза миокарда ЛЖ в постинфарктном периоде после интрамиокардиальной трансплантации МСК. В работе А.А. Матюкова и соавт. (2007) при интрамиокардиальной трансплантации МСК в модели ИМ на кроликах отмечалось значимое уменьшение индекса дилатации ЛЖ.

### **1.2.1.5. Воздействие на метаболизм миокарда**

Нарушения энергетического обмена миокарда могут приводить к прогрессирующему снижению насосной функции сердца. Нормализация метаболизма сердечной мышцы, преимущественно периинфарктной области, может служить еще одним возможным механизмом паракринного действия МСК на поврежденный миокард. Так, при интрамиокардиальной трансплантации МСК в периинфарктную область отмечалось увеличение соотношения фосфокреатина к аденозинтрифосфату (АТФ), что указывало на улучшение энергетического обмена в периинфарктной области (Feugin J. et al., 2007).

### **1.2.2. Дифференцировка мезенхимных стволовых клеток в эндотелиоциты и гладкомышечные клетки сосудов**

Ангиогенез является основной чертой растущей и функционально полноценной ткани. В то же время, сниженная диффузия кислорода и нутриентов в ткани служит помехой для жизнедеятельности и функциональной активности любой клетки (Carmeliet P. et al., 2000; Zandonella C., 2003). В этой связи образование новых сосудов путём неоангиогенеза является неотъемлемым процессом для восстановления сердечной мышцы после ИМ; при этом в периинфарктной зоне формируются новые сосуды капиллярного типа, обеспечивающие кровоснабжение ишемизированного миокарда (Чернявский А.М. и соавт., 2012; Шурыгин М.Г. и соавт., 2013; Tang J. et al., 2006).

В многочисленных экспериментальных работах, посвященных изучению кардиопротективного действия МСК на миокард после ишемического повреждения, было продемонстрировано значимое усиление ангиогенеза после проведения клеточной терапии (Кругляков П.В. и соавт., 2004; Arminan A. et al., 2010). Однако механизм этого феномена остается не до конца понятным и, кроме стимуляции ангиогенеза проангиогенными факторами, секретируемыми МСК, предполагается возможность направленной дифференцировки МСК в

эндотелиоциты и ГМК с последующим встраиванием этих клеток во вновь образующиеся сосуды. Например, в исследовании J. Oswald и соавт. (2004) была продемонстрирована способность взрослых МСК человека дифференцироваться *in vitro* в клетки, фенотипически и функционально сходные с эндотелиоцитами. В исследованиях *in vivo* получен ряд доказательств, что при трансплантации МСК в зону ИМ увеличивается экспрессия CD31, фактора Виллебранда и гладкомышечного  $\alpha$ -актина по сравнению с группой контрольного ИМ, что сопровождается увеличением плотности капилляров и приводит к увеличению функциональных показателей сердца (Jiang W. et al., 2006; Silva G.V. et al., 2005).

W. Dai и соавт. (2005) в своем исследовании продемонстрировали способность аллогенных МСК сохранять жизнеспособность в миокарде после ИМ в течение 6 месяцев и экспрессировать маркеры, характерные для гладкомышечного и эндотелиального фенотипа. Авторы также отмечали увеличение глобальной сократительной функции ЛЖ, однако этот эффект имел транзиторный характер и его появление связывали с ранним паракринным действием МСК.

Несмотря на эти доказательства, некоторые исследователи считают, что МСК не дифференцируются в эндотелиальные клетки и ГМК, а превращаются в перициты, которые стабилизируют структуру формирующихся новых сосудов (Loffredo F. et al., 2008). Учитывая все вышеприведенные данные, необходимо отметить, что в большинстве исследований на животных лишь ограниченное количество трансплантированных МСК проявляли фенотипические признаки эндотелиоцитов и ГМК, что ставит под сомнение ведущую роль прямой трансформации МСК в клетки сосудов в их проангиогенном действии.

### **1.2.3. Дифференцировка мезенхимных стволовых клеток в кардиомиоциты**

Способность к направленной дифференцировке МСК в клетки, фенотипически сходные с кардиомиоцитами, была показана в экспериментах *in vitro* с использованием 5-азациитидина в качестве химического стимула

кардиомиогенной дифференцировки (Космачёва С.М. и соавт., 2008). В работе S. Makino и соавт. (1999) сообщалось об изменении морфологии почти 30 % клеток с фибробластоподобной на палочкообразную форму, характерную для кардиомиоцитов, а также о появлении на поверхности этих клеток маркеров, свойственных фетальным кардиомиоцитам, а именно: фактора, стимулирующего миоциты (MEF) 2A и MEF 2D. С помощью электронной микроскопии в полученных клетках были выявлены саркомеры – структуры, являющиеся неотъемлемым элементом кардиомиоцитов. Важной находкой явилось обнаружение на поверхности клеток функционально компетентных М-холинорецепторов, а также  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторов (Nakuno D. et al., 2002).

Несмотря на вполне обнадеживающие данные, полученные *in vitro*, вопрос о способности МСК к направленной дифференцировке в кардиомиоциты в условиях ишемизированного миокарда *in vivo* до сих пор остается открытым (Pittenger M.F. et al., 2004; Noiseux N. et al., 2006). В ряде работ была показана способность незначительной части трансплантированных МСК экспрессировать тропонин Т и некоторые другие маркеры, характерные для кардиомиоцитов (Кругляков К.В. и соавт., 2006; Tang J. et al., 2006), что, впрочем, нельзя рассматривать как убедительные данные, свидетельствующие в пользу эффективной трансформации стволовых клеток в зрелые, функционально полноценные кардиомиоциты.

Высказывается предположение о способности к репрограммированию полностью дифференцированных взрослых кардиомиоцитов в состояние клеток-предшественников. Данный процесс, именуемый дедифференцировкой, может быть опосредован МСК (Cashman T.J. et al., 2013). Недавно А. Acquistapace и соавт. (2011) было показано, что совместное культивирование МСК человека разного происхождения со зрелыми кардиомиоцитами мыши приводит к репрограммированию кардиомиоцитов в состояние, подобное клеткам-предшественникам кардиомиоцитов. Было выявлено увеличение экспрессии маркеров, характерных для предшественников кардиомиоцитов (GATA-4, Nkx-2,5 и Mef-2C), а также маркера пролиферации Ki-67. Одновременно отмечалось

снижение уровня экспрессии маркеров зрелых кардиомиоцитов - десмина,  $\alpha$ -актина и тропонина I, что согласуется с возникновением процесса дедифференцировки кардиомиоцитов.

#### **1.2.4. Воздействие на резидентные стволовые клетки сердца**

Открытие РСКС коренным образом изменило традиционное представление о сердце человека, которое до этого представлялось как терминально дифференцированный постмитотический орган (Torella D. et al., 2007). Было обнаружено, что относительно редко встречающиеся РСКС не только обнаруживаются в сердце в кардиомиогенных клеточных нишах, но и обладают способностью дифференцироваться в клетки миокарда, замещая погибшие кардиомиоциты при патологических процессах (Leri A. et al., 2005). Однако, этот ответ не может компенсировать потерю кардиомиоцитов во время массивного необратимого повреждения миокарда, наступающего при ИМ.

Результаты последних исследований свидетельствуют о том, что МСК способны стимулировать РСКС (Mazhari R. et al., 2007; Hatzistergos K.E. et al., 2016). В экспериментах К.Е. Hatzistergos и соавт. (2010) отмечено, что введение МСК в сердце свиньи после ИМ приводило к 20-кратному увеличению числа эндогенных  $c\text{-kit}^+$  РСКС и шестикратному увеличению  $GATA-4^+$  РСКС, в сравнении с контрольными животными, не получавшими клеточной терапии.

#### **1.3. Миграция мезенхимных стволовых клеток в зону ишемического повреждения**

В течение первых 7 дней после ИМ наблюдается острый воспалительный процесс (Богова О.Т. и соавт., 2003; Чукаева И.И. и соавт., 2007; Frangogiannis N.G. et al., 2002), что сопровождается образованием в поврежденной ткани разнообразных медиаторов воспаления, цитокинов и ФР. Важнейшим компонентом воспаления является активация и миграция в поврежденный

миокард различных типов лейкоцитов, что способствует процессу заживления (Константинова Е.В. и соавт., 2010; Arslan F. et al., 2011). Основными факторами, влияющими на миграцию лейкоцитов в очаг воспаления, являются ИЛ-8, ИЛ-10, MCP-1, макрофагальный белок воспаления (MIP)-1 $\alpha$  и MIP-1 $\beta$ , HGF и SDF-1 (Nian M. et al., 2004; Nah D.Y. et al., 2009). Некоторые из активированных биологических факторов, такие как SDF-1 и HGF, также вовлечены в стимуляцию миграции МСК (Neuss S. et al., 2004). В свою очередь, МСК экспрессируют рецептор 4 типа к С-Х-С хемокину (CXCR4) и с-Met, которые являются рецепторами для SDF-1 и HGF, соответственно. В эксперименте обработка МСК провоспалительными цитокинами увеличивала адгезию и способность этих клеток к миграции (Kim Y.S. et al., 2009), указывая на способность МСК давать адаптивный ответ на воспалительные сигналы.

В начале процесса миграции в зону ИМ МСК сталкиваются с необходимостью преодоления эндотелиального барьера. В связи с этим на поверхности МСК был обнаружен ряд поверхностных молекул адгезии: молекула адгезии сосудистого эндотелия - 1 (VCAM-1),  $\beta$ -1 интегрин, очень поздний антиген - 4 (VLA-4), молекула межклеточной адгезии-1 (ICAM-1), ICAM-3, CD44 (Majumdar M.K. et al., 2003). Более того, МСК секретируют матриксные металлопротеиназы, такие как MMP-2, которые также облегчают проникновение в инфарктную зону (Steingen C. et al., 2008). На основе анализа проведенных исследований можно сделать вывод, что секреция VCAM-1, VLA-4,  $\beta$ 1 интегрин и MMP-2 играет ключевую роль в адгезии и эмиграции МСК (Segers V.F. et al., 2006; Steingen C. et al., 2008).

#### **1.4. Ответ иммунной системы реципиента на трансплантацию мезенхимных стволовых клеток аллогенного и ксеногенного происхождения**

В многочисленных исследованиях как *in vitro* в экспериментах по культивированию МСК с Т-лимфоцитами (Исайкина Я.И. и соавт., 2012; Di Nicola M. et al., 2002), так и *in vivo* с внутривенным введением МСК ксеногенного

происхождения (MacDonald D.J. et al., 2005) была показана иммунотолерантность к МСК.

Три основных механизма способствуют иммунопривилегированному профилю этих клеток. В первую очередь, МСК гипоиммуногенны, так как у них отсутствует экспрессия HLA II класса и ко-стимулирующих молекул. Во-вторых, было показано, что МСК косвенно предотвращают Т-клеточный ответ, как через модуляцию дендритных клеток, так и напрямую - через супрессию натуральных киллеров, а также функционирование CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В-третьих, МСК индуцируют супрессию локального микроокружения через продукцию простагландинов и интерлейкинов. Однако не все имеющиеся данные поддерживают сложившиеся представления об иммунопривилегированности МСК, что требует дополнительных экспериментальных исследований (Eliopoulos N. et al., 2005; Nauta A.J. et al., 2006).

### **1.5. Влияние мезенхимных стволовых клеток на морфофункциональные показатели сердца после инфаркта миокарда**

В Таблице 1 представлены экспериментальные исследования, посвященные изучению кардиорепаративного действия МСК на модели ИМ у крыс, проведенные в период с 2003 по 2017 г. При анализе проведенных работ обращает на себя внимание высокая вариабельность протокола эксперимента. В качестве основных путей введения использовались: интрамиокардиальный в зону рубца (Dai W. et al., 2005) и в периинфарктную область (Chen G. et al., 2016), внутривенный (Shalaby S.M. et al., 2016), в полость ЛЖ (Schenke-Layland K. et al., 2009). В работе S.L. Hale и соавт. (2008) проводилось прямое сравнение распределения МСК при внутривенном и интрамиокардиальном введении стволовых клеток. Согласно полученным данным, через 7 дней после интрамиокардиального введения лишь 15 % клеток остаются в месте введения, тогда как после внутривенного введения трансплантированные МСК в сердце не определялись. В работе T. Wang и соавт. (2009), где сравнивались такие способы

доставки МСК, как внутривенное введение, введение в полость ЛЖ и введение в область рубца, отмечался одинаковый кардиопротективный эффект МСК вне зависимости от способа введения.

Анализ литературы показал, что доза вводимых МСК варьирует в пределах от  $1 \times 10^5$  (Hu X. et al., 2007) до  $1 \times 10^8$  (Braga L.M. et al., 2008). Наиболее часто используемый диапазон доз укладывается в пределы от  $1 \times 10^6$  до  $5 \times 10^6$ . Время введения стволовых клеток по отношению к моменту индукции ишемии также весьма вариабельно и составляет от нескольких минут после начала ишемии (Nayan M. et al., 2011) до 3-4 недель после ИМ (Wang W. et al., 2011). Последний параметр имеет большое значение для трансляции полученных данных в клиническую практику, т.к. характеризует эффективность клеточной терапии, проведенной в разные этапы течения ИМ.

В качестве оценочных критериев эффективности кардиопротективного действия МСК использовали следующие методики: эхокардиография (Liu Y. et al., 2014), магнитно-резонансная томография (Chen X. et al., 2016), однофотонная эмиссионная компьютерная томография (de Moraes Sdel B. et al., 2015) катетеризация ЛЖ с построением петли давление – объем (Li Z. et al., 2009), гистологическое исследование с использованием традиционных красителей, в том числе специфичных к соединительной ткани (Sirius Red, трихром по Массону) (Li L. et al., 2014) и иммуногистохимическое исследование (Liu Y. et al., 2014). Основными оцениваемыми показателями были: объемные и линейные размеры ЛЖ (конечный диастолический размер (КДР), конечный систолический размер (КСР), конечный диастолический объем (КДО), конечный систолический объем (КСО)), ФВ, фракция укорочения (ФУ), конечное диастолическое давление (КДД), конечное систолическое давление (КСД), размер рубца, толщина рубца, толщина стенок ЛЖ вне рубцовой зоны, васкуляризация рубца и периинфарктной области.

Для определения механизмов действия МСК использовались следующие подходы: флуоресцентное маркирование стволовых клеток для определения их дальнейшей судьбы после трансплантации (Muller-Ehmsen J. et al., 2006),

определение маркеров дифференцировки в эндотелиоциты (CD31, фактор фон Виллебранда), кардиомиоциты (коннексин 43, тропонин I, тропонин T), ГМК ( $\alpha$ -актин) с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) (Rasmussen J.G. et al., 2014) и полимеразной цепной реакции в реальном времени (Chen X. et al., 2016).

В большинстве проведенных работ отмечалось значимое улучшение морфофункциональных показателей сердца при имплантации МСК после ИМ (Otto Beitnes J. et al., 2012; Li L. et al., 2014). Однако эффективность клеточной терапии в значительной степени варьировалась между исследованиями. Так, в работе J.G. Rasmussen и соавт. (2014) эффект был лимитирован только улучшением функциональных показателей сердца (увеличение ФВ), без прямого влияния на размер рубца. В другой работе W. Dai и соавт. (2005) указывали на кратковременность эффекта МСК и исчезновение положительного влияния стволовых клеток на ФВ к 6 месяцу по сравнению с контрольным ИМ.

Экспериментальные работы по прямому сравнению МСК из разных источников немногочисленны и характеризуются различным дизайном эксперимента, что не позволяет сделать точных выводов о преимуществах отдельных популяций МСК в целом. По данным A. Paul и соавт. (2013) применение человеческих МСК-ЖТ приводило к более значимому увеличению ФВ и уменьшению размера рубца по сравнению с применением МСК-КМ, что делает эту популяцию клеток перспективной для дальнейших исследований.

Таблица 1 – Экспериментальные исследования, посвященные применению МСК на модели ИМ у крыс  
за период с 2003 по 2017 г.

№	Происхождение МСК	Срок введения	Способ доставки	Доза	Эффекты	Предполагаемый механизм действия	Работа
1	Аллогенные МСК-КМ	2, 10–14 день	в полость ЛЖ / в/в	$4 \times 10^6$	большее число клеток задерживается в перинфарктной зоне по сравнению с в/в введением	-	Barbash I.M. et al., 2003
2	Аутологичные МСК-КМ	7 день	в зону инфаркта	$1 \times 10^7$	↑ васкуляризации рубца, ↑ ФВ	дифференцировка в эндотелиальные клетки, ↑ секреции VEGF	Tang Y.L. et al., 2004
3	Аллогенные МСК-КМ	3 часа	в/в	$5 \times 10^6$	↑ васкуляризации зоны инфаркта ↓ размера рубца, ↓ КДД, ↑ + dP/dt	ангиогенная, миогенная дифференцировка	Nagaya N. et al., 2004
4	Аллогенные МСК-КМ	12 часов, 1, 2, 4, 8 и 16 день	в/в	$5 \times 10^6$	↑ ФВ, ↑ ФУ, ↑ васкуляризации рубца в группе введения 1 день по сравнению с другими исследуемыми группами	максимальная миграция МСК в зону повреждения совпадает с пиком секреции SDF-1 через 1 день после ИМ	Ma J. et al., 2005
5	Аллогенные МСК-КМ	сразу после ИМ	в перинфарктную зону	$4 \times 10^6$	↓ размера рубца, ↑ компенсаторной гипертрофии	не выявлено ↑ неоваскуляризации, дифференцировки МСК в кардиомиоциты	Jaquet K. et al., 2005
6	Аутологичные МСК-КМ	7 день	в перинфарктную зону	$1 \times 10^7$	↑ васкуляризации рубца, ↑ ФВ	↑ экспрессии FGF, VEGF, SDF-1, ↓ экспрессии Вах в миокарде	Tang Y.L. et al., 2005
7	Аутологичные МСК-КМ	7 день	в зону рубца	$2 \times 10^6$	через 4 недели: ↑ФВ через 6 месяцев: исчезновение значимой разницы во ФВ функции ЛЖ по сравнению с контрольным ИМ	экспрессия маркеров кардиомиоцитов, эндотелиоцитов трансплантированными стволовыми клетками в течение первых 6 месяцев после ИМ	Dai W. et al., 2005
8	Аутологичные МСК-КМ	10 день	в область ИМ и перинфарктную зону	$3 \times 10^6$	↓ КДД, ↑ ФУ, ↑ васкуляризации рубца	экспрессия трансплантированными клетками α-актина и тропонина Т	Piao H. et al., 2005
9	Человеческие МСК-КМ	сразу после ИМ	в зону ИМ	$2 \times 10^6$	↓ фиброза ЛЖ, ↓ дилатации ЛЖ, ↑ толщины миокарда ЛЖ, ↑ систолической и диастолической функции ЛЖ	неполная трансдифференцировка МСК в кардиомиоциты	Berry M.F. et al., 2006
10	Человеческие МСК-КМ	сразу после ИМ / 3 день после ИМ	в перинфарктную зону	$1-2 \times 10^6$	нет различий по морфофункциональным показателям опытных групп с контролем	выжившие МСК дифференцируются в фибробласты, дифференцировки МСК в кардиомиоциты не обнаружено	Grinnemo K.H. et al., 2006
11	Аллогенные МСК-ЖТ	28 день	на поверхность ИМ	монослой $9,4 \pm 0,6 \times 10^5$	↑ толщины рубца, ↑ васкуляризации рубца, ↑ систолической функции ЛЖ	паракринная стимуляция ангиогенеза	Miyahara Y. et al., 2006
12	Аллогенные МСК-КМ	7 дней	в зону рубца	$1 \times 10^7$	↑ систолической функции ЛЖ, ↓ размера рубца, ↑ толщины стенки ЛЖ, ↑ васкуляризации рубца	экспрессия незначительным количеством трансплантированных клеток маркеров кардиомиоцитов; экспрессия маркеров ГМК, эндотелиоцитов	Tang J. et al., 2006
13	Человеческие МСК-КМ от пациентов с ИБС	14 день	в зону рубца	$2 \times 10^6$	↑ систолической функции ЛЖ, ↓ выраженности ремоделирования, ↑ васкуляризации рубца	отсутствие дифференцировки в кардиомиоциты, ↑ коллагенообразования, ↑ экспрессии коллагена I, III типа в зоне инфаркта, ↑ экспрессии SDF-1, VEGF	Hou M. et al., 2007
14	Аллогенные МСК-КМ	7 день	в зону рубца	$1 \times 10^5$ или $1 \times 10^6$	резкое ↓ количества МСК в зоне введения с течением времени (сразу после введения – 34 – 80 % от вводимой дозы, 0,3 - 3,5 % через 6 недель после введения)	-	Muller-Ehmsen J. et al., 2006
15	Аллогенные МСК-КМ	1 час / 7 день / 14	в зону ИМ	$1 \times 10^5$	↓ дилатации ЛЖ, ↓ размера рубца, ↑ систолической функции ЛЖ, максимальный кардиопротективный	↑ экспрессии тропонина Т	Hu X. et al., 2007

		день			эффект через 1 неделю после трансплантации МСК		
16	Аллогенные МСК-КМ	1 час	в зону ИМ	$1 \times 10^7$	↓ выраженности ремоделирования ЛЖ, ↑ систолической функции ЛЖ	↓ продукции провоспалительных цитокинов, ↓ отложения коллагена I и III типов, ↓ экспрессии MMP-1 и ↑ TIMP-1	Dai W. et al., 2007
17	Аллогенные МСК-КМ	7 день	в зону рубца	$2 \times 10^6$	↓ дилатации ЛЖ, ↑ систолической функции ЛЖ	инфильтрация зоны введения иммунными клетками, в зоне введения не обнаружены меченные МСК	Amsalem Y. et al., 2007
18	Аллогенные МСК-КМ	1 день	в/в	$1 \times 10^8$	↑ систолической функции ЛЖ, ↓ размера рубца, ↓ смертности	паракринная стимуляция микроокружения	Braga L.M. et al., 2008
19	Аллогенные МСК-КМ	21 день	в зону рубца	$1 \times 10^6$	отсутствие значимого влияния МСК на морфофункциональные показатели сердца	↑ экспрессии коннексина 43	Suuronen E.J. et al., 2007
20	Человеческие МСК из пульпы зуба	7 день	в зону рубца	$1,5 \times 10^6$	↑ систолической функции ЛЖ, ↓ размера рубца, ↑ васкуляризации рубца	не было выявлена дифференцировка МСК в ГМК, кардиомиоциты	Gandia C. et al., 2008
21	Аллогенные МСК от молодых (8–12 недель) и старых (24–26 месяцев) животных	сразу после ИМ	в зону ИМ	$2 \times 10^6$	↓ размера рубца в группе применения МСК от молодых животных, ↑ васкуляризации рубца во всех группах, где использовались МСК; более выраженное ↑ систолической функции ЛЖ в группе применения МСК от молодых животных	МСК от молодых животных проявляли морфологию подобную кардиомиоцитам; ↑ ангиогенный потенциал при применении МСК от молодых животных по сравнению с МСК от старых животных	Jiang S. et al., 2008
22	Человеческие МСК-КМ	28 день	в зону рубца	$1 \times 10^6$	↓ размера рубца, ↓ выраженности ремоделирования, ↓ систолической функции ЛЖ, ↑ васкуляризации рубца	экспрессия тропонина Т, стимуляция ангиогенеза	Liu J.F. et al., 2008
23	Аллогенные, сингенные МСК-КМ	15 минут	в зону ИМ	$5 \times 10^6$	тенденция к ↓ КСР в группах применения аллогенных, сингенных МСК, отсутствия влияния МСК на КДР, отсутствие значимых различий в систолической функции ЛЖ между аллогенными и сингенными МСК, ↑ ФВ по сравнению с контролем, ↑ васкуляризации рубца в группах применения аллогенных и сингенных МСК	↑ экспрессии VEGF в группах применения аллогенных, сингенных МСК; более значимое транзитное ↑ провоспалительных цитокинов в 1 день после ИМ в группе применения аллогенных МСК; стабилизация уровня провоспалительных цитокинов во всех исследуемых группах к 7 дню после ИМ	Imanishi Y. et al., 2008
24	Аллогенные МСК-ЖТ, МНК, кардиомиогенные клетки	28 день	в зону рубца	$1 \times 10^6$	↑ систолической функции ЛЖ, ↑ жизнеспособного миокарда, ↑ васкуляризации рубца, ↓ фиброза миокарда; более значительное влияние на васкуляризацию и фиброз миокарда по сравнению с применением кардиомиогенных и МНК	отсутствие экспрессии маркеров эндотелиоцитов и тропонина Т	Mazo M. et al., 2008
25	Аллогенные МСК-КМ	сразу после ИМ	в перинфарктную зону	$1 \times 10^7$	↑ систолической функции ЛЖ, ↓ ремоделирования ЛЖ, ↓ цитотоксичности лимфоцитов селезенки	↓ экспрессии ФНО-α и ИЛ-6 в миокарде, ↑ экспрессии ИЛ-10 в миокарде	Du Y.Y. et al., 2008
26	Аллогенные МСК-ЖТ	15 минут	в полость ЛЖ	$5 \times 10^6$	↓ дилатации ЛЖ, ↓ систолической функции ЛЖ, ↑ васкуляризации рубца, низкий уровень приживления стволовых клеток	проангиогенный эффект	Schenke-Layland K. et al., 2009
27	Аллогенные МСК-КМ	45 минут	в зону рубца / в/в	$2 \times 10^6$	через 7 дней после трансплантации: интрамиокардиальное введение – 15 % клеток остаются в месте введения; в/в введение - МСК не определялись	-	Hale S.L. et al., 2008
28	Аллогенные МСК-КМ	1 час / 7 день / 14 день	в перинфарктную зону	$2 \times 10^6$	наибольший ↑ ФВ ЛЖ, васкуляризации рубца в группе трансплантации МСК через 1 неделю	↓ апоптоза, ↑ экспрессии VEGF	Jiang C.Y. et al., 2008
29	Аллогенные МСК-КМ	1 месяц	в/в / в полость ЛЖ / в область рубца	$5 \times 10^6$	в не зависимости от способа введения МСК: ↑ систолическая функция ЛЖ, ↓ ремоделирования, ↑ выживаемостью животных после фибрилляции желудочков и последующей реанимации.	-	Wang T. et al., 2009
30	Аллогенные МСК-КМ	30 минут	в зону ИМ, в	$5 \times 10^5$	↑ оксигенации зоны рубца, ↑ ФВ, ФУ, ↑	↑ экспрессии VEGF	Chacko S.M. et al.,

			периинфарктную зону		васкуляризации рубца		2009
31	Аллогенные МСК-КМ	1 час	в периинфарктную зону	$1 \times 10^7$	↑ КСД, ↑ ФВ, ↑ васкуляризации рубца	редкая дифференцировка клеток в кардиомиоциты, эндотелиоциты; ↑ экспрессии VEGF и FGF	Li Z. et al., 2009
32	Аллогенные МСК-КМ	14 день	в зону рубца	$3 \times 10^6$	↓ коллагена в миокарде ЛЖ, ↓ размера рубца	↑ MMP-2, ↑ MMP-9, ↓ TIMP-2	Mias C. et al., 2009
33	Человеческие МСК-ЖТ	7 день	в зону рубца	$1 \times 10^6$	↑ ФВ, ↑ ФУ, ↑ толщины рубца, ↑ васкуляризации рубца	↑ тропонина Т, незначительное ↑ экспрессии коннексина 43	Hwangbo S. et al., 2010
34	Аллогенные МСК-КМ	7 дней	в/в	$5 \times 10^6$	при системном введении МСК мигрируют в зону повреждения	-	Assis A.C. et al., 2010
35	Аллогенные МСК-КМ	5 недель	в зону рубца	$1 \times 10^6$	↑ ФВ, ↓ размера рубца и ↑ васкуляризация рубца больше, чем мононуклеарные клетки КМ	↑ метаболизма в миокарде, ↑ ангиогенеза	Mazo M. et al., 2010
36	Человеческие МСК-КМ	7 день	в периинфарктную зону	$1,2 \times 10^6$	↑ ФВ, ↓ размера рубца, ремоделирования ЛЖ и ↑ васкуляризация рубца.	паракринная стимуляция	Arminan A. et al., 2010
37	Человеческие МСК-КМ от молодых (1–5 лет) и пожилых (50–70 лет) пациентов	сразу после ИМ	в зону рубца	$2 \times 10^6$	МСК от молодых пациентов лучше, чем от пожилых пациентов ↑ ФВ, ↑ ФУ, ↓ ремоделирование ЛЖ, ↑ васкуляризация рубца	↑ активности TIMP-3, ↓ MMP-2, MMP-9.	Fan M. et al., 2010
38	Человеческие МСК-КМ	7 день	в периинфарктную зону	$1 \times 10^6 / 5 \times 10^6$	↑ ФВ, ↓ ремоделирования ЛЖ. Эффект дозозависимый, однако, менее выражен, чем при применении кардиомиоцитоподобных клеток	↑ васкуляризации периинфарктной зоны (без точного указания механизма)	Shim W.S. et al., 2010
39	Аллогенные и сингенные МСК-КМ	21 день	в зону рубца	$3 \times 10^6$	через 3 месяца ↑ ФВ при применении и аллогенных и сингенных МСК, через 5 месяцев ↑ ФВ только у сингенных. ↑ толщины рубца при применении сингенных МСК через 6 месяцев	↓ выживаемости аллогенных клеток. Исчезновение аллогенных МСК через 5 недель после введения	Huang X.P. et al., 2010
40	Аллогенные МСК-КМ от молодых (6 недель), старых (54 недель) животных	10 мин	в периинфарктную зону	$3 \times 10^6$	↑ ФВ в ранние сроки (до 10 недели) в обеих опытных группах; отсутствие ↑ ФВ с 12 недели при применении МСК от старых животных.; более выраженное ↓ рубца при применении МСК от молодых животных	МСК от старых животных: ↓ жизнеспособности, потенциала к пролиферации и дифференцировке	Nayan M. et al., 2011
41	Аллогенные МСК-КМ	21 день	в/в	$5 \times 10^6$	Через 1 день: % удерживаемых клеток относительно исходного количества введенных МСК в сердце и легком составлял $0,54 \pm 0,19$ % и $51,69 \pm 12,96$ % соответственно. Через 4 недели: $0,24 \pm 0,09$ % и $0,22 \pm 0,17$ %. Не выявлено влияния МСК на морфофункциональные показатели сердца.	МСК не дифференцировались в альвеолярные эпителиальноподобные клетки легкого. Экспрессия ФНО-α, ИЛ-1, ИЛ-6 не изменялась	Wang W. et al., 2011
42	Аллогенные МСК-КМ	3 день	в периинфарктную зону	$1 \times 10^6$	↑ ФВ, ↓ размер рубца, ↓ ремоделирования ЛЖ, ↓ желудочковых тахикардий	↓ ФНО-α, ↓ ИЛ-1, ↓ апоптоза	Eun L.Y. et al., 2011
43	Аллогенные МСК-КМ	сразу после ИМ	в зону рубца	$5 \times 10^5$	↓ индуцибельность желудочковой аритмии, ↑ пороговой величины фибрилляции желудочков и эффективного рефрактерного периода миокарда ЛЖ	↓ интерстициальный фиброз, ↓ фокальную гетерогенность реполяризации	Wang D. et al., 2011
44	Человеческие МСК-ЖТ и МСК из скелетной мышцы	6 день	в периинфарктную зону	$3 \times 10^6$	↑ ФВ, ↓ размер рубца, ↑ васкуляризации рубца	отсутствие трансдифференцировки в кардиомиоциты, эндотелиальные клетки и ГМК	Otto Beitnes J. et al., 2012
45	Аллогенные МСК-ЖТ	28 день	периинфарктная зона	$2 \times 10^6$	↑ ФВ, ↓ размер рубца	-	Bagno L.L. et al., 2012
46	Аллогенные МСК-КМ	21 день	в периинфарктную зону / в зону	$3 \times 10^6$	↑ размер рубца, ↑ васкуляризации периинфарктной области, ↑ толщины рубца после трансплантацию в периинфарктную зону	↑ выживаемость, ↓ апоптоза МСК после трансплантацию в периинфарктную зону; через 4 недели экспрессия маркеров	Jin P. et al., 2012

			рубца			кардиомиоцитов незначительным количеством клеток	
47	Аллогенные МСК-КМ	14 день	в периинфарктную зону	$6 \times 10^6$	МСК не стимулировали желудочковый аритмии после ИМ, ↓ индуцибельность желудочковой аритмии	гибель практически всех МСК к 9 дню после трансплантации; незначительное количество МСК после трансплантации экспрессировали коннексин 43 и тропонин I	Wei F. et al., 2012
48	Аллогенные МСК-КМ	7 день	в зону рубца	$5 \times 10^6$	↑ ФВ, ↓ КДР	6 неделя после трансплантации: появление кариомиоцитоподобных клеток способных к сокращению	Wang T. et al., 2012
49	Аллогенные МСК вартонова студня, МСК-КМ	1-2 день	в/в	$3-10 \times 10^6$	↑ ФВ; различий в эффективности МСК нет	трансдифференцировка в кардиомиоцитоподобные клетки (in vitro)	Lopez Y. et al., 2013
50	Человеческие МСК от пациентов с ИБС и с/без сахарного диабета	сразу после ИМ	в зону рубца	$2 \times 10^6$	↓ пролиферативного потенциала МСК от пациентов ИБС + сахарный диабет; лучшие показатели ФВ после 4 недели при использовании МСК от пациентов с ИБС без сахарного диабета	↓ апоптоза при использовании МСК от пациентов без диабета	Liu Y. et al., 2013
51	Аллогенные МСК-КМ, РСКС	14 день	в зону рубца	$5 \times 10^6$	индуцибельность желудочковых аритмий была ↓ при применении РСКС по сравнению с МСК-КМ	МСК-КМ и РСКС были идентифицированы в зоне ИМ и в периинфарктной области; РСКС экспрессировали коннексин 43, фактор фон Виллебранда, α-гладкомышечный актин и α-саркоммерный актин; МСК-КМ экспрессировали фактор фон Виллебранда, α-гладкомышечный актин и α-саркоммерный актин in vivo	Zheng S.X. et al., 2013
52	Аллогенные МСК-КМ	21 день	в зону рубца и в периинфарктную зону	$3 \times 10^6$	↑ васкуляризация рубца, ↑ скорости проведения импульса по миокарду, ↓ эффективный рефрактерный период	↑ экспрессии гена Kir2.1 (субъединица калиевого канала)	Lai P.F. et al., 2013
53	Человеческие МСК из эпикардального жира, перикардального жира, подкожного жира, правого предсердия, КМ	7 день	в зону рубца	$4 \times 10^6$	↑ васкуляризация рубца максимальна при использовании МСК из предсердий; ↓ ФВ при использовании МСК из предсердий, эпикардального жира; минимальное влияние на ФВ – МСК из подкожной жировой клетчатки	воспаление максимально при использовании МСК из предсердия	Naftali-Shani N. et al., 2013
54	Человеческие МСК-КМ, МСК-ЖТ	10 минут	в периинфарктную зону	$3 \times 10^6$	большее ↑ ФВ через 6 недель после ИМ при применении МСК-ЖТ, более значимое ↓ размера рубца, ↑ толщины стенок ЛЖ при применении МСК-ЖТ	выживание МСК в периинфарктной зоне 6 недель после ИМ, ↑ уровня ИЛ-10, ↓ ФНО-α	Paul A. et al., 2013
55	Человеческие МСК-КМ от молодых и пожилых пациентов с ИБС	сразу после ИМ	в зону рубца и периинфарктную зону	$2 \times 10^6$	ФВ, ФУ ↓ при применении МСК от старых пациентов, чем от молодых	скорость пролиферации, экспрессия VEGF и Bcl-2 МСК от старых пациентов ↓, чем от молодых.	Liu Y. et al., 2014
56	Человеческие МСК-КМ, МСК-ЖТ от пожилых пациентов с ИБС	7 день	в зону рубца	$1 \times 10^6$	↑ ФВ, ↓ толщина рубца в группе МСК-ЖТ; нет влияния на размер рубца	МСК не влияли на неоангиогенез	Rasmussen J.G. et al., 2014
57	Аллогенные МСК-КМ	сразу после ИМ / сразу после + 7	в зону рубца	$1 \times 10^6 / 2 \times 10^6$	↑ ФВ, ↓ КДР, ↑ васкуляризации рубца более выражено в группе двойного введения МСК	паракринное действие МСК	Richardson J.D. et al., 2014

		день					
58	Аллогенные МСК сердца плода	7 день	в/в	$2 \times 10^6$	↑ ФВ, ↓ КДР, ↓ размер рубца	↑ экспрессия тропонина Т, CD 31, VEGF, FGF, IGF-1, HGF	Garikipati V.N. et al., 2014
59	Аллогенные МСК-КМ	3 день	в зону рубца	$1 \times 10^6$	↑ ФВ, ↓ КДР, ↓ число аритмий, ↓ индуцибельность аритмий	↑ количества калиевых каналов, ↑ внутриклеточного свободного кальция	Cai B. et al., 2014
60	Аллогенные МСК-ЖТ от молодых (8–10 нед.) и старых (18 мес.) крыс	сразу после ИМ	в зону рубца, перинфарктную зону	$2 \times 10^6$	наиболее значимое ↓ размера рубца, ↑ толщины рубца, ↑ ФВ, ↑ ФУ, ↓ КДД, ↑ васкуляризация рубца при применении МСК от молодых животных	↓ устойчивость к оксидативному стрессу, ↓ выживаемость трансплантированных клеток от старых животных	Li L. et al., 2014
61	Аллогенные МСК-КМ: нативные, нокаутные по генам c-kit / CXCR4	21 день	в/в	по $1 \times 10^6$ в течение 5 дней с/без предварительной механической ТР	ТР + нативные МСК ↑ ФВ. ТР + нокаутные - отсутствие влияния на ФВ	максимальное количество клеток в миокарде в группе: нативные МСК + ТР; ТР ↑ экспрессию SDF-1, c-kit, CXCR4.	Shahzad U. et al., 2015
62	Аллогенные МСК-КМ	7 день	в/в	$2 \times 10^6$	↓ выраженности дилатации, ↑ выраженности гипертрофии ЛЖ; МСК не влияли на артериальное давление, ФВ	↓ коллагена в миокарде, ↑ барорефлекторной чувствительности к бради- / тахикардии	de Moraes Sdel B. et al., 2015
63	Аллогенные МСК-КМ	7 день	в перинфарктную зону	$2 \times 10^6$	↑ ФВ, ↓ КДО, ↓ КСО, ↓ размер рубца, ↑ васкуляризации рубца	↓ апоптоз, ↓ фиброз перинфарктной области. Слабое удержание МСК в зоне введения: Через 2 недели - 1,2 %, через 4 недели - 0,1 % от введенного количества	Chen X. et al., 2016
64	Аллогенные МСК-КМ	сразу после ИМ	в/в	$1 \times 10^6$	↑ толщины рубцовой стенки, ↑ ФВ, ↑ ФУ	↑ экспрессии SERCA2a и PLBser16	Lavorato V.N. et al., 2016
65	Человеческие МСК и МНК из пуповинной крови	7 день	в перинфарктную зону	$2 \times 10^6$ МСК / $6 \times 10^5$ МНК / $1 \times 10^6$ МСК + $3 \times 10^5$ МНК	выраженность ↑ толщины рубцовой стенки, ↑ ФВ, ↑ ФУ, ↓ размер рубца: МСК+МНК > МСК > МНК	паракринный механизм действия	Chen G. et al., 2016
66	Человеческие МСК и CD34 <sup>+</sup> клетки из пуповинной крови	1 день, 7 день	в/в	$2 \times 10^6$	более значительное ↓ размера рубца при применении CD34 <sup>+</sup> по сравнению с МСК	более значительное ↑ экспрессии VEGF, Ang-1 при применении CD34 <sup>+</sup> по сравнению с МСК	Shalaby S.M. et al., 2016
67	Аллогенные МСК-КМ	сразу после ИМ	в зону рубца	$3 \times 10^6 + 5$ нг VEGF	↑ выживаемости	↑ экспрессии GATA-4, ↓ тропонина I	Pei Z. et al., 2017

Примечания: в/в – внутривенно, ГМК – гладкомышечные клетки, ЖТ – жировая ткань, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ИЛ – интерлейкин, ИМ – инфаркт миокарда, КДД – конечное диастолическое давление, КДО – конечный диастолический объем, КДР – конечный диастолический размер, КМ – костный мозг, КСД – конечное систолическое давление, КСО – конечный систолический объем, ЛЖ – левый желудочек, МНК – моноклеарные клетки, МСК – мезенхимные стволовые клетки, РСКС – резидентные стволовые клетки сердца, ТР – трансмиокардиальная ревазуляризация, ФВ – фракция выброса, ФНО-α – фактор некроза опухоли - альфа, ФУ – фракция укорочения, Ang-1 – ангиопоэтин-1/ангиопоэтин-1, CD – cluster of differentiation / кластер дифференцировки, CXCR4 – рецептор 4 типа к С-Х-С хемокину, + dP/dt – первая производная нарастания давления в ЛЖ, FGF – fibroblast growth factor / фактор роста фибробластов, HGF – hepatocyte growth factor / гепатоцитарный фактор роста, IGF – insulin-like growth factor / инсулиноподобный фактор роста, MMP – matrix metalloproteinase / матриксная металлопротеиназа, TIMP – tissue inhibitor of metalloproteinase / эндогенный ингибитор матриксной металлопротеиназы, SDF-1 – stromal cell-derived factor-1 / фактор стромальных клеток-1, VEGF – vascular endothelial growth factor / сосудистый эндотелиальный фактор роста

## **1.6. Аритмогенез при интрамиокардиальной трансплантации мезенхимных стволовых клеток**

Вопрос о связи трансплантации МСК с возникновением аритмий до сих пор остается спорным. E. Macía и P.A. Boyden (2009) сообщали о проаритмогенных свойствах клеточной терапии у пациентов с ишемией миокарда, рефрактерной к консервативной терапии. Противоположное мнение высказывалось в работе H.Q. Lu и S. Nattel (2009). Авторы указывали не только на отсутствие проаритмогенных свойств, но также на возможность антиаритмического действия МСК при определенных условиях. Трансплантация МСК может быть причиной аритмий в связи с возникающей гетерогенностью ткани между МСК и кардиомиоцитами, а также трансдифференцировкой в незрелые кардиомиоциты. M.G. Chang и соавт. (2006) выявили проаритмогенный потенциал трансплантированных МСК, сокультивированных *in vitro* в разных соотношениях с неонатальными кардиомиоцитами крысы. Они обнаружили, что скорость проведения снижалась при сокультивировании в сравнении с контролем. Аритмии при этом возникали в 86 % случаев сокультивирования в группах, содержащих 10 % и 20 % МСК и не возникали в контроле и в группе, содержащей только 1 % МСК. Этот феномен, вероятно, является результатом увеличения гетерогенности ткани в результате установления контактов между невозбудимыми МСК и кардиомиоцитами. В противоположность этим данным, некоторые клинические исследования показали, что трансплантация МСК является безопасной и не приводит к злокачественным аритмиям (Chen S.L. et al., 2004; Mohyeddin-Bonab M. et al., 2007). W.R. Mills и соавт. (2007) показали, что клеточная терапия МСК улучшает проведение импульса в перинфарктной зоне, при этом наблюдалась большая электрическая однородность проведения. МСК способствовали увеличению экспрессии белков межклеточных контактов, что, в свою очередь, приводило к снижению риска возникновения аритмий, по сравнению со скелетными миоцитами и физиологическим раствором.

## 1.7. Способы трансплантации мезенхимных стволовых клеток

На сегодняшний день существует несколько основных путей введения клеточных продуктов, в том числе МСК, с целью терапии ишемического повреждения сердца:

1. интрамиокардиальное (в зону инфаркта или в перинфарктную зону) (Levit R.D. et al., 2013);
2. интракоронарное (Эстрин С.И. и соавт., 2014; Mu D. et al., 2016);
3. в полость ЛЖ (Barbash I.M. et al., 2003; Wang T. et al., 2009);
4. внутривенное введение (Эстрин С.И., 2014; Garikipati V.N. et al., 2014).

Интрамиокардиальное введение имеет ряд существенных преимуществ, таких как высокая эффективность, локальное действие, небольшое количество используемых клеток и относительно низкий процент осложнений (Freymann T. et al., 2006). Более того, на сегодняшний день возможности применения интрамиокардиального введения стволовых клеток в доклинических исследованиях на крупных животных и в клинической практике расширяются благодаря появлению относительно малоинвазивных методик, например, установки для электромеханического картирования и трансэндокардиального прецизионного введения клеток (Chazaud V. et al., 2003; Vanovic M. et al., 2011). С другой стороны, интракоронарный и внутривенный пути введения все еще являются более доступными и простыми методиками.

Важные данные были получены при сравнении внутривенного и интракоронарного введения МСК в клиническом исследовании (Эстрин С.И., 2014) при лечении рефрактерной стенокардии. Данные проведенной работы показали отсутствие значимых различий двух исследуемых путей введения по улучшению качества жизни пациентов, повышению толерантности к физической нагрузке, повышению ФВ ЛЖ.

## 1.8. Подходы к модификации мезенхимных стволовых клеток

В последнее время проведено большое количество клинических исследований, использующих клеточную терапию МСК для лечения ИМ и ХСН. В результате была продемонстрирована высокая безопасность такого терапевтического подхода, однако его эффективность 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).

Важным фактором, ограничивающим эффективность терапии МСК, является низкая выживаемость трансплантированных в миокард клеток. Было установлено, что лишь около 3 % трансплантированных МСК сохраняют жизнеспособность к 14 дню после трансплантации (Freyman T. et al., 2006). По данным С. Тома и соавт. (2002), при инъекции меченых МСК в полость ЛЖ взрослых мышей, среднее содержание меченых стволовых клеток в миокарде на 4 день после инъекции составило всего 0,44 %. Столь интенсивный процесс гибели трансплантированных МСК объясняется рядом причин, действующих на всех этапах трансплантации (Robey T.E. et al., 2008).

На этапе подготовки суспензии МСК к инъекции часть клеток может гибнуть путем апоптоза, вызванного утратой контакта клетки с субстратом или другой клеткой (Michel J.B., 2003). Взаимодействие МСК с внеклеточным матриксом представляет собой физиологический процесс, играющий важную роль в дифференцировке, выживании и росте МСК. Адгезия клеток к внеклеточному матриксу преимущественно происходит за счет трансмембранных рецепторов интегринов, способных подавлять проапоптотические сигналы (Song H. et al., 2007), в то время как отрыв клетки от матрикса имеет противоположный эффект. Несомненно, потеря межклеточного взаимодействия и контакта с матриксом уже на первом этапе является значительным стрессом для стволовых клеток. На этапе трансплантации клеточную адгезию могут нарушать активные формы кислорода (АФК), что приводит к усилению программируемой клеточной гибели (Yao E.H. et al., 2006; Song H. et al., 2010). Несмотря на то, что малые

концентрации АФК непрерывно образуются в ходе аэробного метаболизма, их продукция в ишемизированном миокарде резко возрастает. АФК способны индуцировать воспалительный ответ, также нарушающий клеточную адгезию, что в конечном итоге приводит к гибели клеток (Pelegriin P. et al., 2009)

После трансплантации МСК в ишемизированный миокард они подвергаются воздействию многих неблагоприятных факторов, включающих гипоксию и дефицит нутриентов, воздействие цитотоксических веществ, АФК и провоспалительных цитокинов (Mylotte L.A. et al., 2008). Поскольку ИМ является следствием окклюзии одной или нескольких ветвей коронарных артерий, это состояние приводит к нарушению снабжения миокарда и трансплантированных в периинфарктную зону клеток питательными веществами и кислородом. Более того, необратимое ишемическое повреждение миокарда сопровождается выраженным воспалительным ответом, преимущественно включающим нейтрофильно-макрофагальную инфильтрацию ткани (Frangogiannis N.G., 2006). Клетки, участвующие в воспалении, такие как нейтрофилы, моноциты и макрофаги, продуцируют дополнительные количества АФК и провоспалительные цитокины, которые могут напрямую приводить к гибели трансплантированных клеток, а также инициировать в них сигнальные пути апоптоза (Chang W. et al., 2013). В то же время МСК, более чем другие кандидаты для клеточной терапии, могут быть эффективны при аллогенной трансплантации, поскольку, как известно, они обладают иммуносупрессивным и иммуномодулирующим действием (Di Nicola M. et al., 2002; MacDonald D.J. et al., 2005).

Таким образом, важной в практическом отношении задачей является повышение жизнеспособности МСК на всех этапах клеточной терапии инфаркта миокарда. Для решения этой задачи в последнее время предложены различные варианты модификации стволовых клеток с помощью направленной гиперэкспрессии определенных генов, а также воздействия химических и физических факторов (Шевченко Е.К. и соавт., 2010; Samper E. et al., 2013). Модификация МСК направлена не только на повышение выживаемости клеток в условиях ишемии/гипоксии, но и открывает перспективы контроля и

дополнительного усиления механизмов кардиопротективного действия МСК.

Цели модификации МСК состоят в следующем:

1. повышение выживаемости и пролиферации;
2. уменьшение вероятности отторжения;
3. стимуляция направленной дифференцировки;
4. усиление паракринного действия МСК.

Подходы к модификации МСК *ex vivo* включают:

1. генетическую модификацию;
2. прекондиционирование условиями среды;
3. прекондиционирование лекарственными препаратами, факторами роста и цитокинами;
4. создание многоклеточных единиц трансплантации на основе МСК.

Одним из наиболее современных и перспективных направлений в модификации МСК для транслирования в клиническую практику является создание многоклеточных единиц трансплантации. Этот подход характеризуется четкими доклиническими доказательствами терапевтического потенциала и отсутствием проблем с безопасностью его применения. К сожалению, в отечественной литературе исследуемый вопрос пока изучен недостаточно.

### **1.9. Применение многоклеточных единиц трансплантации на основе мезенхимных стволовых клеток**

Стандартная процедура подготовки МСК и их последующего интрамиокардиального введения характеризуется рядом недостатков. Во-первых, снятие МСК с поверхности культивирования с помощью трипсина или этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) может привести к частичной деградации внеклеточного матрикса и потере межклеточных контактов, тем самым предрасполагая клетки к апоптозу (Shimizu T. et al., 2003). Во-вторых, интрамиокардиальная инъекция суспензии клеток может сама по себе способствовать механическому повреждению и дезинтеграции МСК с

последующей утечкой клеточного препарата из канала доставки (Fukushima S. et al., 2007). В-третьих, в связи с тем, что МСК обычно вводят в несколько отдельных участков периинфарктной области, процедура может приводить к неоднородному распределению клеток.

Учитывая эти факты, рядом научных групп были созданы трехмерные многоклеточные единицы трансплантации, представляющие собой клеточные пласты различной структуры, где сохранены как межклеточные взаимодействия МСК, так и их связи с внеклеточным матриксом, что увеличивает жизнеспособность клеток и повышает их функциональную активность (Chen C.H. et al., 2006; Miyahara Y. et al., 2006). На основе имеющейся литературы может быть предложена следующая классификация многоклеточных единиц трансплантации МСК: (I) монослои, содержащие МСК, (II) сфероиды из МСК, (III) гидрогелевые каркасы с МСК (природные, синтетические и композитные) и (IV) микрокапсулы, содержащие МСК.

### **1.9.1. Монослои, содержащие мезенхимные стволовые клетки**

Первым исследованием в области использования монослоя, содержащего МСК для восстановления сердца после ИМ, стала работа Y. Miyahara и соавт. (2006). Посев МСК-ЖТ на термочувствительную подложку с последующим транзитным охлаждением до 20 °С приводили к спонтанному отслоению клеточного пласта от подложки. Аппликация клеточного пласта на эпикард через 4 недели после перевязки левой коронарной артерии у крыс приводила к уменьшению размера рубца, улучшению функции ЛЖ и увеличению выживаемости животных. Кардиопротективные эффекты фрагментов МСК слоя, выращенного на гидрогеле из метилцеллюлозы, после интрамиокардиальной трансплантации были выше по сравнению с традиционным введением одиночных нативных МСК в опытах на крысах (Wang C.C. et al., 2008) и свиньях (Huang C.C. et al., 2013) в модели ИМ. Применение монослоя МСК через 4 недели после ИМ у крыс приводило также к увеличению содержания протективных цитокинов:

IGF-1, SDF-1, фактор, индуцируемый гипоксией-1 альфа (HIF-1 $\alpha$ ) и VCAM-1 в зоне аппликации (Tano N. et al., 2014).

### **1.9.2. Сфероиды из мезенхимных стволовых клеток**

Сфероиды из МСК представляют собой еще одну форму многоклеточных МСК ассоциаций, не содержащих каких-либо дополнительных биоматериалов. E.J. Lee с соавт. (2012) описал сфероиды как 3D структуры пулевидной формы, состоящие из человеческих МСК пуповинной крови. Применение этих структур на 3 день после ИМ у крыс позволило значительно улучшить сократительную способность миокарда и предотвратить дилатацию ЛЖ.

При культивировании МСК-ЖТ крыс на сферической мембране из хитозана (Liu B.H. et al., 2013), в отсутствие внешней индукции, эти культуры клеток показали повышение экспрессии сердечных маркеров (Gata4, Nkx2-5, Myh6 и Tnnt2) более чем в 20 раз.

### **1.9.3. Гидрогелевые каркасы**

В последние 10 лет накоплена значительная информация об использовании каркасов из полимеров природного и синтетического происхождения для улучшения кардиопротективных свойств МСК. В 2008 г. H.J. Wei и соавт. (2008) показали, что локальное применение накладок, содержащих многослойно организованные МСК, приводило к улучшению функции ЛЖ и увеличению экспрессии ангиогенных факторов в сердце крысы после ИМ. Пришивание коллагенового каркаса, содержащего МСК, к эпикарду после ИМ, приводило к улучшению перфузии, уменьшению размера рубца, улучшению сократимости и снижению выраженности ремоделирования (Maureira P. et al., 2012). Имплантация каркасов на основе гиалуроновой кислоты, заселенных МСК в гетеротопически трансплантированное сердце после ИМ приводила к увеличению васкуляризации и уменьшению фиброза трансплантата (Fiumana E. et al., 2013).

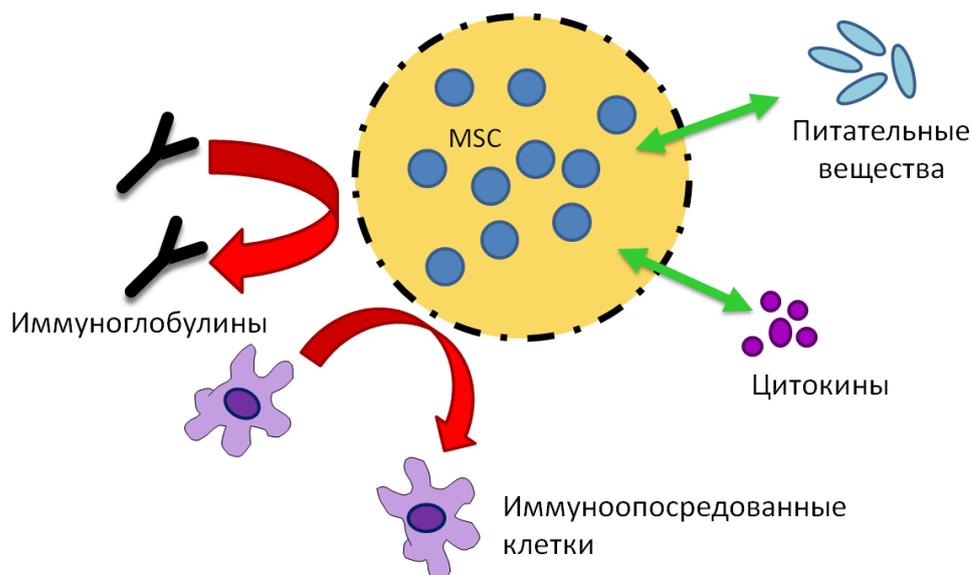
Множество различных типов синтетических каркасов, заселенных МСК, обеспечивали улучшение кардиопротективных свойств МСК по сравнению со свободными стволовыми клетками. Наиболее популярными материалами для создания каркасов являются: поли(лактид-ко-эпсилон-капролактон) (Jin J. et al., 2009), силанизированный гидрогель гидроксипропил метилцеллюлозы (Mathieu E. et al., 2012), полисахариды (Le Visage C. et al., 2012), пористый полиэтиленимин, смешанный с поли(D,L-лактат-ко-гликолевая кислотой) (Lee Y.S. et al., 2016), поли-(этиленгликоль)-бетта-поликапролактон-(додекандиовая кислота)-поликапролактон-поли (этиленгликоль) и альфа-циклодекстрин-гидрогель (Chen J. et al., 2014). Примерами композитных матриц для иммобилизации МСК являются: коллаген I типа – глюкозаминогликан (Xiang Z. et al., 2006), альгинат / хитозан (Ceccaldi C. et al., 2014), поли-(ε-капролактон) / желатин (Kai D. et al., 2014).

Когда эти многоклеточные структуры подшивали к эпикарду после перевязки коронарной артерии, они вызвали повышенную миграцию МСК в область ИМ, улучшение функции ЛЖ, а также уменьшение размеров рубца по сравнению с результатами для нативных МСК.

#### **1.9.4. Капсулы, содержащие мезенхимные стволовые клетки**

Многоклеточные единицы трансплантации, содержащие МСК, также могут быть получены с помощью микроинкапсулирования МСК. Данная стратегия предполагает заключение клеток в полупроницаемую мембрану из полимерного материала, через который свободно проходят газы, нутриенты и сигнальные молекулы, но не проникают антитела и клетки иммунной системы, что защищает микроинкапсулированные клетки от повреждения иммунной системой реципиента (de Vos P. et al., 2002) (Рисунок 1). Таким образом, МСК способны свободно выделять в окружающие ткани цитокины и факторы роста, стимулируя ангиогенез и подавляя апоптоз клеток ишемизированной ткани. Более того, эта стратегия позволяет увеличить безопасность клеточной терапии, снижая до

минимума риск развития опухолей и иммунных реакций на трансплантацию, а также миграцию стволовых клеток из зоны повреждения. Эффективность данной стратегии была показана на модели перманентного ишемического повреждения миокарда (Levit R.D. et al., 2013). Авторы отмечали увеличение васкуляризации периинфарктной зоны, уменьшение размера рубца и улучшение сократительной



функции ЛЖ.

Рисунок 1 – Принцип действия микрокапсул из полупроницаемого полимера, содержащих стволовые клетки

Еще одним примером удачного использования инкапсулированных клеток является работа E.J. Wright и соавт. (2012). В этом исследовании производилось инкапсулирование в двухслойную альгинатную капсулу генетически модифицированных МСК, гиперэкспрессирующих глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1). В экспериментах *in vivo* инкапсулированные клетки вводились интракоронарно на модели ИМ у свиней. Использование такой комбинированной модификации (генная модификация по GLP-1 и создание многоклеточных единиц трансплантации) значительно уменьшало размер инфаркта и увеличивало сократительную способность сердца по сравнению с контрольной группой.

В проведенных ранее работах инкапсулирование применяли для повышения выживания и задержки МСК в зоне введения с целью повышения эффективности

клеточной терапии. Однако микроинкапсулирование как подход может быть использовано для изучения механизма действия трансплантированных клеток благодаря способности предотвращать миграцию и встраивания этих клеток в ткани реципиента.

### **1.10. Клинические исследования, посвященные применению мезенхимных стволовых клеток для лечения ишемической болезни сердца**

В последние пять лет было выполнено большое количество клинических исследований, посвященных изучению эффективности и безопасности применения МСК для лечения различных форм ишемической болезни сердца (ИБС). Большая часть этих исследований достигла II фазы (Singh A. et al., 2016). Основное внимание в этих работах уделялось эффективности и безопасности МСК, сравнению путей доставки МСК, а также источникам получения стволовых клеток.

Анализ имеющихся данных показывает достаточную степень безопасности применения МСК различного происхождения. Однако положительное влияние клеточной терапии на морфофункциональные показатели сердца остается незначительным (de Jong R. et al., 2014; Liu B. et al., 2014; Afzal M.R. et al., 2015). По данным мета-анализа R. Li и соавт. (2016), включавшего в себя 1938 пациентов с острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST, прирост ФВ в долгосрочной перспективе при применении МСК составил 3,15 % ( $p < 0,05$ ). Кроме того, отмечалось уменьшение КДО, КСО, а также размера рубца на 2,22 % ( $p < 0,01$ ). Похожие данные были получены в мета-анализе B. Liu и соавт. (2014) – 262 включенных пациента с ИМ, в этом исследовании прирост ФВ составил 3,17 % ( $p = 0,02$ ). В мета-анализе Z. Wang (2017), включавшем в себя 449 пациентов с ИМ, исследовалось влияние времени введения и дозы МСК. Было показано, что при проведении клеточной терапии в течение первой недели прирост ФВ составлял 3,22 % ( $p < 0,05$ ). Напротив, при введении МСК после 7 дней от начала ИМ прирост ФВ отсутствовал. Кроме того, применение МСК в

дозе меньшей  $1 \times 10^7$  характеризовалось низкой эффективностью. Учитывая низкую эффективность терапии МСК, требуется дальнейшее изучение механизмов действия и путей модификации применяемых стволовых клеток.

### 1.11. Заключение

Имеется большое количество экспериментальных исследований, в которых показано наличие кардиорепаративного эффекта трансплантации МСК в перинфарктную зону. Однако в клинических исследованиях, несмотря на высокую безопасность, применение МСК оказало незначительное влияние на морфофункциональные показатели сердца после ИМ. Более того, дальнейшее развитие клеточной терапии МСК затрудняет ряд значительных биологических и технологических проблем, а именно, отсутствие четкого понимания основных механизмов кардиопротективного действия стволовых клеток на ишемизированный миокард и низкая выживаемость клеток после трансплантации. Без решения этих проблем не представляется возможным дальнейшее раскрытие потенциала регенераторной терапии миокарда и перехода клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний на принципиально новый клинический уровень.

Данные литературы свидетельствуют о том, что само наличие и выраженность кардиорепаративного действия МСК может зависеть от источника МСК. В частности, остается неясным, обладают ли защитным эффектом МСК-ЖТ, и как соотносится их эффект при сравнении с эффектом МСК-КМ. Кроме того, несомненный интерес вызывают и попытки модификации самих стволовых клеток с помощью генетических, биологических, а также физических воздействий. Это открывает перспективы контроля и модификации механизмов действия, повышения выживаемости клеток в условиях ишемии и создания принципиально новых кардиопротективных свойств МСК.

Перспективным подходом к предотвращению гибели МСК в неблагоприятных условиях перинфарктной зоны является помещение МСК в

полупроницаемую альгинатную микрокапсулу. В настоящей работе мы использовали инкапсулирование МСК не только для повышения их устойчивости к воздействию повреждающих факторов, но и как инструмент для выявления основного механизма кардиорепаративного действия МСК. А именно, полупроницаемая мембрана капсулы позволяла беспрепятственно проникать ФР, сигнальным молекулам, нутриентам и газам, что в полной мере обеспечивало реализацию паракринного механизма действия стволовых клеток, но, с другой стороны, препятствовала выходу клеток за пределы капсулы и их прямому взаимодействию с микроокружением, таким образом, предотвращая реализацию механизма трансдифференцировки и встраивания новых клеток в миокард. Сравнение нативных и микроинкапсулированных МСК позволит лучше понять роль секреции паракринных факторов в эффекте клеточной терапии.

## ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования

Эксперименты были проведены на 139 самцах крыс стока Wistar массой 250–300 г (питомник «Рапполово» РАН, г. Санкт-Петербург). Животные содержались в условиях 12/12-часового светового режима и получали стандартный корм и питьевую воду *ad libitum*. Все эксперименты проведены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (США).

### 2.1. Выделение и культивирование мезенхимных стволовых клеток из костного мозга и жировой ткани

КМ для выделения МСК получали из большеберцовых, бедренных и плечевых костей с помощью промывания полости диафиза указанных трубчатых костей фосфатным буфером. Для получения МСК-ЖТ использовалась окологпочечная 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. Неадгезированные гемопоэтические клетки удалялись. Смена культуральной среды производилась один 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.

## **2.2. 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 внутривенного введения хлоралгидрата (Acros Organics, США) в дозе 450 мг/кг. Искусственная вентиляция легких осуществлялась через интубацию трахеи с предварительной обработкой гортани 2 % раствором лидокаина с помощью аппарата искусственной вентиляции легких SAR – 830/AP (CWE Inc., США). Использовались следующие параметры искусственной вентиляции легких: частота дыхания – 60/мин., дыхательный объем – 3 мл/100 г массы тела. В ходе эксперимента животным выполнялось электрокардиографическое исследование (ЭКГ) с помощью стационарного компьютерного кардиографа высокого разрешения Кардиотехника-8 (ЗАО «Инкарт», Россия) в стандартных отведениях. Животное располагалось на термостатируемом операционном столике с обратной связью TCAT-2LV controller (Physitemp Instruments Inc., США) для поддержания постоянной температуры ядра тела на уровне  $37,0 \pm 1,0$  °С.

Производилось удаление шерсти на левой половине грудной клетки с помощью депиляционного крема. 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 с помощью викриловой шовной нити (Ethicon, 4-0, Германия). Шов на коже обрабатывался настойкой йода (5 %).

### **2.3. Модель изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу**

Животных наркотизировали путем внутрибрюшинного введения хлоралгидрата (Acros Organics, США) в дозе 450 мг/кг. 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, KН<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. pH 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, КДД ЛЖ, КСД ЛЖ и пульсовое давление (ПД) в ЛЖ, частоту сердечных сокращений. 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 PhysExp (ООО «Кардиопротект», Россия)

## **2.4. 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, 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.

## **2.5. Трансторакальное эхокардиографическое исследование сердца**

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 эхокардиографического исследования сердца (ЭХО-КГ) животных наркотизировали путем внутрибрюшинного введения хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг и размещали на подогреваемом столике в положении на спине, с левой половины грудной клетки удалялась шерсть с помощью депиляционного крема. При проведении исследования использовался В-режим (двумерное сканирование) для выполнения измерений и качественной оценки структурно-функциональных изменений сердца, М-режим (одномерное сканирование) для детальной оценки размеров, характера ремоделирования и

функции ЛЖ. Основными параметрами, оцениваемыми при исследовании, были: 1) толщина передней стенки ЛЖ в диастолу (ПСЛЖд, мм), 2) толщина задней стенки ЛЖ в диастолу (ЗСЛЖд, мм), 3) КДР ЛЖ (мм), 4) КСР ЛЖ (мм), 5) ФУ ЛЖ (%), рассчитанная по формуле  $[(\text{КДР} - \text{КСР}) / \text{КДР}] \times 100 \%$ .

## **2.6. Телеметрическая регистрация электрокардиограммы**

Для длительной регистрации ЭКГ использовалась телеметрическая установка (PowerLab, Австралия) с программным обеспечением LabChart (ADInstruments Ltd., 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. Затем производилось послойное ушивание раны. В качестве шовного материала использовался викрил 4-0 (Ethicon, Германия). Через семь дней адаптации животным производилась интрамиокардиальная трансплантация стволовых клеток по протоколу, описанному выше, 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).

## **2.7. Гистологическая оценка размера рубца и ремоделирования миокарда**

Через 28 дней после перевязки ЛКА животных повторно наркотизировали, производилось вскрытие грудной клетки широким чрездиафрагмальным билатеральным доступом и введение в полость левого предсердия 10 % раствора

хлорида калия до полной остановки сердечной деятельности в фазе диастолы. Сердце извлекалось из полости перикарда, промывалось физиологическим раствором для удаления крови в камерах. Фиксация проводилась в растворе забуференного 10 % формалина в течение 24 часов. После фиксации материал промывался в течение 2–3 часов в проточной воде для удаления излишков фиксирующей жидкости. Далее проводилась вырезка образцов сердца: полость ЛЖ поперечно ниже лигатуры разделялась на три равные части толщиной 4–6 мм, после чего проводилось обезвоживание и уплотнение при помощи проведения тканевых образцов через спирты восходящей концентрации от 60 % до абсолютного спирта. На этапе пропитывания и заливки в парафин обезвоженные и уплотненные образцы перекладывались из абсолютного спирта в смесь О-ксилола и абсолютного спирта (1:1) на 2–3 ч, а затем в две-три порции чистого О-ксилола, после чего материал пропитывался парафином. Для этого образцы помещали в термостат первоначально в смесь из равных частей парафина и О-ксилола при температуре 37 °С в течение 3–6 ч, а затем в две-три порции чистого парафина, расплавленного при температуре 56 °С. После окончательного пропитывания объекта его заливали расплавленным парафином. На микротоме Accu-Cut SRM 200 (Sakura, Япония) изготавливали срезы толщиной 5 мкм и помещали в термостат при температуре 37 °С на 12 часов. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином-эозином и Picro Sirius Red (abcam, США) для выявления соединительной ткани. Перед окраской срезы депарафинировали О-ксилолом, потом О-ксилол удаляли при помощи проведения по спиртам нисходящей концентрации от абсолютного до 60 % и промывали водой, после чего на препарат наносили раствор красителя. Окрашенные и промытые в воде срезы во избежание помутнения обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (от 60° до абсолютного), осветляли в О-ксилоле, а затем на предметное стекло, где находился срез, помещали каплю канадского бальзама и срез накрывали покровным стеклом.

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, Россия). В качестве оценочных критериев рубца и ремоделирования ЛЖ использовали: толщину рубцовой/передней стенки левого желудочка (мм), толщину 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).

## **2.8. 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 обеспечивали 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). Для этого 15 мкл исследуемого раствора отбиралось в пробирку объемом 0,5 мл, в которую помещали датчик, после чего штатив с пробиркой опускали в

морозильную часть прибора. После проведения измерения полученные данные распечатывались на встроенном принтере.

Жизнеспособность клеток *in vitro* оценивалась через 30 минут, 5 и 21 день после микроинкапсулирования с помощью витального красителя LIVE/DEAD Kit (Life Technologies, США), содержащего кальцеин АМ (краситель, специфичный к жизнеспособным клеткам; зеленый цвет свечения) и этидиум гомодимер-1 (краситель, специфичный к погибшим клеткам; красный цвет свечения). Для окрашивания микроинкапсулированных и нативных МСК на первом этапе производилось смешивание раствора кальцеина АМ в концентрации 4 мкмоль/л с раствором этидиума гомодимера-1 в концентрации 4 мкмоль/л в соотношении 1:2, соответственно. 100–150 мкл полученного раствора добавляли к суспензии клеток или микрокапсул, содержащихся в чашке Петри диаметром 35 мм. Инкубирование при комнатной температуре проводилось в течение 30 - 45 минут. Оценка жизнеспособности клеток производилась с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss AxioVert (Carl Zeiss, Германия) с оптическими фильтрами 485 нм и 530 нм.

## **2.9. Иммуноферментный анализ цитокинового профиля нативных и микроинкапсулированных мезенхимных стволовых клеток**

Для оценки *in vitro* секреторной активности нативных и микроинкапсулированных МСК-КМ использовался набор для количественного определения уровня TGF- $\beta$ 1 методом ИФА (TGF- $\beta$ 1 Rat ELISA Kit, Life Technologies, США). TGF- $\beta$ 1 – белковая молекула массой 25 килодальтон, активно синтезируемая МСК (Головкин А.С. и соавт., 2011) и участвующая в формировании постинфарктного рубца. Указанные свойства TGF- $\beta$ 1 позволили использовать эту молекулу для оценки проницаемости микрокапсулы. Определение концентрации TGF- $\beta$ 1 производилось в культуральной среде на 5 день после инкапсуляции. Анализ полученных результатов производился с помощью спектрофотометра Model 680 (Bio-Rad, США).

## **2.10. 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-фенилиндолил дигидрохлорид).

## **2.11. 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 в каждой временной точке. Размер, четкость края и визуальную плотность определяли с помощью светового микроскопа AxioStar plus (Carl Zeiss, Германия) при увеличении  $\times 40$  и  $\times 100$ .

## **2.12. Определение уровня лейкоцитов периферической крови у крыс**

Для определения уровня лейкоцитов периферической крови, кровь забиралась из ретроорбитального венозного сплетения. Для этого животное наркотизировали (внутрибрюшинное введение хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг), с помощью пастеровской микропипетки с заостренным концом проникали через конъюнктиву внутреннего угла глаза и проводили на глубину 2 мм за глазное яблоко, прокалывая венозное сплетение. Объем забираемой крови – 200–300 мкл. Анализ образцов производился с помощью автоматического ветеринарного гематологического анализатора Abacus Junior 5 (Vet) (Diatron, Венгрия).

### 2.13. Статистическая обработка полученных результатов

Анализ данных производился с помощью статистического пакета Statistica 7.0 (StatSoft; США). Первичный анализ различий данных в экспериментальных 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".

## ГЛАВА 3. Результаты исследования

### 3.1. Выделение и культивирование мезенхимных стволовых клеток из костного мозга и жировой ткани

Первичные культуры МСК-КМ и МСК-ЖТ крыс были получены и охарактеризованы. Клетки имели характерные морфологические признаки МСК и демонстрировали высокую скорость пролиферации. Проточная цитометрия подтвердила характерный иммунофенотип для популяций МСК-КМ и МСК-ЖТ (CD 45<sup>-</sup> / CD 90<sup>+</sup>) (Рисунок 2). 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 (Рисунок 3).

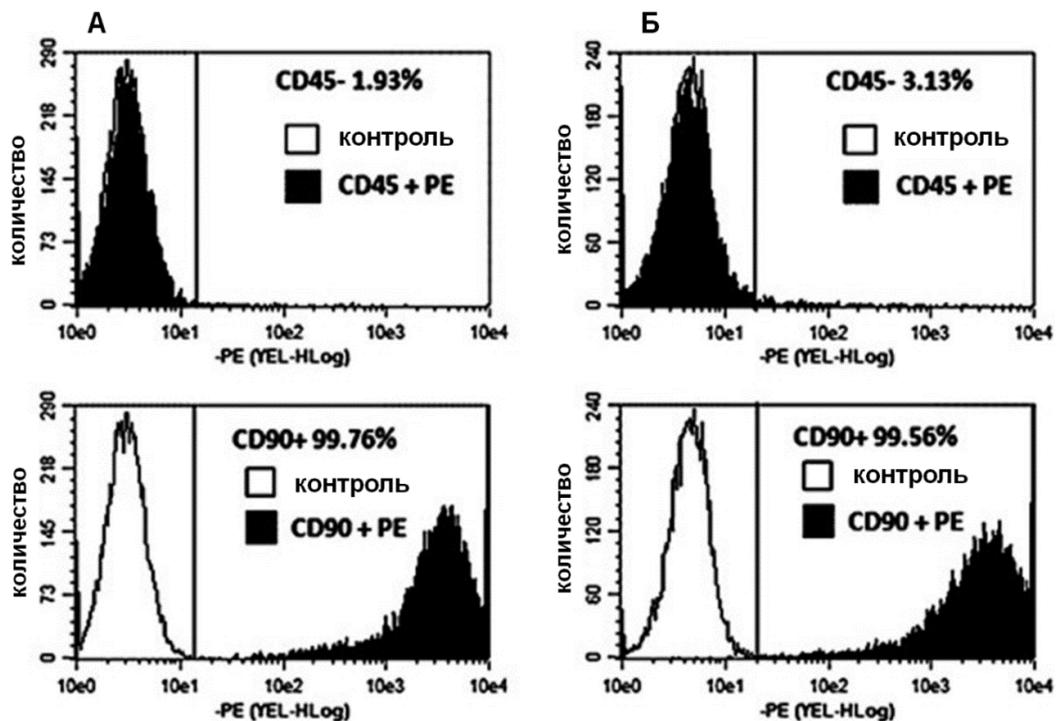


Рисунок 2 – Анализ экспрессии CD45, CD90 МСК-КМ (А) и МСК-ЖТ (Б) с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией

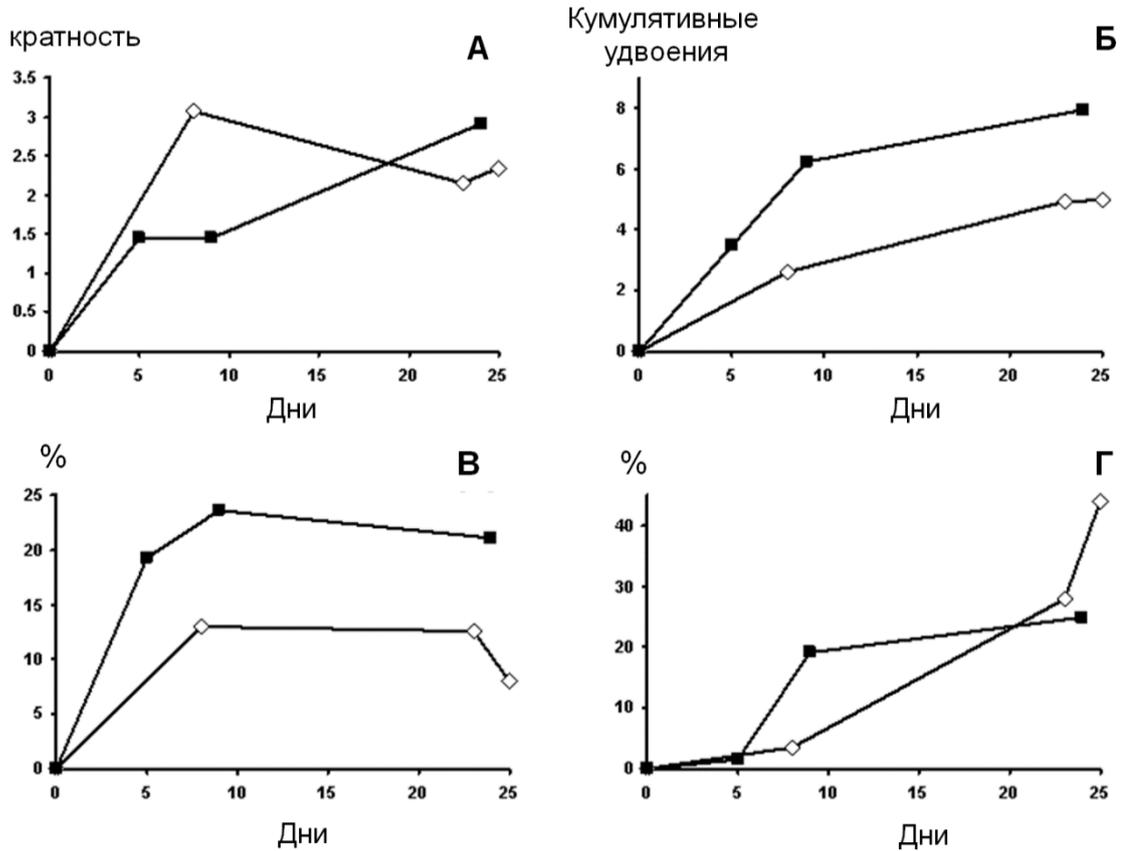


Рисунок 3 – Проплиферация (А-В) и репликативное старение (Г) МСК-КМ (◇) и МСК-ЖТ (■) крысы. А – время удвоения популяции; Б – кумулятивные удвоения популяции; В – колониеобразующие единицы в культуре (CFU-F); Г –  $\beta$ -галактозидаза-положительные клетки

### 3.2. Сравнение эффектов интрамиокардиальной трансплантации мезенхимных стволовых клеток 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 с длительностью периода ишемии 40 минут. Через 7 дней все животные случайным образом были разделены на 4 группы (Рисунок 4):

1. Ложнооперированные животные (ЛО,  $n = 15$ ) – крысы, которым на первом этапе производилась ложная операция (не подвергшиеся ишемическому-реперфузионному повреждению); в область миокарда, соответствующую периинфарктной, вводился фосфатный буфер (PBS).
2. ИМ ( $n = 20$ ) – крысы после ишемического-реперфузионного повреждения, выполненного на первом этапе; в периинфарктную область вводился фосфатный буфер.
3. МСК-КМ ( $n = 17$ ) – в периинфарктную область вводились МСК КМ.
4. МСК-ЖТ ( $n = 14$ ) – в периинфарктную область вводились МСК ЖТ.

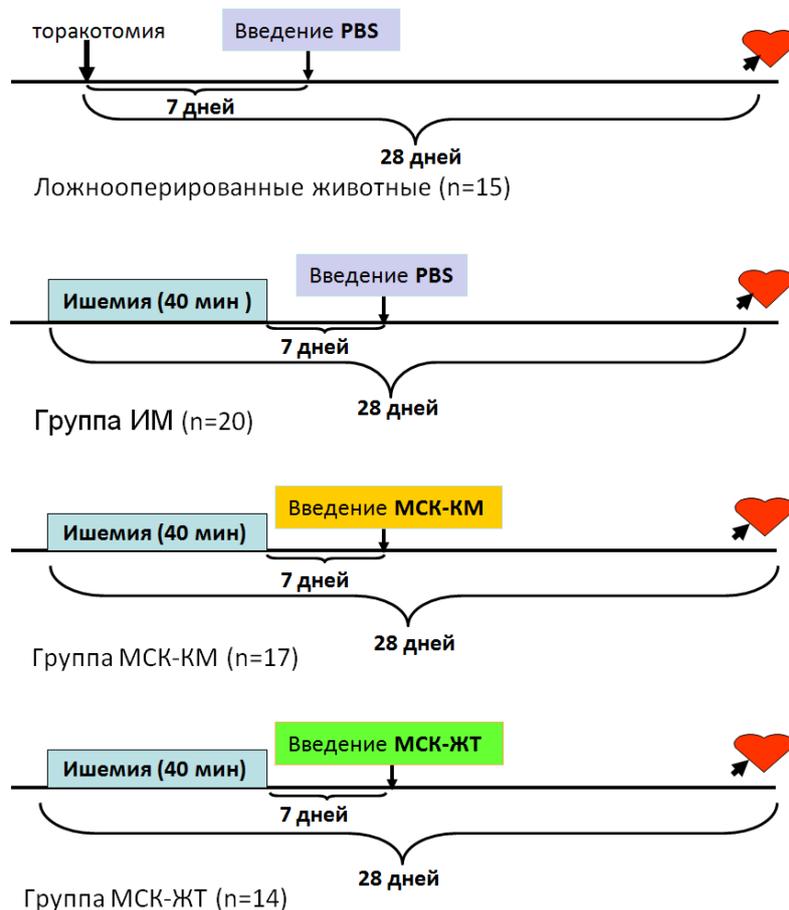


Рисунок 4 – Протокол эксперимента по сравнению эффектов интрамиокардиальной трансплантации МСК костного мозга и жировой ткани на ремоделирование сердца после ишемического-реперфузионного повреждения миокарда

Препараты (МСК в количестве  $1 \times 10^6$  в PBS, объем 0,1 мл) в группах МСК-КМ, МСК-ЖТ либо PBS в группе ЛО и в группе ИМ вводились 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. Через 14 дней после трансплантации МСК производили оценку функционального состояния ЛЖ на модели изолированного, перфузируемого по Лангендорфу сердца. Изолированные сердца подвергали глобальной ишемии с реперфузией с целью анализа возможных эффектов трансплантации МСК на функциональные параметры не только в исходном состоянии, но и в периоде ишемии и постишемической реперфузии. С использованием модели изолированного сердца было показано, что исходное КДД, ПД в ЛЖ и коронарный поток во всех исследуемых группах значимо не отличались (Рисунок 5 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., ИМ –  $54 \pm 23$  мм рт. ст., ЛО –  $82 \pm 10$  мм рт. ст. Таким образом, давление в ЛЖ на 20 минуте в группах МСК-КМ и ЛО значимо различалось по сравнению с показателями давления в группах МСК-ЖТ и ИМ ( $p < 0,05$ ). Различий между МСК-КМ и ЛО не было выявлено (Рисунок 5 Г), (Таблица 2). Различий в значениях КДД ЛЖ (Таблица 3), ПД ЛЖ (Таблица 4) и коронарного потока (Таблица 5) во всех регистрируемых точках между группами получено не было.

Таблица 2 – Показатели среднего давления в левом желудочка в течение 30 минут глобальной ишемии (мм рт. ст.) по данным модели изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу

Время	ЛО	ИМ	МСК-КМ	МСК-ЖТ
5 мин.	7,4 ± 2,8	8,3 ± 4,9	12,3 ± 5,6	11,6 ± 7,0
10 мин.	13,9 ± 8,7	11,7 ± 6,5	18,2 ± 8,3	25,9 ± 15,0
15 мин.	53,8 ± 17,0*	25,3 ± 19,3	35,0 ± 23,3	24,3 ± 11,9
20 мин.	85,1 ± 12,3*	54,3 ± 23,5	79,3 ± 16,9*#	58,0 ± 28,9
25 мин.	73,4 ± 12,1	53,6 ± 21,5	73,0 ± 9,3	61,0 ± 25,0
30 мин.	64,8 ± 12,1	53,0 ± 21,7	67,6 ± 10,1	57,3 ± 23,2

\* –  $p < 0,05$  при сравнении с группой ИМ; # –  $p < 0,05$  при попарном сравнении групп МСК-КМ и МСК-ЖТ (критерий Краскела-Уоллиса).

Таблица 3 – Показатели конечного диастолического давления в левом желудочке (мм рт. ст.) по данным модели изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу

Время	ЛО	ИМ	МСК-КМ	МСК-ЖТ
Исходн.	6,48 ± 1,9	6,8 ± 4,2	6,4 ± 3,8	9,5 ± 2,9
Реперфузия				
10 мин.	78,3 ± 13,1	97,7 ± 35,4	107,7 ± 23,3	94,7 ± 30,4
20 мин.	62,1 ± 17,9	82,1 ± 32,0	90,2 ± 26,3	79,1 ± 29,3

30 мин.	54,9 ± 18,3	74,2 ± 30,6	82,9 ± 25,3	71,6 ± 28,3
60 мин.	48,8 ± 14,8	63,2 ± 27,4	75,7 ± 22,3	64,6 ± 25,3
90 мин.	50,5 ± 14,2	60,0 ± 27,0	73,2 ± 21,9	66,4 ± 22,6
120 мин.	49,7 ± 15,2	53,6 ± 21,8	70,6 ± 23,2	65,6 ± 22,3

Таблица 4 – Показатели пульсового давления в левом желудочке (мм рт. ст.) по данным модели изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу

Время	ЛО	ИМ	МСК-КМ	МСК-ЖТ
Исходн.	155,1 ± 19	135,3 ± 37,7	143,8 ± 27,2	128,7 ± 36
Реперфузия				
10 мин.	18 ± 10	24,9 ± 29,8	29,2 ± 37	27,3 ± 16,7
20 мин.	37,6 ± 30,7	34,5 ± 37,5	41,5 ± 35,4	42,5 ± 24,9
30 мин.	52,9 ± 30,6	40,4 ± 35,4	38,4 ± 31,9	53,5 ± 27,3
60 мин.	67,9 ± 20,5	38,6 ± 25,7	36,4 ± 20	56 ± 19,1
90 мин.	58,5 ± 18,6	32,1 ± 24,9	30,2 ± 15,9	51 ± 15,2
120 мин.	51 ± 15,7	31,1 ± 23,7	24,9 ± 15,9	44,4 ± 16,6

Таблица 5 – Показатели коронарного кровотока в левом желудочке (мл/мин.) по данным модели изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу

Время	ЛО	ИМ	МСК-КМ	МСК-ЖТ
Исходн.	8,3 ± 1,6	10,3 ± 4,4	10,3 ± 4,7	12,6 ± 4
Реперфузия				
10 мин.	6,7 ± 2,3	6,1 ± 3,8	6,3 ± 3,9	8,6 ± 3,1
20 мин.	5,4 ± 1,4	5,1 ± 3,1	5,1 ± 2,6	7,8 ± 2,3
30 мин.	5,7 ± 1,4	4,7 ± 3,1	4,5 ± 2,1	6,7 ± 2
60 мин.	5,1 ± 1,1	3,3 ± 2,6	3,7 ± 1,6	5,3 ± 1,5
90 мин.	4,8 ± 1,3	2,7 ± 2,5	2,9 ± 1,3	4,4 ± 1,8
120 мин.	4,1 ± 1,2	2,5 ± 2,5	2,9 ± 1,4	4,1 ± 1,9

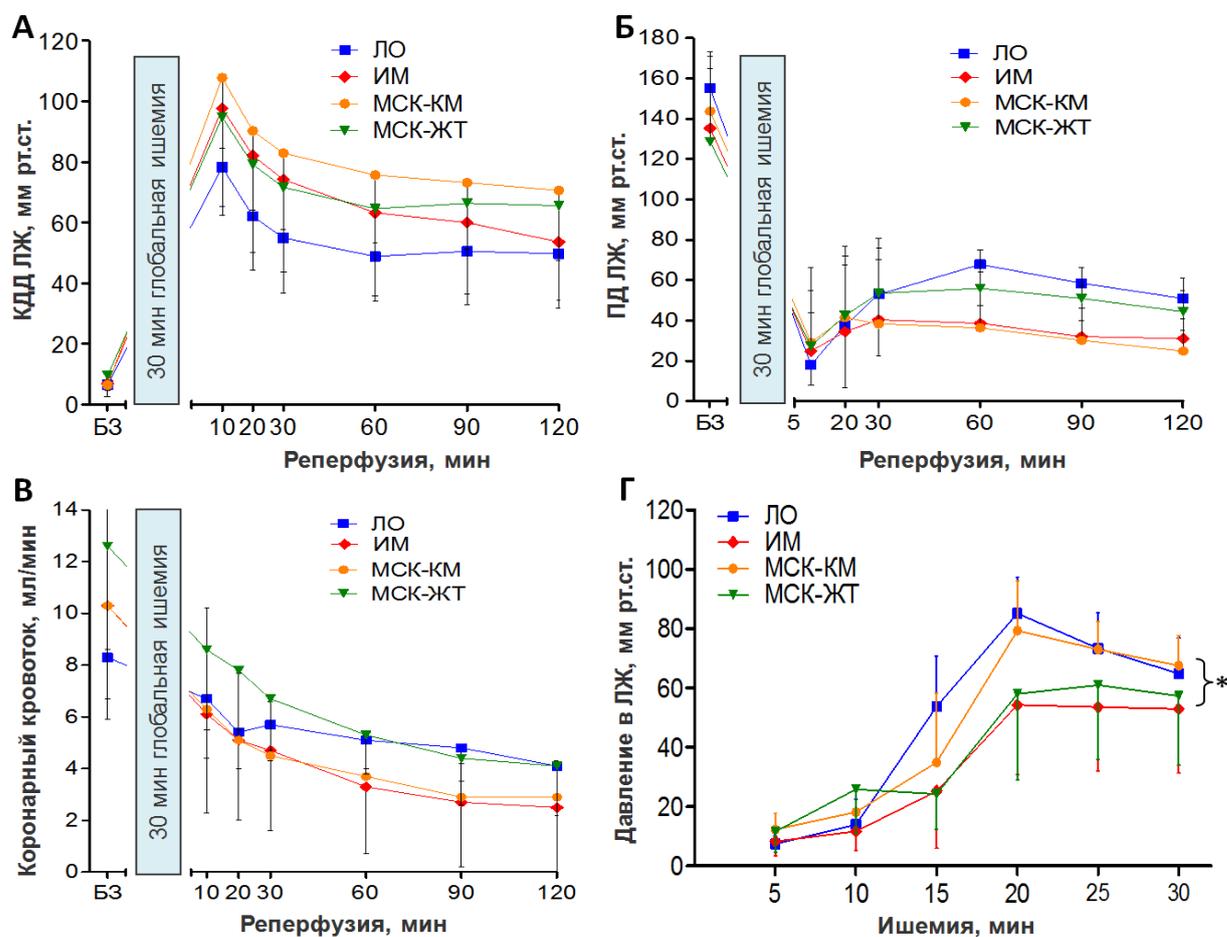


Рисунок 5 – Функциональные показатели изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу при 30-минутной глобальной ишемии и последующей 120-минутной реперфузии. А – конечное диастолическое давление в левом желудочке (КДД ЛЖ); Б – пульсовое давление в левом желудочка (ПД ЛЖ); В – коронарный кровоток; Г – среднее давление в левом желудочке в течение 30 минут глобальной ишемии. \* – среднее давление в левом желудочке значимо меньше в группе МСК-ЖТ и группе ИМ по сравнению с МСК-КМ и ложнооперированными животными ( $p < 0,05$ ). БЗ – базовые значения

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

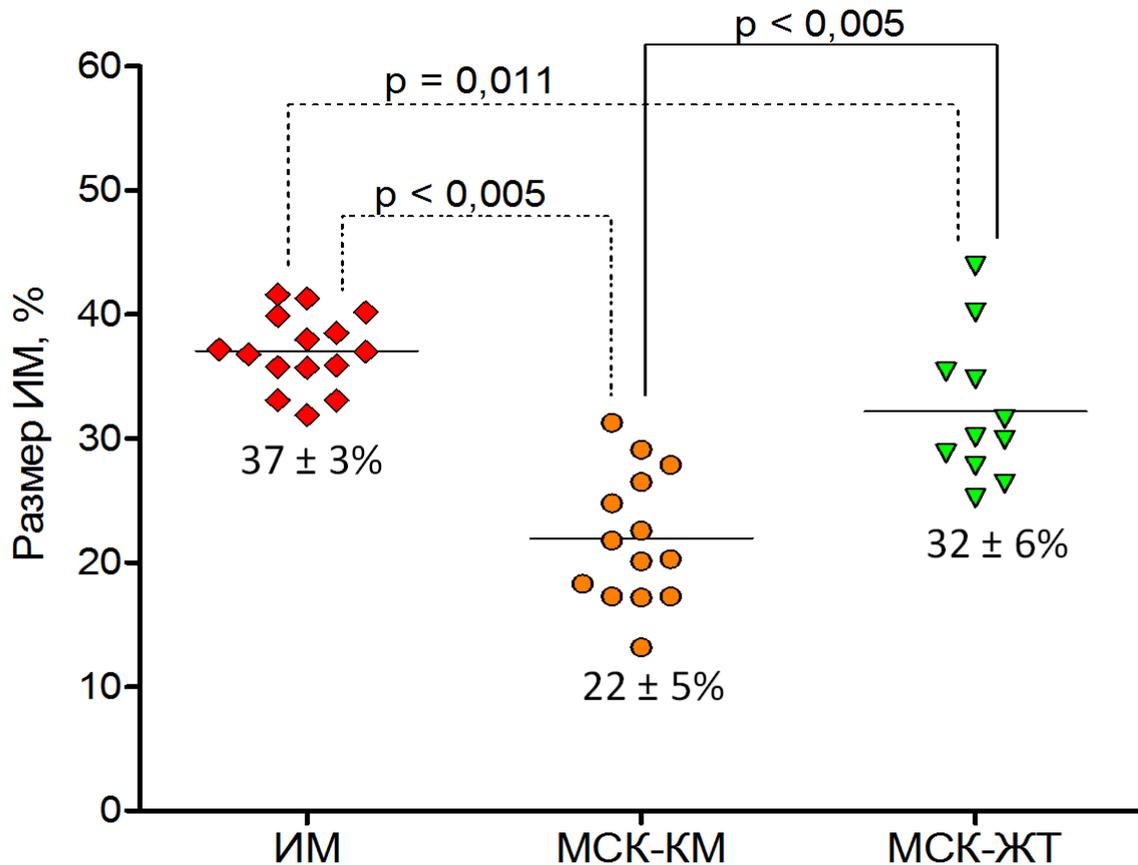


Рисунок 6 – Размер рубца левого желудочка в экспериментальных группах через 21 день после моделирования инфаркта миокарда. Размер рубца в группах МСК-КМ ( $p < 0,005$ ) и МСК-ЖТ ( $p = 0,011$ ) значимо меньше, чем в группе контроля (ИМ). Размер рубца в группе МСК-КМ значимо меньше, чем в группе МСК-ЖТ ( $p < 0,005$ )

### 3.3. Обоснование оптимального протокола микроинкапсулирования мезенхимных стволовых клеток в полупроницаемую мембрану из альгината натрия с заданными параметрами биodeградации

Получены альгинатные капсулы с диаметром  $225 \pm 25$  мкм. Принципиальная схема действия микрокапсулы с заключенными в ней стволовыми клетками представлена на рисунке 7.

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 6). В дальнейшем именно эти растворы использовались для стабилизации внешней оболочки микрокапсулы.

Таблица 6 – Осмоляльность растворов для стабилизации микрокапсул

Среда	Осмоляльность, осмоль/кг
Бидистиллированная вода	0,001
0,9 % $\text{NaCl}$	0,290
1,5 % $\text{CaCl}_2$	0,248
1,2 % $\text{BaCl}_2$	0,132
2,2 % $\text{BaCl}_2$	0,230
50 ммоль/л $\text{CaCl}_2$ и 50 ммоль/л $\text{BaCl}_2$	0,238

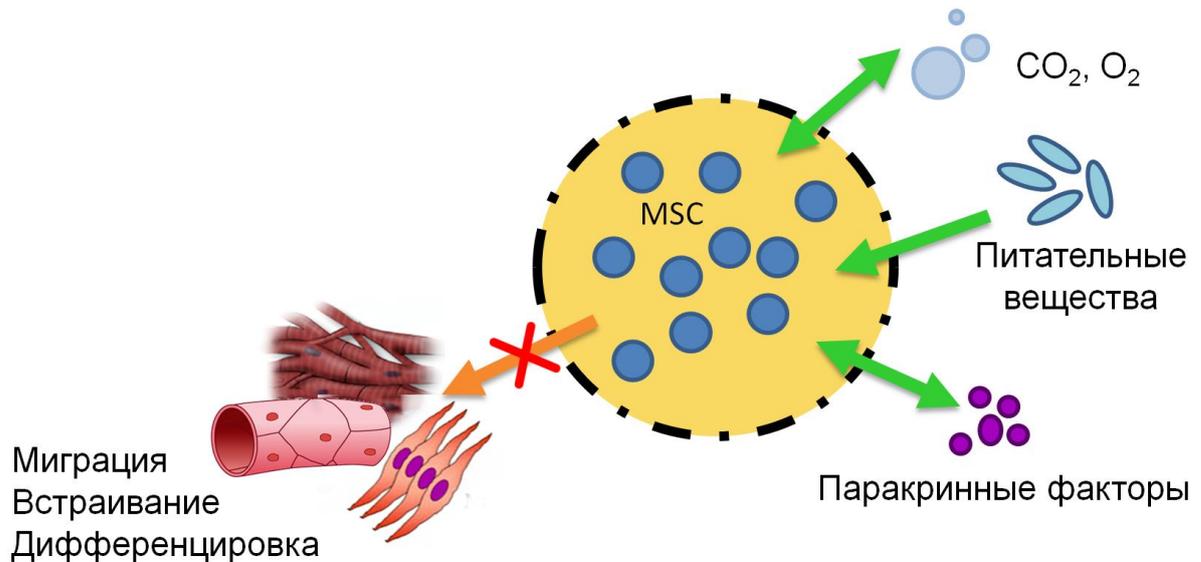


Рисунок 7 – Схематическое представление стратегии инкапсуляции для оценки роли паракринных факторов в кардиопротективном действии стволовых клеток. Микрокапсулы, содержащие МСК, свободно проницаемы для газов, питательных веществ, ФР и цитокинов. Инкапсуляция предотвращает выход жизнеспособных клеток из матрикса, исключая возможные кардиопротективные эффекты, связанные с миграцией клеток, интеграцией в ткань хозяина и трансдифференцировкой в клетки миокарда

Анализ стабильности капсул в фосфатном буфере показал, что при использовании 1,5 % раствора  $\text{CaCl}_2$  набухание капсул происходило уже на первый день, а полное разрушение на 5 день наблюдения. При использовании 2,2 % раствора  $\text{BaCl}_2$  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  $\text{CaCl}_2$  и 50 ммоль/л  $\text{BaCl}_2$  легкое набухание происходило на 5 день наблюдения, полное разрушение к 21 дню наблюдения (Таблица 7), что соответствует оптимальным срокам биodeградации при трансплантации микрокапсул в миокард (Рисунок 8).

Таблица 7 – 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 набухание	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

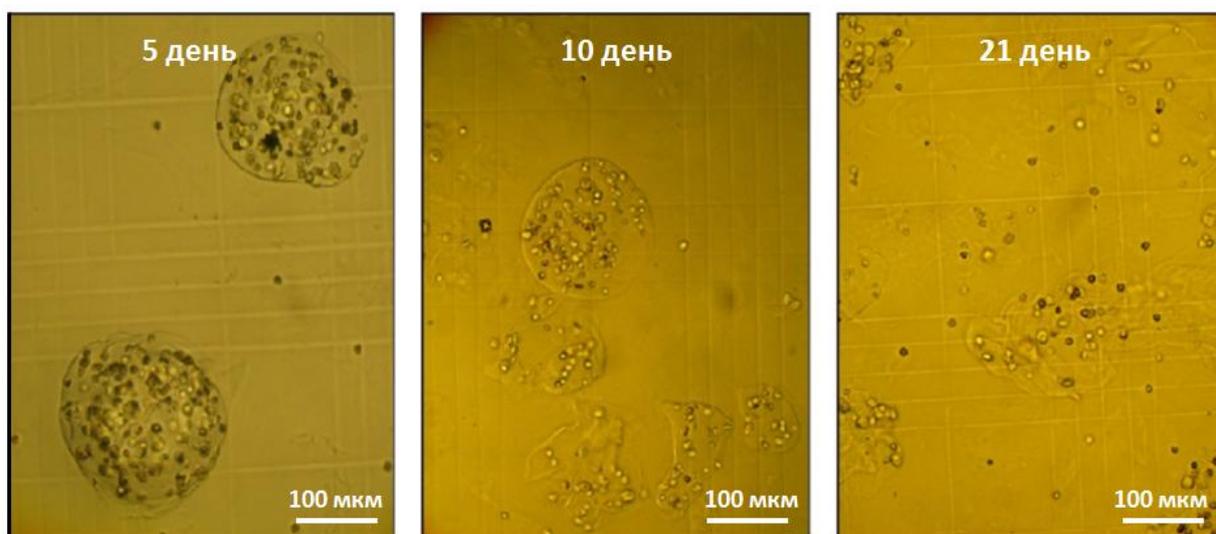


Рисунок 8 – Динамика биодegradации микрокапсул, стабилизированных раствором, содержащим 50 ммоль/л CaCl<sub>2</sub> и 50 ммоль/л BaCl<sub>2</sub>

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 CaCl<sub>2</sub> 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 (раствор, содержащий 50 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  и 50 ммоль/л  $\text{BaCl}_2$  2,2 % –  $3 \pm 2 \%$ ; 2,2 % раствор  $\text{BaCl}_2$  –  $3 \pm 3 \%$ ; 1,5 % раствор  $\text{CaCl}_2$  –  $3 \pm 2 \%$ ) (Рисунок 9).

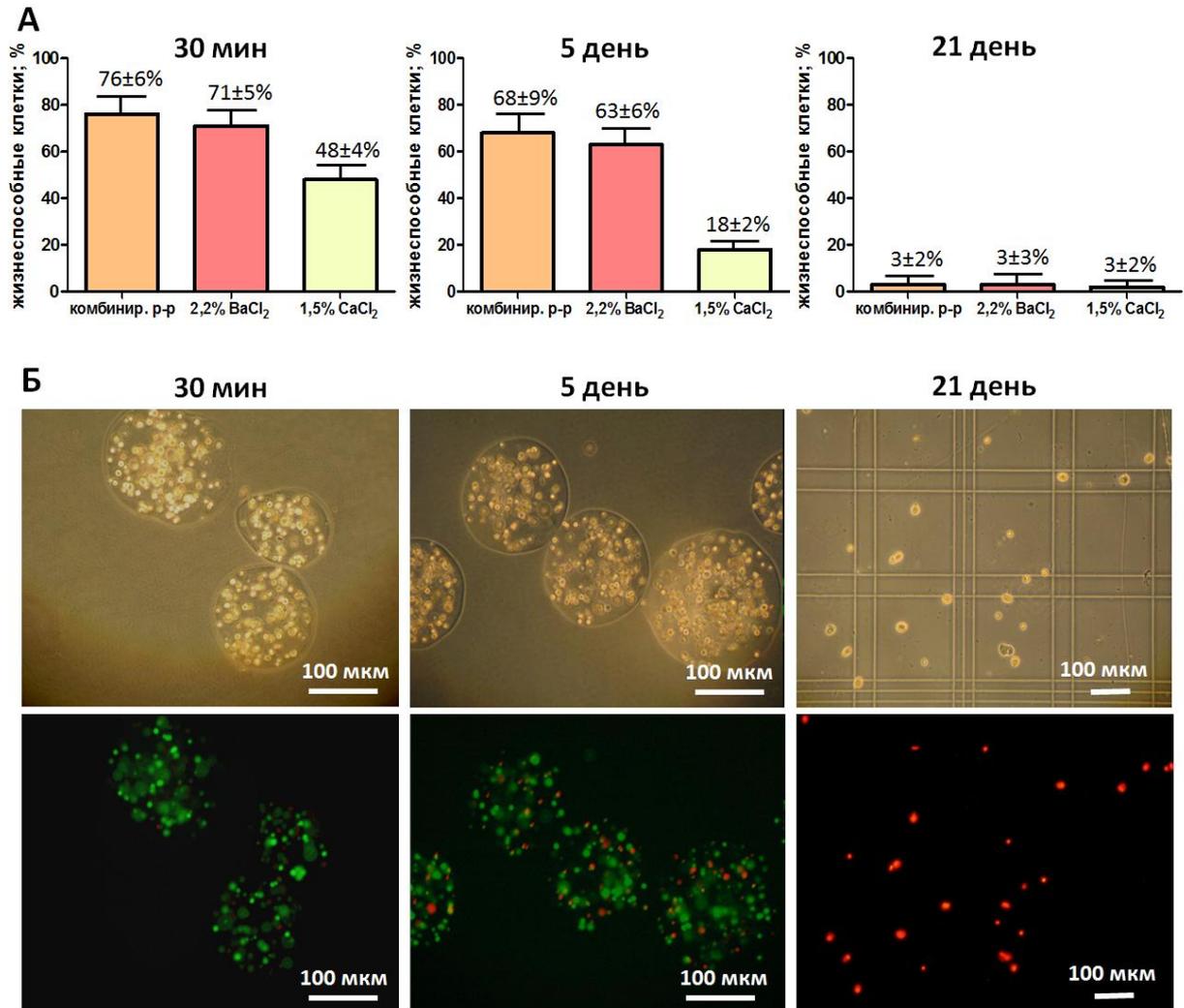


Рисунок 9 – Жизнеспособность микроинкапсулированных МСК.

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 CaCl<sub>2</sub> и 50 ммоль/л BaCl<sub>2</sub>, 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)

Среднее количество клеток в одной капсуле, оцененное с помощью конфокальной микроскопии, составляло  $35 \pm 2$  (Рисунок 10).

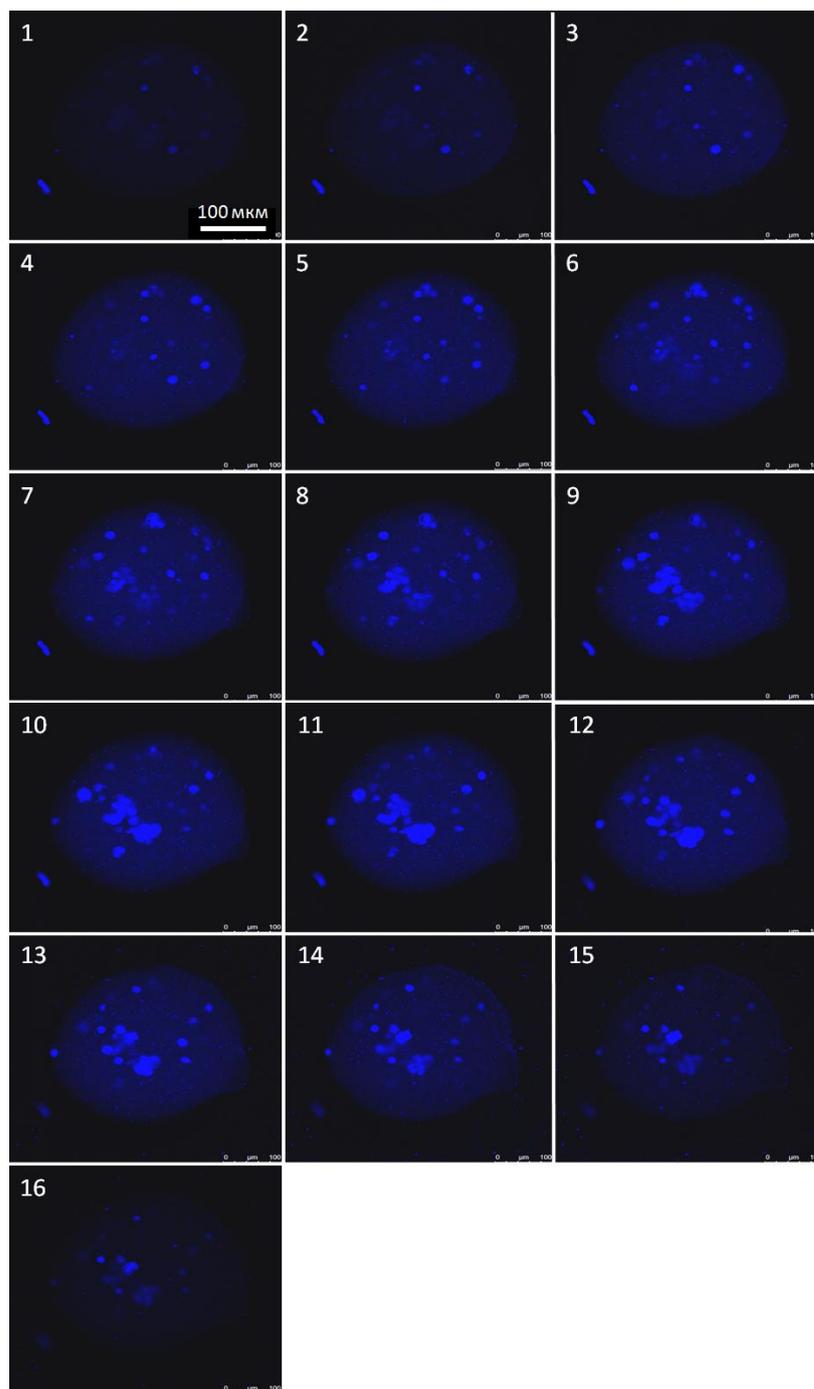


Рисунок 10 – Репрезентативные микрофотографии инкапсулированных МСК, полученные с помощью конфокальной микроскопии. Окраска: флуоресцентный краситель DAPI

По данным анализа секреторной активности нативных и микроинкапсулированных МСК с помощью ИФА были получены сопоставимые показатели секреции  $TGF\beta 1$ , что указывает на свободную проницаемость микрокапсулы для сигнальных молекул (Рисунок 11).

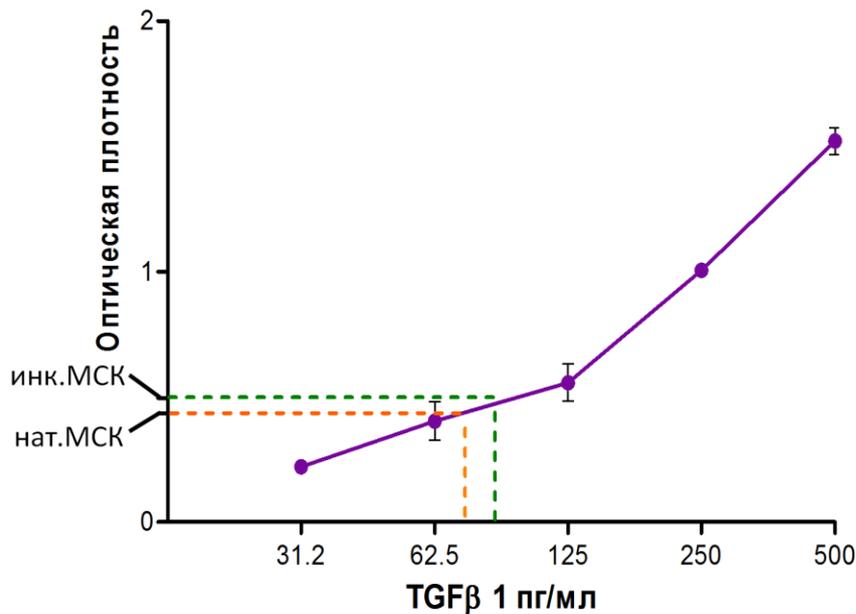


Рисунок 11 – Концентрация TGFβ 1 в культуральной среде, полученной от нативных (нат.МСК) и микроинкапсулированных МСК (инк.МСК) на 5-й день после инкапсуляции, оцененная с помощью иммуноферментного анализа

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

1. Контроль (n = 7): производилась интрамиокардиальная инъекция PBS 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 количество лейкоцитов периферической крови на 3 день после операции в группе введения микрокапсул не отличалось 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 было значимо выше, чем у неоперированных животных ( $3,9 \pm 0,7 (\times 10^9/\text{л})$ ). На 7 день после трансплантации количество лейкоцитов в обеих группах снизилось 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 12).

Показатели ЭХО-КГ в обеих группах на 7 день после операции значимо не отличались от неоперированных животных (Таблица 8). Глобальная систолическая функция в группе контроля и группе введения микрокапсул была сохранена, локальных нарушений сократимости после интрамиокардиальных инъекций выявлено не было.

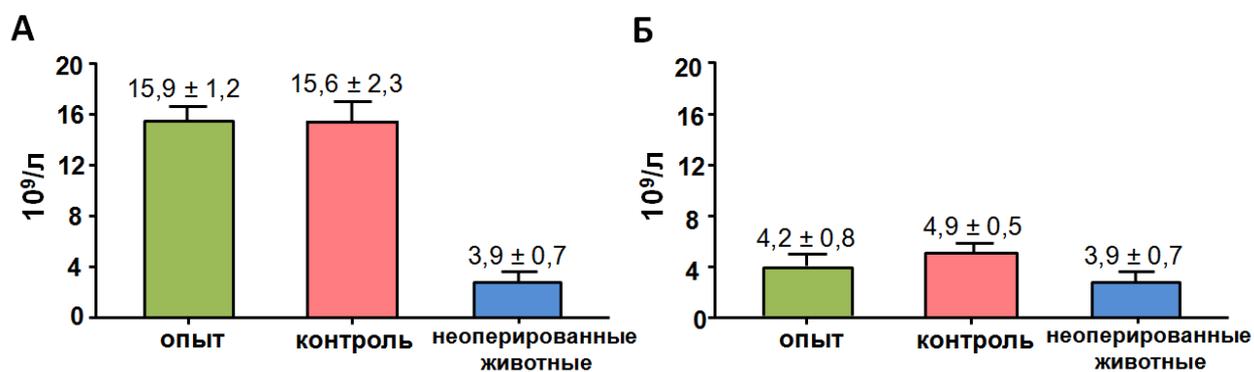


Рисунок 12 – Количество лейкоцитов в периферической крови на разных сроках после интрамиокардиального введения микроинкапсулированных МСК. А – через 3 дня; Б – через 7 дней

Таблица 8 – Сравнительный анализ морфофункциональных показателей сердца крысы через 7 дней после интрамиокардиальной инъекции в сравнении с неоперированными животными по данным ЭХО-КГ

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

Примечания: 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

### **3.4. Оценка эффекта микроинкапсулированных мезенхимных стволовых клеток на процесс постинфарктного ремоделирования сердца и изучение механизмов положительного влияния мезенхимных стволовых клеток на миокард при ишемическом повреждении**

Опыты проводились на 47 крысах-самцах стока Wistar массой 225 ± 25 г. Моделирование перманентного ишемического повреждения выполнялось путем наложения лигатуры на ствол ЛКА.

Все животные были разделены на 4 группы (Рисунок 13):

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

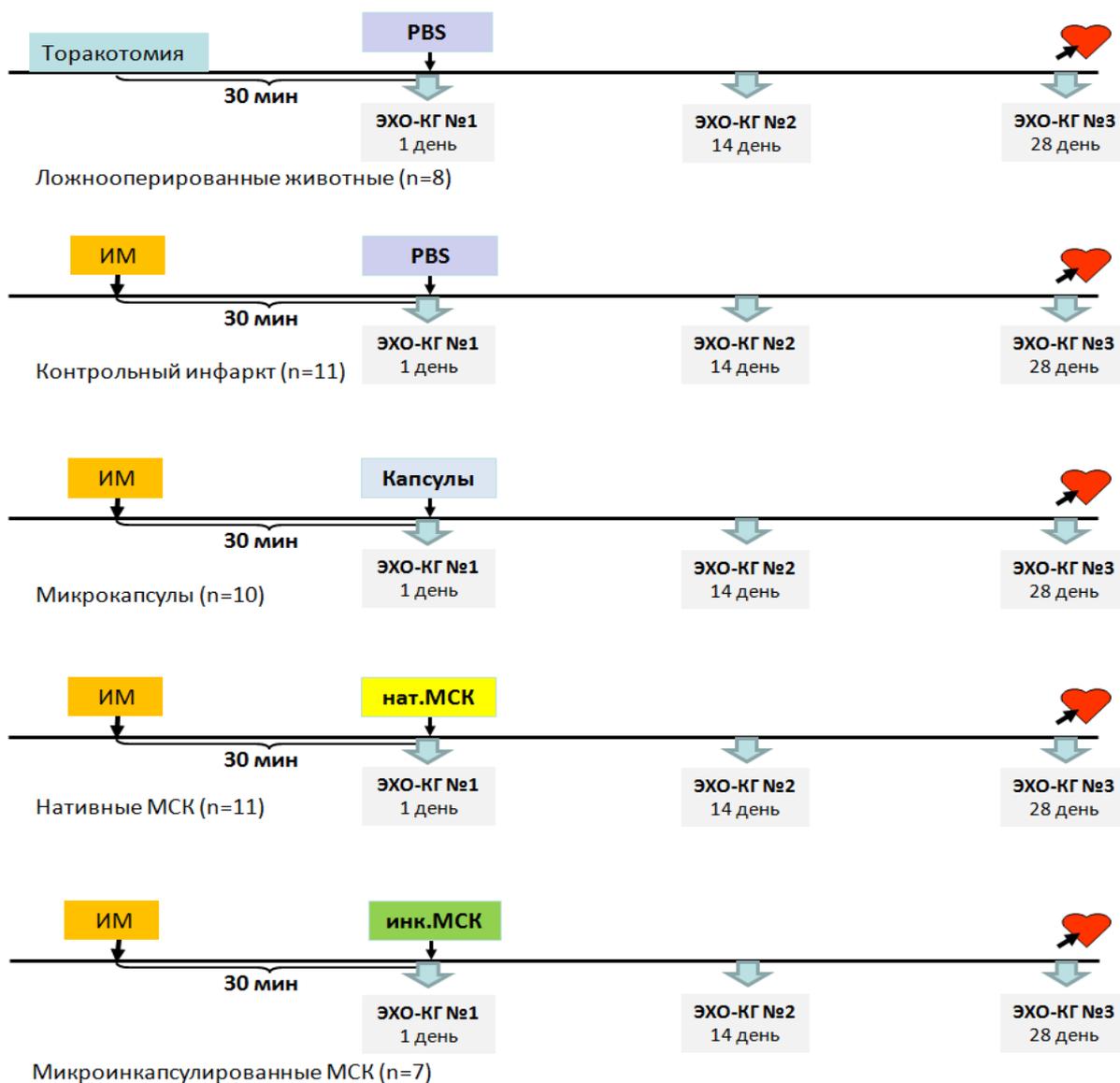


Рисунок 13 – Протокол эксперимента по оценке эффекта микроинкапсулированных МСК на процесс постинфарктного ремоделирования сердца и изучения механизмов положительного влияния мезенхимных стволовых клеток на миокард при ишемическом повреждении

По данным ЭХО-КГ, выполненного в день моделирования ИМ, значимых различий между экспериментальными группами по значению ФУ ЛЖ выявлено не было ( $p = 0,099$ ) (Рисунок 14 Б, Таблица 9), что указывает на одинаковые условия перед началом введения во всех исследуемых группах. Напротив, значения ФУ ЛЖ всех групп с окклюзией ЛКА были значимо ниже ( $p < 0,001$ ), чем в группе ЛО, что указывает на эффективность выполненной модели

ишемического повреждения миокарда. Значимых различий между анализируемыми группами в день моделирования ИМ по показателям КДР ( $p = 0,807$ ), ПСЛЖд ( $p = 0,848$ ), ЗСЛЖд ( $p = 0,517$ ) выявлено не было.

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 –  $p = 0,314$ . Применение пустых микрокапсул не приводило к значимому увеличению ФУ на всех сроках наблюдения (Рисунок 14 А, В-Д). Статистически значимое увеличение КДР на 14 день ( $p = 0,011$ ) и на 28 день ( $p = 0,02$ ), а также истончение передней стенки ЛЖ на 14 день –  $p = 0,009$  и на 28 день –  $p = 0,006$  между группами, в которых производилась коронароокклюзия, и ЛО указывает на процесс постинфарктного ремоделирования ЛЖ. Различий между выраженностью ремоделирования по показателям КДР (14 день –  $p = 0,404$ , 28 день –  $p = 0,907$ ), толщины ПСЛЖд (14 день –  $p = 0,34$ , 28 день –  $p = 0,457$ ) между опытными группами выявлено не было. Толщина ЗСЛЖд не различалась между анализируемыми группами во всех сроках наблюдения (1 день –  $p = 0,696$ , 14 день –  $p = 0,34$ , 28 день –  $p = 0,292$ ).

По данным гистологического исследования сердца (Таблица 10) значимые различия были получены по показателю процента площади рубца от общей площади стенок ЛЖ между Контр.ИМ и нат.МСК ( $p = 0,015$ ), а также Контр.ИМ и инк.МСК ( $p = 0,03$ ) (Рисунок 15 А-Б). Значимых различий между использованием нат.МСК и инк.МСК получено не было ( $p = 0,637$ ).

Значения толщины межжелудочковой перегородки (МЖП) ( $p = 0,67$ ), толщины рубцовой стенки ( $p = 0,46$ ), индекса гипертрофии ( $p = 0,67$ ) и индекса дилатации ( $p = 0,176$ ) по данным многомерного непараметрического критерия Краскела-Уоллиса между опытными группами значимо не различались (Рисунок 15 В-Д).

Таблица 9 – Сравнительный анализ морфофункциональных показателей сердца крысы в различные сроки после интрамиокардиального введения нативных и микроинкапсулированных мезенхимных стволовых клеток по данным эхокардиографии

Параметры	ЛО	Контр.ИМ	Капсулы	нат.МСК	инк.МСК
ПСЛЖд (мм) 1 день	1,72 ± 0,28	1,79 ± 0,38	1,75 ± 0,31	1,69 ± 0,27	1,77 ± 0,19
ЗСЛЖд (мм) 1 день	1,99 ± 0,36	1,89 ± 0,38	1,84 ± 0,35	1,82 ± 0,31	2,01 ± 0,21
ПСЛЖд (мм) 14 день	1,89 ± 0,41	1,21 ± 0,15#	1,18 ± 0,17#	1,56 ± 0,35#	1,28 ± 0,23#
ЗСЛЖд (мм) 14 день	1,87 ± 0,31	1,96 ± 0,53	1,2 ± 0,46	2,25 ± 0,39	2,20 ± 0,63
ПСЛЖд (мм) 28 день	1,72 ± 0,37	1,06 ± 0,19#	1,07 ± 0,18#	1,15 ± 0,2#	1,41 ± 0,37#
ЗСЛЖд (мм) 28 день	2,01 ± 0,31	2,02 ± 0,31	2,03 ± 0,35	2,02 ± 0,4	2,11 ± 0,29
КДР (мм) 1 день	6,40 ± 0,42	6,30 ± 0,61	6,29 ± 0,57	6,28 ± 0,46	6,58 ± 0,84
КСР (мм) 1 день	3,31 ± 0,55	4,94 ± 0,62	5,13 ± 0,59	4,67 ± 0,47	5,36 ± 0,86
КДР (мм) 14 день	6,43 ± 0,29	7,63 ± 0,87#	7,61 ± 0,79#	7,21 ± 0,71#	7,52 ± 1,12#
КСР (мм) 14 день	3,28 ± 0,36	6,59 ± 1,09#	6,47 ± 1,11#	5,4 ± 1,04#	6,15 ± 0,96#
КДР (мм) 28 день	6,47 ± 0,4	8,54 ± 1,18#	8,56 ± 0,99#	8,08 ± 0,96#	8,24 ± 0,75#
КСР (мм) 28 день	3,21 ± 0,35	7,41 ± 1,22#	7,48 ± 1,03#	6,11 ± 0,84#	6,55 ± 9,85#
ФУ (%) 1 день	50,54 ± 5,92	21,62 ± 4,48#	20,37 ± 3,58#	25,72 ± 4,99#	18,66 ± 4,08#
ФУ (%) 14 день	48,99 ± 4,75	14,06 ± 4,67#	15,67 ± 3,46#	24,76 ± 7,95*#	19,35 ± 4,1*#
ФУ (%) 28 день	50,15 ± 5,06	13,44 ± 3,06#	13,2 ± 3,28#	24,49 ± 4,78*#	20,82 ± 5,08*#

Примечания: ПСЛЖд – передняя стенка левого желудочка в диастолу; ЗСЛЖд – задняя стенка левого желудочка в диастолу; КДР – конечный диастолический размер; КСР – конечный систолический размер; ФУ – фракция укорочения.

\* –  $p < 0,05$  при сравнении с группой Контр.ИМ; # –  $p < 0,05$  при сравнении с ЛО (критерий Краскела-Уоллиса)

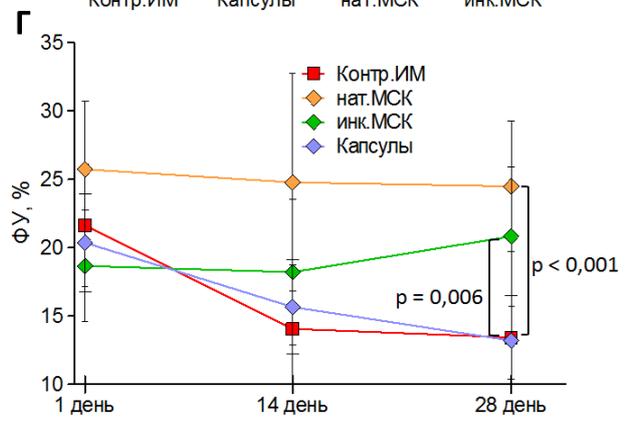
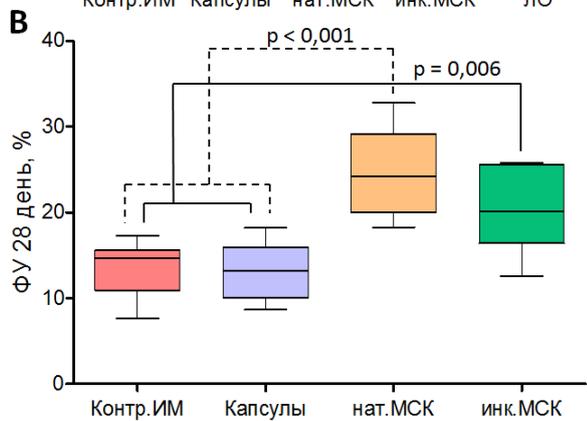
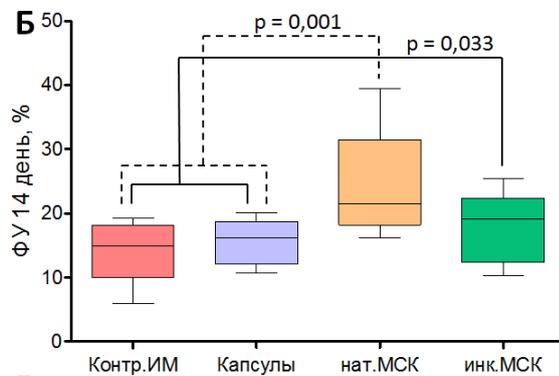
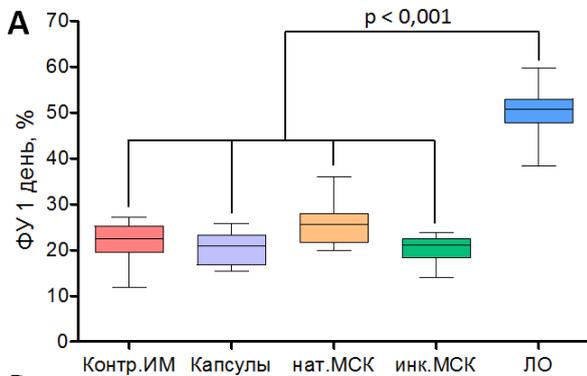
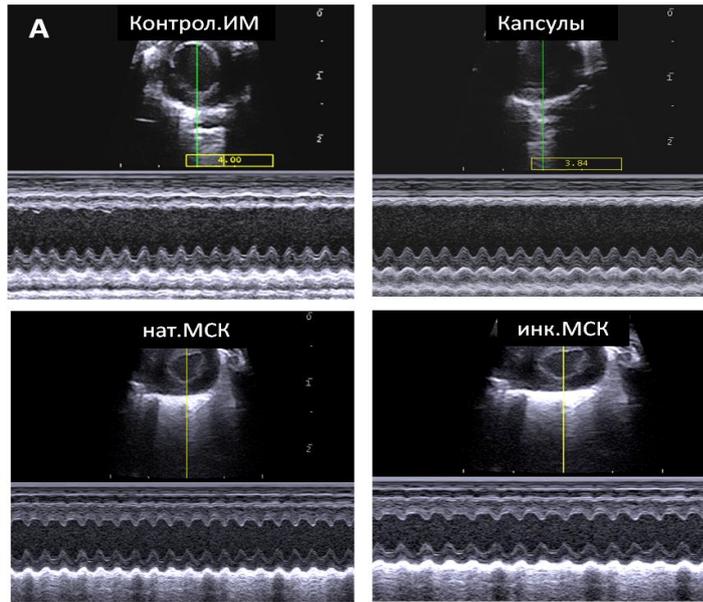


Рисунок 14 – Изменение систолической функции левого желудочка в разные сроки ИМ по данным ЭХО-КГ. А – репрезентативные изображения эхокардиографического исследования в короткой парастеральной позиции через 28 дней после операции (М-режим под контролем двухмерного режима); Б – фракция укорочения (ФУ) ЛЖ в первый день после ишемического повреждения; В – ФУ ЛЖ через 14 дней; Г – ФУ ЛЖ через 28 дней; Д – динамика изменения ФУ ЛЖ в течение всего времени наблюдения

Таблица 10 – Сравнительный анализ морфометрических показателей сердца крысы через 28 дней после интрамиокардиального введения нативных и микроинкапсулированных мезенхимных стволовых клеток по гистологического исследования сердца

Параметры	ЛО	Контр.ИМ	Капсулы	нат.МСК	инк.МСК
толщина рубцовой/передней стенки ЛЖ (мм)	1,74 ± 0,1	1,22 ± 0,29#	1,2 ± 0,23#	1,36 ± 0,37#	1,18 ± 0,36#
толщина межжелудочковой перегородки (мм)	1,76 ± 0,04	1,74 ± 0,37	1,82 ± 0,29	1,93 ± 0,24	1,96 ± 0,39
общая площадь стенок ЛЖ (мм <sup>2</sup> )	79,15 ± 5,36	93,69 ± 10,7#	91,87 ± 9,66#	103,95 ± 11,97#	102,57 ± 12,23#
Площадь рубца (мм <sup>2</sup> )	-	20,19 ± 6,39	21,52 ± 5,87	12,21 ± 6,63*	15,26 ± 5,42*
процент площади рубца от общей площади стенок ЛЖ (%)	-	21,67 ± 6,88	21,97 ± 6,12	12,13 ± 6,83*	14,73 ± 4,26*
индекс гипертрофии ЛЖ	1,02 ± 0,05	1,49 ± 0,44#	1,53 ± 0,47#	1,5 ± 0,42#	1,86 ± 0,9#
индекс дилатации (%)	15,63 ± 1,34	31,49 ± 11,09#	29,14 ± 7,82#	25,1 ± 4,58#	24,02 ± 2,04#

\* –  $p < 0,05$  при сравнении с группой Контр.ИМ; # –  $p < 0,05$  при сравнении с ЛО (критерий Краскела-Уоллиса)

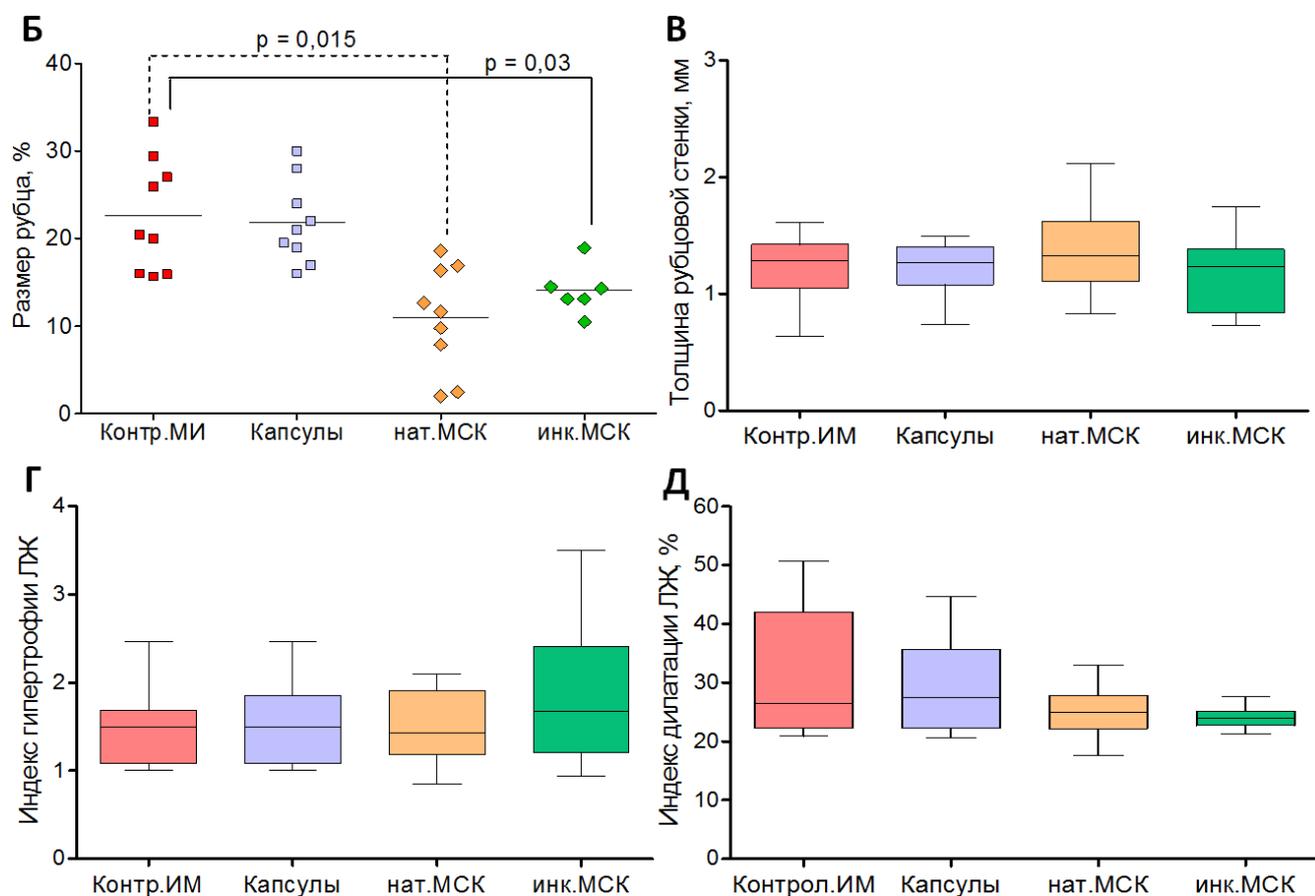
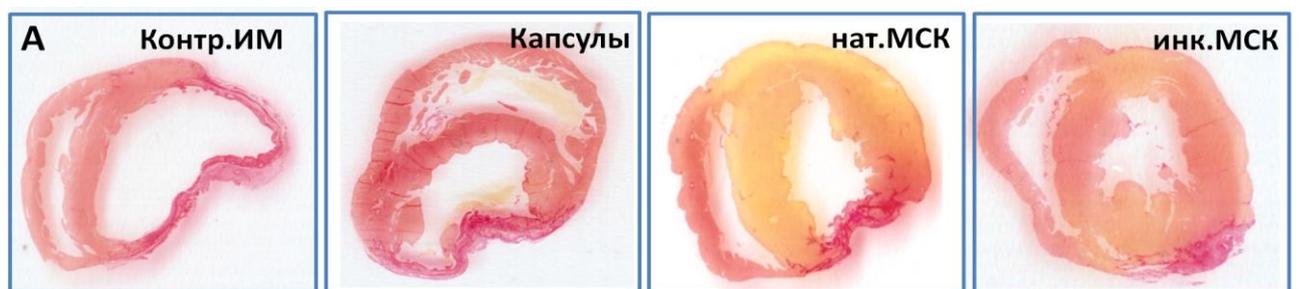


Рисунок 15 – Показатели размера рубца и ремоделирования левого желудочка по данным гистологического исследования сердца. А – репрезентативные срезы сердца, исследуемых групп (окраска: Picro Sirius Red); Б – процент площади рубца от общей площади стенок ЛЖ; В – толщина рубцовой стенки; Г – индекс гипертрофии ЛЖ; Д – индекс дилатации ЛЖ

### 3.5. Оценка аритмогенной безопасности применения нативных и микроинкапсулированных мезенхимных стволовых клеток

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 PBS 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 PBS, 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 PBS, объем 0,1 мл.

Телеметрическая регистрация ЭКГ производилась в течение 1 часа на 1, 7 и 21 сутки после интрамиокардиальной инъекции (Рисунок 16).

В результате анализа полученных данных жизнеугрожающих аритмий (ФЖ, желудочковая тахикардия) ни в одном из случаев выявлено не было (Таблицы 11–13). В 1 день после интрамиокардиальной инъекции во всех группах отмечалось достоверно большее общее количество нарушений ритма ( $p = 0,004$ ) (Рисунок 17) и количество одиночных предсердных ЭС ( $p = 0,004$ ) 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.

Таблица 11 – Нарушения ритма в 1 день после интрамиокардиальной инъекции нативных и микроинкапсулированных МСК по данным ЭКГ телеметрии

Показатели	ЛО	нат.МСК	инк.МСК
Общее количество нарушений ритма	74 ± 9	72 ± 17	73 ± 11
Одиночные суправентрикулярные ЭС	64 ± 6	63 ± 19	65 ± 10
Парные суправентрикулярные ЭС	4 ± 1	3 ± 2	3 ± 1
Групповые суправентрикулярные ЭС / суправентрикулярные ПТ	1/0	0	1/0
Одиночные желудочковые ЭС	5 ± 1	5±2	4±1
Парные желудочковые ЭС	1/0	0	0
Желудочковая тахикардия / ФЖ	0	0	0

Таблица 12 – Нарушения ритма через 7 дней после интрамиокардиальной инъекции нативных и микроинкапсулированных МСК по данным ЭКГ телеметрии

Показатели	ЛО	нат.МСК	инк.МСК
Общее количество нарушений ритма	25 ± 4	29 ± 6	25 ± 6
Одиночные суправентрикулярные ЭС	17 ± 3	22 ± 7	16 ± 5
Парные суправентрикулярные ЭС	3 ± 1	4 ± 2	3 ± 1
Групповые суправентрикулярные ЭС / суправентрикулярные ПТ	1/0	1/0	2/0
Одиночные желудочковые ЭС	4 ± 1	4 ± 2	5 ± 1
Парные желудочковые ЭС	0	0	0
Желудочковая тахикардия / ФЖ	0	0	0

Таблица 13 – Нарушения ритма через 21 день после интрамиокардиальной инъекции нативных и микроинкапсулированных МСК по данным ЭКГ телеметрии

Показатели	ЛО	нат.МСК	инк.МСК
Общее количество нарушений ритма	28 ± 6	27 ± 4	26 ± 10
Одиночные суправентрикулярные ЭС	17 ± 3	21 ± 4	19 ± 6
Парные суправентрикулярные ЭС	3 ± 1	3 ± 2	4 ± 3
Групповые суправентрикулярные ЭС / суправентрикулярные ПТ	1/2	0	1/0
Одиночные желудочковые ЭС	3 ± 1	3 ± 2	1/2
Парные желудочковые ЭС	0	0	0
Желудочковая тахикардия / ФЖ	0	0	0

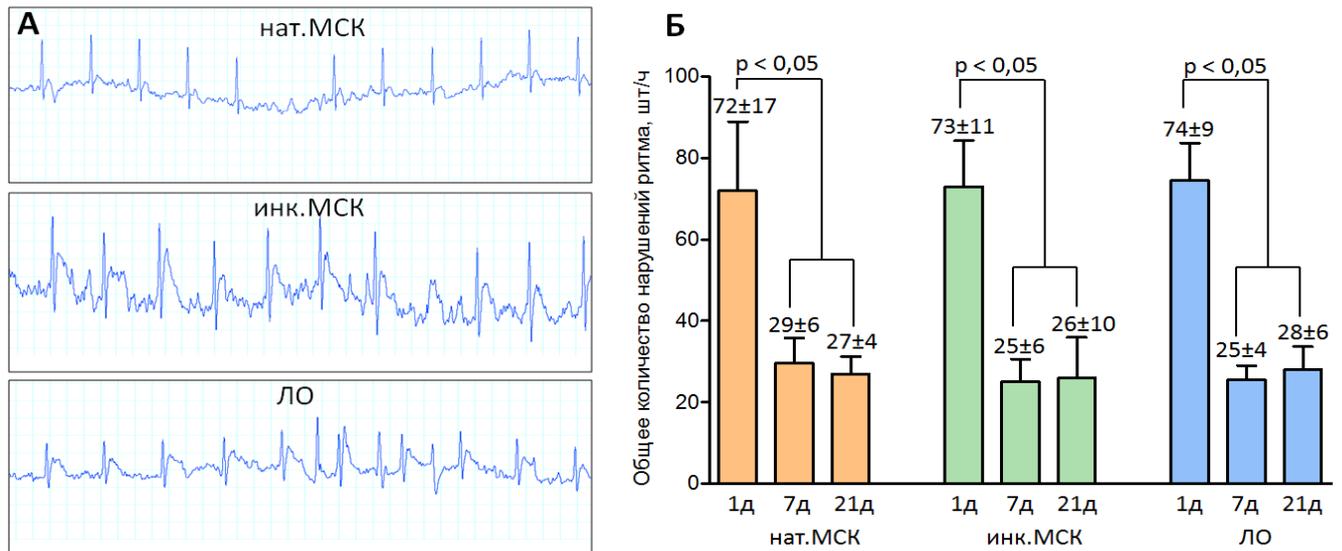


Рисунок 16 – Частота нарушений ритма у неинфарктных животных, получавших свободные или микроинкапсулированные МСК. А – типичные примеры аритмий, зарегистрированных в ходе телеметрического мониторинга; Б – общее количество эпизодов нарушения ритма за 1 ч, зарегистрированных в различные сроки после операции (1, 7 и 21 день)

#### ГЛАВА 4. Обсуждение результатов исследования

По результатам проведенного исследования интрамиокардиальная трансплантация МСК-КМ и МСК-ЖТ через 7 дней после ишемического-реперфузионного повреждения миокарда привела к значимому уменьшению площади рубца. Однако инфаркт-лимитирующее действие было значимо выше при использовании МСК-КМ по сравнению с МСК-ЖТ. Кроме того, применение МСК-КМ привело к значительно лучшему сохранению реакции миокарда на глобальную ишемию, которая была оценена по величине контрактуры ЛЖ. Напротив, введение МСК-ЖТ в периинфарктную зону не вызывало улучшения функциональных показателей сердца.

Эффекты интрамиокардиальной трансплантации МСК были исследованы ранее в моделях обратимой (Jain M. et al., 2001) и перманентной (Imanishi Y. et al., 2008) ишемии миокарда у крыс. Хотя в этих исследованиях чаще всего используется модель постоянного лигирования ЛКА, в настоящей работе была выбрана модель ишемического-реперфузионного повреждения сердца для сравнения эффектов МСК различного происхождения. Эта модель, по-видимому, более актуальна для экстраполяции результатов на клинический сценарий, имеющий место у пациентов с острым коронарным синдромом, которым была выполнена коронарная реваскуляризация посредством чрескожного вмешательства или тромболизиса.

В настоящем исследовании во всех проведенных экспериментах использовался интрамиокардиальный путь введения МСК. Ранее было исследовано несколько способов трансплантации стволовых клеток для клеточной терапии ИМ, включая интракоронарное (Hou D. et al., 2005), внутривенное (Nagaya N. et al., 2004) и интрамиокардиальное введение либо в периинфарктную область (Li Q. et al., 2010), либо непосредственно в зону инфаркта (Imanishi Y. et al., 2008). В проведенной работе интрамиокардиальный путь введения МСК был выбран на основании данных, показывающих большую эффективность этого подхода, связанную с локальным накоплением клеток в

целевой области, а также для большей безопасности (Freyman T. et al., 2006). Более того, за последнее десятилетие интрамиокардиальное введение МСК стало более доступным в клинической практике из-за применения таких интервенционных методов, как трехмерная система электромеханического картирования, которая позволяет выполнять точное трансэндокардиальное введение МСК (Chazaud V. et al., 2003; Vanovic M. et al., 2011).

Существуют некоторые разногласия по поводу оптимальной дозы МСК для интрамиокардиального введения и точного временного интервала для их трансплантации в период после ИМ. В настоящем исследовании для сравнения эффектов МСК различного происхождения, стволовые клетки вводили в миокард в суммарной дозе  $1 \times 10^6$  или  $2 \times 10^6$  клеток в 1 мл фосфатного буфера. Эти дозы в настоящее время наиболее часто используются в моделях ишемии миокарда на животных (Dai W. et al., 2005; Berry M.F. et al., 2006; Liu J.F. et al., 2008). МСК вводили в миокард через 7 дней после реперфузии, что согласуется с данными С.У. Jiang и соавт. (2008). Эта временная точка, по-видимому, наилучшим образом подходит для сохранения жизнеспособности МСК и их функциональной активности из-за двух основных факторов. Во-первых, острая воспалительная реакция, которая может нарушать активность МСК, почти полностью прекращается к этому времени. Во-вторых, на этой стадии ИМ фиброзная ткань еще довольно незрелая, что может способствовать ограничению образования рубцовой ткани под влиянием трансплантированных МСК. Таким образом, документированный положительный эффект трансплантации МСК-КМ можно объяснить двумя факторами: оптимальным выбором дозы МСК и пути введения, а также временем введения, характеризующимся минимальным воспалением и наличием незрелой рубцовой ткани, могущей представлять собой мишень для терапевтического анти-ремоделирующего воздействия.

Существует близкое сходство между МСК-КМ и МСК-ЖТ, так как обе эти популяции клеток происходят из эмбриональной мезодермы. В частности, оба типа клеток соответствуют общим критериям для МСК, предложенным М. Dominici и соавт. (2006): 1) адгезия к пластику при сохранении в культуре,

2) экспрессия CD105, CD73, CD90, 3) отсутствие экспрессии CD34, CD45, 4) способность дифференцироваться *in vitro* в остеобласты, адипоциты и хондробласты. Однако ранее были выявлены некоторые различия в фенотипических свойствах МСК-ЖТ и МСК-КМ. Например, такие маркеры, как CD44 и CD49d, не найдены в МСК-КМ, но обычно присутствуют в МСК-ЖТ. Кроме того, CD106 характерен для МСК-КМ, но не для МСК-ЖТ (Zhu X. et al., 2012). Что касается пролиферативной способности МСК, есть ряд доказательств того, что МСК-ЖТ обладают более высоким пролиферативным потенциалом, чем МСК-КМ (Izadpanah R. et al., 2008; Peng L. et al., 2008; Dmitrieva R.I. et al., 2012). Более того, кардиомиоцит-специфическая дифференцировка МСК-ЖТ была продемонстрирована в исследованиях *in vitro* (Zhu Y. et al., 2008; Yang J. et al., 2012). Несмотря на эти обнадеживающие результаты с использованием МСК-ЖТ *in vitro*, их интрамиокардиальная трансплантация не смогла защитить ЛЖ от постинфарктного ремоделирования в настоящем исследовании. Таким образом, более подробная информация о паракринных факторах, секретируемых двумя типами МСК, необходима для выяснения не только функциональных различий между отдельными популяциями стволовых клеток, но также и выявления основных механизмов защиты сердца, опосредованных трансплантацией МСК.

Низкая эффективность применения МСК-ЖТ для лечения ИМ в проведенном исследовании может быть объяснена генотипическими и фенотипическими особенностями этого типа МСК. Четкому предсказанию результатов лечения с использованием определенной популяции МСК препятствуют неизвестные пока механизмы опосредованного МСК защитного эффекта. На сегодняшний день существует, по крайней мере, две основные гипотезы, объясняющие механизм опосредованного МСК улучшения функции ЛЖ после ИМ. Согласно первой гипотезе, трансплантация МСК способствует улучшению функции ЛЖ за счет усиления производства цитокинов, которые могут контролировать клеточное микроокружение (Jiang C.Y. et al., 2008), регулировать клеточный метаболизм (Feuigin J. et al., 2007) и стимулировать пролиферацию и дифференцировку резидентных стволовых клеток сердца (Sassoli

C. et al., 2011; Wang Y. et al., 2012). Вторая гипотеза подразумевает, что МСК могут непосредственно дифференцироваться как в кардиомиоциты, так и в эндотелиальные клетки (Jiang C.Y. et al., 2008; Numasawa Y. et al., 2011). Отсутствие четкого понимания относительного вклада вышеуказанных механизмов в кардиопротективный эффект МСК существенным образом ограничивает дальнейшее развитие клеточной терапии ИМ.

В проведенной работе для исследования роли паракринных факторов в оказываемых МСК эффектах был разработан протокол микроинкапсулирования стволовых клеток в полупроницаемую мембрану из альгината натрия. Полученные микрокапсулы проницаемы для газов и питательных веществ, через мембрану из альгината натрия свободно проникают в обоих направлениях цитокины и сигнальные молекулы, что обеспечивает реализацию паракринного сигналинга в полном объеме. С другой стороны, мембрана микрокапсулы непроницаема как для стволовых клеток, так и для клеток микроокружения, в том числе иммунных клеток, что предотвращает реализацию прямого контакта клеток и эффекта от дифференцировки стволовых клеток.

Для производства микрокапсул использовался альгинат натрия – биологически инертный материал, способный к биодegradации. Полученные в ходе исследования микрокапсулы подвергаются полной биодegradации в течение 21 дня за счет определенного соотношения ионов бария и кальция в составе стабилизирующего раствора. Указанный срок биодegradации был выбран как оптимальный в связи с тем, что максимальный эффект от клеточной терапии наблюдается в первые 14–21 день после ишемического повреждения (Jiang C.Y. et al., 2008). Процесс биодegradации капсул обеспечивает восстановление гомогенности миокарда, предотвращает фиброз вокруг капсулы после завершения действия стволовых клеток и, таким образом, сводит к минимуму риск аритмических осложнений от интрамиокардиальной трансплантации микрокапсул.

В результате проведенных исследований с помощью ИФА на TGF $\beta$  1 была продемонстрирована способность микрокапсул пропускать высокомолекулярные

сигнальные молекулы. В ходе исследования была детально изучена безопасность применения микрокапсул при их интрамиокардиальной трансплантации с оценкой морфофункциональных показателей сердца с помощью ЭХО-КГ и выраженности системного воспаления.

Ранее была показана эффективность применения подобных капсул для защиты трансплантированных  $\beta$ -клеток островков Лангерганса при лечении сахарного диабета первого типа. В работе F. Lim и соавт. (1980) было продемонстрировано длительное сохранение жизнеспособности трансплантированных клеток и секреции инсулина, что приводило к более стабильной нормогликемии у крыс, по сравнению с трансплантацией нативных  $\beta$ -клеток.

Возможный аритмогенез, связанный с клеточной терапией – одно из наиболее серьезных осложнений данного терапевтического направления. Так, аритмогенное действие было показано для интрамиокардиальной трансплантации моноклеаров КМ (Fukushima S. et al., 2007) и миобластов (Patila T. et al., 2015). В проведенной работе для оценки нарушений ритма использовалась телеметрическая установка с длительной регистрацией ЭКГ в разные сроки после трансплантации стволовых клеток. При этом производилось сравнение нативных и микроинкапсулированных МСК. Применение обоих типов клеточных продуктов не приводило к развитию жизнеугрожающих аритмий. Таким образом, отсутствие аритмогенного действия нативных и микроинкапсулированных МСК при их интрамиокардиальной трансплантации позволяет безопасно применять данные типы клеточных продуктов в клинической практике.

Для исследования микроинкапсулированных МСК *in vivo* было отдано предпочтение перманентной модели ишемического повреждения, так как она воспроизводит наиболее грубое повреждение миокарда с формированием крупноочагового, трансмурального ИМ и последующим развитием ХСН. Пациенты именно с таким течением ИМ в наибольшей степени требуют поиска новых подходов к восстановлению поврежденного миокарда. В серии экспериментов по исследованию эффектов применения микроинкапсулированных

МСК был выбран ранний протокол трансплантации МСК через 30 минут после начала ИМ с целью уменьшения травматизации от проводимой трансплантации и снижения погрешности результатов от повторного хирургического вмешательства. Указанный протокол наравне с более поздней трансплантацией (через 7 дней) показал свою эффективность в ранее проведенных исследованиях (Matsumoto R. et al., 2005; Gao F. et al., 2007)

По результатам проведенного исследования влияние нативных и микроинкапсулированных МСК на размер рубца и систолическую функцию сердца после ИМ значимо не различается. Это доказывает, что секреция паракринных факторов является важнейшим механизмом защитного действия МСК на миокард после ишемического повреждения. На сегодняшний день анализ секретома МСК, т.е. всей совокупности продуцируемых ими белковых молекул, выявил более 200 уникальных белков (Ge L. et al., 2016). Терапевтическое использование некоторых факторов роста, секретируемых МСК, таких как VEGF и FGF-2, показало хорошие результаты в доклинических моделях ИМ (Lopez J.J. et al., 1998; Virag J.A. et al., 2007), но не было связано с устойчивыми преимуществами в рандомизированных клинических исследованиях (Henry T.D. et al., 2003; Simons M. et al., 2002). Наиболее вероятными причинами отрицательных результатов в клинических исследованиях стали кратковременность эффекта паракринных факторов из-за их нестабильности при системном введении, а также наличие побочных эффектов при системном использовании VEGF и FGF-2 в дозах, необходимых для ограничения размера ИМ. По крайней мере частично, эти ограничения можно обойти, используя локальное высвобождение факторов роста (Ruvinov E. et al., 2016). Гидрогели, на основе таких веществ как альгинат и желатин, успешно используются для непрерывной доставки нескольких факторов роста с различной кинетикой высвобождения (Hao X. et al., 2007; Banquet S. et al., 2011; Ruvinov E. et al., 2011). X. Hao и соавт. (2007) исследовали влияние гидрогеля из альгината натрия, содержащего VEGF и PDGF, у крыс с ИМ. Они показали, что интрамиокардиальное введение гидрогеля, включающего оба фактора роста,

приводило к более значимому ангиогенному эффекту и лучшей функции ЛЖ, чем инъекция гидрогелей, избирательно нагруженных VEGF или PDGF. E. Ruvinov и соавт. (2011) исследовали альгинатный гидрогель, обеспечивающий пролонгированное высвобождение IGF-1 и HGF. Эксперименты на животных продемонстрировали увеличение толщины рубца, уменьшение апоптоза и усиление ангиогенеза у животных, которые получали лечение гидрогелем, нагруженным факторами роста, по сравнению с животными, получавшими ФР в физиологическом растворе. Аналогичные результаты были получены с подкожной имплантацией альгинатных каркасов, включающих три фактора роста (VEGF, PDGF и TGF- $\beta$ 1) (Freeman I. et al., 2009).

Однако, эффективность такого применения факторов роста остается умеренной, что не позволяет коренным образом повлиять на прогноз ХСН. Недостаточная эффективность может быть связана с ограниченным спектром применяемых молекул и коротким сроком действия.

Кроме того, микроинкапсулирование МСК может рассматриваться как механизм повышения безопасности клеточной терапии. Изолируя стволовые клетки от микроокружения и предотвращая их встраивание в ткани организма, микроинкапсулирование практически исключает возможность малигнизации, связанной с клеточной терапией.

Настоящее исследование имеет несколько ограничений. Во-первых, в рамках данной работы не производилось мечение МСК и не оценивалась дальнейшая судьба трансплантированных в миокард клеток. Во-вторых, не изучался полный спектр цитокинов и факторов роста, секретируемых МСК, в условиях трансплантации в периинфарктную область.

Полученные в ходе исследования данные создают обоснование для разработки лекарственных форм, представляющих собой комбинации различных паракринных факторов, секретируемых МСК, для терапии ишемической болезни сердца. Такие лекарственные формы в перспективе смогут выступить в качестве альтернативы применению самих стволовых клеток.

## 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 биodeградации, 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 значимо 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 сокращений**

АТФ	аденозинтрифосфат
АФК	активные формы кислорода
ГМК	гладкомышечная клетка
ЖТ	жировая ткань
ЗСЛЖд	задняя стенка левого желудочка в диастолу
ИБС	ишемическая болезнь сердца
ИМ	инфаркт миокарда
ИНФ- $\gamma$	интерферона- $\gamma$
ИФА	иммуноферментный анализ
инк.МСК	микроинкапсулированные мезенхимные стволовые клетки
КДД	конечное диастолическое давление
КДО	конечный диастолический объем
КДР	конечный диастолический размер
КМ	костный мозг
КСД	конечное систолическое давление
КСО	конечный систолический объем
КСР	конечный систолический размер
ИЛ	интерлейкин
ИМ	инфаркт миокарда
ИФА	иммуноферментный анализ
ЛЖ	левый желудочек
ЛКА	левая коронарная артерия
ЛО	ложнооперированные животные
МЖП	межжелудочковая перегородка
МСК	мезенхимные стволовые клетки
МСК-ЖТ	мезенхимные стволовые клетки из жировой ткани

МСК-КМ	мезенхимные стволовые клетки из костного мозга
нат.МСК	Нативные мезенхимные стволовые клетки
ПД	пульсовое давление
ПСЛЖд	передняя стенка левого желудочка в диастолу
ПТ	пароксизмальная тахикардия
РСКС	резидентные стволовые клетки сердца
ФВ	фракция выброса
ФЖ	фибрилляция желудочков
ФНО-α	фактор некроза опухоли - альфа
ФР	фактор роста
ФУ	фракция укорочения
ХСН	хроническая сердечная недостаточность
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭКГ	электрокардиографическое исследование
ЭС	экстрасистола
ЭХО-КГ	эхокардиографическое исследование сердца
Ang-1	angiotensin-1/ангиопэтин-1
BaCl <sub>2</sub>	хлорид бария
CaCl <sub>2</sub>	хлорид кальция
CD	cluster of differentiation / кластер дифференцировки
CXCR 4	C-X-C chemokine receptor type 4 / рецептор 4 типа к C- X-C хемокину
DAPI	4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид
eNOS	endothelial nitric oxide synthase / эндотелиальная синтаза оксида азота
FGF	fibroblast growth factor / фактора роста фибробластов
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor / гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

GLP-1	glucagon-like peptide-1 / глюкагоноподобный пептид - 1
HGF	hepatocyte growth factor / гепатоцитарный фактор роста
HIF-1 $\alpha$	hypoxia-inducible factor - 1 alfa / фактор, индуцируемый гипоксией-1 альфа
HLA	human leukocyte antigen / человеческий лейкоцитарный антиген
HO-1	heme oxygenase-1 / гемоксигеназа 1
ICAM	inter-cellular adhesion molecule / молекула межклеточной адгезии
IGF-1	insulin-like growth factor 1 / инсулиноподобного фактора роста 1
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1 / моноцитарный хемоаттрактантный белок
MEF	myocyte enhancer factor / фактор стимулирующий миоциты
MIP	macrophage inflammatory protein / макрофагальный белок воспаления
MMP	matrix metalloproteinase / матриксная металлопротеиназа
PBS	фосфатный буфер
PDGF	platelet-derived growth factor / тромбоцитарный фактор роста
SDF-1	stromal cell-derived factor-1 / фактор стромальных клеток-1
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor- $\beta$ 1 / трансформирующий фактор роста- $\beta$ 1
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase / эндогенный ингибитор матриксной металлопротеиназы
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule – 1 / молекула адгезии сосудистого эндотелия - 1
VEGF	vascular endothelial growth factor / сосудистый эндотелиальный фактор роста
VLA-4	very late antigen-4 / очень поздний антиген – 4

## Список литературы

1. Берсенев, А.В. Трансплантация клеток пуповинной крови в область повреждения спинного мозга анализ первого клинического наблюдения / А.В. Берсенев // Гены и клетки. – 2006. – Т.1. – №1. – С. 30-31.
2. Богова, О.Т. Инфаркт миокарда. Воспаление и прогноз / О.Т. Богова, И.И. Чукаева // Российский кардиологический журнал. – 2003. – Т.4. – С. 18-23.
3. Бунова, С.С. Динамика заболеваемости инфарктом миокарда в регионах Российской Федерации за 11-летний период (2002–2012) / С.С. Бунова, Е.В. Усачева, О.В. Замахина // Социальные аспекты здоровья населения. – 2014. – Т.6.
4. Волков, А.В. Перспективы создания зуба методами тканевой инженерии / А.В. Волков // Гены и клетки. – 2005. – Т. – №1. – С. 44-45.
5. Головкин, А.С. Динамика сывороточного уровня ростовых факторов при терапии инфаркта миокарда стволовыми мезенхимальными клетками в эксперименте / А.С. Головкин, Е.А. Великанова, В.Г. Матвеева и др. // Гены и клетки. – 2011. – Т.6. – №2. – С. 43-47.
6. Голухова, Е.З. Клеточная терапия в кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии / Е.З. Голухова, Е.Е. Какучая // Креативная кардиология. – 2007. – Т.2. – №1. – С. 55-74.
7. Готье, С.В. Тенденции развития органного донорства и трансплантации в Российской Федерации в 2006–2008 гг. Сообщение I (по данным регистра Российского трансплантологического общества) / С.В. Готье, Я.Г. Мойсюк, О.С. Ибрагимова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2009. – Т.11. – №3. – С. 8-16.
8. Давыденко, В.В. Влияние ауто трансплантации различных клеток костного мозга на морфофункциональное состояние миокарда кролика после инфаркта / В.В. Давыденко, А.А. Матюков, Н.В. Цупкина и др. // Гены и клетки. – 2007. – Т.2. – №2. – С. 52-61.

9. Иванюк, Д.И. Механизмы иммуномодулирующего действия мезенхимных стволовых клеток / Д.И. Иванюк, В.В. Турчин, А.Г. Попандопуло и др. // Гены и клетки. – 2011. – Т.6. – №2. – С. 27-31.
10. Исайкина, Я.И. Исследование в эксперименте *in vitro* иммуномодулирующих свойств мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга / Я.И. Исайкина, Т.В. Шман, О.В. Алейникова // Известия Национальной академии наук Беларуси. – 2012. – Т. – №2. – С. 16-20.
11. Калинина, Н.И. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей / Н.И. Калинина, В.Ю. Сысоева, К.А. Рубина и др. // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2011. – Т.3. – №4. – С. 32-39.
12. Кирик, В.М. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине (обзор литературы) / В.М. Кирик, Г.М. Бутенко // Ж. Акад. мед. наук України. – 2010. – Т.16. – №16. – С. 576-604.
13. Коноплянников, М.А. Стволовые клетки для терапии ишемической болезни сердца: достижения и перспективы / М.А. Коноплянников, В.А. Кальсин, А.В. Аверьянов // Клин. практика. – 2012. – Т. – №3. – С. 63-73.
14. Константинова, Е.В. Клеточные и молекулярные механизмы воспаления в патогенезе инфаркта миокарда / Е.В. Константинова, Н.А. Константинова // Вестник РГМУ. – 2010. – Т. – №1. – С. 60-64.
15. Космачева, Е.Д. Осложнения в послеоперационном периоде у пациентов, перенесших ортотопическую трансплантацию сердца / Е.Д. Космачева, Н.В. Кижватова, Е.В. Гордеева и др. // Клиническая медицина. – 2014. – Т.92. – №4. – С. 30-34.
16. Космачёва, С.М. Стволовые клетки взрослых: проблемы получения, дифференцировки *in vitro*, перспективы клинического применения / С.М. Космачёва, М.В. Волк, М.П. Потапнев // Медицинские новости. – 2008. – Т.9. – С. 5-9.

17. Кривошеков, Е.В. Клинико-функциональные аспекты хирургического лечения ишемической кардиомиопатии: дис.... д-ра мед. наук : 14.01.05; 14.01.26 / Кривошеков, Евгений Владимирович. – Томск, 2010 – 261с.
18. Кругляков, К.В. Дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток в кардиомиоцитарном направлении *in vitro* и *in vivo* / К.В. Кругляков, И.Б. Соколова, К.Н. Зинькова и др. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2006. – Т. – №4. – С. 194-197.
19. Кругляков, П.В. Терапия экспериментального инфаркта миокарда у крыс с помощью трансплантации сингенных мезенхимных стволовых клеток / П.В. Кругляков, И.Б. Соколова, Х.К. Аминева и др. // Цитология. – 2004. – Т.46. – №12. – С. 1043-1054.
20. Куртова, А.В. Постинфарктная клеточная регенерационная терапия сердечной мышцы / А.В. Куртова, Е.Е. Зуева, А.С. Немков // Гены и клетки. – 2006. – Т.1. – №2. – С. 35-43.
21. Маслов, Л.Н. Гипоксическое прекондиционирование стволовых клеток как новый подход к повышению эффективности клеточной терапии инфаркта миокарда / Л.Н. Маслов, Ю.К. Подоксенов, А.Г. Портниченко и др. // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – Т.68. – №12. – С. 16-25.
22. Матюков, А.А. Влияние интрамиокардиальной аутооттрансплантации клеток костного мозга на перфузию ишемизированного миокарда в эксперименте / А.А. Матюков // Гены и клетки. – 2006. – Т.1. – №3. – С. 42-47.
23. Матюков, А.А. Сравнение влияния интрамиокардиальной аутооттрансплантации различных клеток костного мозга на репарацию миокарда кроликов после инфаркта / А.А. Матюков, Н.В. Цупкина, Т.Д. Власов и др. // Гены и клетки. – 2007. – Т.2. – №1. – С. 48-52.
24. Маянская, И.В. Иммуносупрессивное действие мезенхимальных стволовых (стромальных) клеток / И.В. Маянская, А.Ю. Гоганова, Н.И. Толкачева и др. // Иммунология. – 2013. – Т.34. – №2. – С. 122-128.
25. Михайличенко, В.Ю. Ангиогенез при инфаркте миокарда и его коррекция трансплантацией мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток в

- эксперименте / В.Ю. Михайличенко, С.А. Самарин // Кубанский научный медицинский вестник. – 2015. – Т.151. – №2 –С. 98-105.
26. Осипова, О.А. Особенности ремоделирования миокарда левого желудочка и развитие хронической сердечной недостаточности у больных постинфарктным кардиосклерозом / О.А. Осипова // Современные наукоемкие технологии. – 2006. – №8. – С. 49-51.
27. Остроумов, Е.Н. Трансплантация сердца или реконструкция левого желудочка у больной ишемической болезнью, осложненной сердечной недостаточностью и электрическим штормом: роль томосцинтиграфии с фазовыми изображениями / Е.Н. Остроумов, Д.В. Шумаков, С.П. Голицын и др. // Российский медицинский журнал. – 2014. – №5. – С. 16-22.
28. Ощепкова, Е.В. Заболеваемость и смертность от инфаркта миокарда в Российской Федерации в 2000-2011 гг / Е.В. Ощепкова, Ю.Е. Ефремова, Ю.А. Карпов // Терапевтический архив. – 2013. – Т.85. – №4. – С. 4-10.
29. Петренко, А.Ю. Стволовые клетки из жировой ткани / А.Ю. Петренко, Э.Н. Иванов, Ю.А. Петренко // *Biotechnologia Acta*. – 2008. – Т.4. – №1. – С. 39-48.
30. Плотников, Е.Ю. Стволовые клетки в регенеративной терапии сердечных заболеваний: роль межклеточных взаимодействий / Е.Ю. Плотников, Д.Б. Зоров, Г.Т. Сухих // Гены и клетки. – 2009. – Т.4. – №1. – С. 43-49.
31. Повещенко, О.В. Способы выделения и условия культивирования мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека, полученной из различных источников / О.В. Повещенко, А.П. Колесников, И.И. Ким и др. // Сибирский научный медицинский журнал. – 2008. – №5. – С. 90-95.
32. Рубцов, Ю.П. Регуляция иммунитета мультипотентными мезенхимными стромальными клетками / Ю.П. Рубцов, Ю.Г. Суздальцева, К.В. Горюнов и др. // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). – 2012. – Т.4. – №1. – С. 24-33.
33. Сагарадзе, Г.Д. Терапевтический потенциал секреторных компонентов мезенхимных стромальных клеток человека: проблема стандартизации / Г.Д. Сагарадзе, О.А. Григорьева, А.Ю. Ефименко и др. // Биомедицинская химия. – 2015. – Т.61. – №6. – С. 750-759.

34. Сергеев, В.С. Иммунологические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / В.С. Сергеев // Гены и клетки. – 2005. – №2. – С. 39-42.
35. Сергеева, Л.И. Общие закономерности и патогенетическая значимость постинфарктного ремоделирования в прогрессировании хронической сердечной недостаточности / Л.И. Сергеева, Н.И. Панёв // Сибирский научный медицинский журнал. – 2008. – №5.
36. Соколова, И.Б., Механизмы воздействия экзогенных мезенхимных стволовых клеток на ишемизированную ткань при сердечно-сосудистых заболеваниях / И.Б. Соколова, Н.Н. Павличенко // Цитология. – 2010. – Т.52. – №11. – С. 911-917.
37. Солнышков, С.К. Об эффективности коронарной реваскуляризации больных острым инфарктом миокарда при поздней госпитализации / С.К. Солнышков // Вестник Ивановской медицинской академии. – 2012. – Т.17. – №4. – С. 55-62.
38. Сухих, Г.Т. Мезенхимальные стволовые и прогени торные клетки. Биологические свойства и перспективы использования / Г.Т. Сухих, Н.Я. Спивак, В.В. Малайцев и др. // Фізіол. журн. – 2007. – Т.53. – №1. – С. 62-76.
39. Терещенко, С.Н. Лечение острого коронарного синдрома с подъемом сегмента ST на догоспитальном этапе оказания медицинской помощи / С.Н. Терещенко, И.В. Жиров // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2010. – Т.6. – №3. – С. 363-369.
40. Хулуп, Г.Я. Дифференцировочные и иммуномодулирующие свойства мезенхимальных стволовых клеток как потенциальные механизмы положительного действия при инфаркте миокарда / Г.Я. Хулуп, С.Ю. Мастицкая, М.М. Зафранская и др. // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2009. – Т.8. – №1. – С. 1-23.
41. Чернявский, А.М. Сравнительная морфофункциональная оценка различных методов непрямой реваскуляризации миокарда в эксперименте / А.М. Чернявский, П.М. Ларионов, В.Ю. Бондарь и др. // Медицина и образование в Сибири. – 2012. – №2.

42. Чукаева, И.И. Инфаркт миокарда и воспаление / И.И. Чукаева, О.Т. Богова, И.М. Корочкин и др. // Медицина неотложных состояний. – 2007. – Т.11. – №4. – С. 19-23.
43. Шаблий, В.А. Кримоконсервирование ткани плаценты человека источник гемопоэтических прогениторных клеток и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток / В.А. Шаблий, М.Д. Кучма, В.М. Кирик и др. // Гены и клетки. – 2012. – Т.7. – №1. – С. 54-62.
44. Шальнова, С.А. Анализ смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в 12 регионах Российской Федерации, участвующих в исследовании «Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России» / С.А. Шальнова, А.О. Конради, Ю.А. Карпов и др. // Российский кардиологический журнал. – 2012. – Т.5. – №97. – С. 6-11.
45. Шахпазян, Н.К. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения / Н.К. Шахпазян, Т.А. Астрелина, М.В. Яковлева // Гены и клетки. – 2012. – Т.7. – №1. – С. 23-33.
46. Шевченко, А.О. Отторжение сердечного трансплантата и неинвазивные показатели функционального состояния стенки общей сонной артерии / А.О. Шевченко, И.Ю. Тюняева, А.А. Насырова и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2015. – №1. – С. 5-11.
47. Шевченко, Е.К. Эффективная трансдукция стромальных клеток жировой ткани человека с помощью рекомбинантного аденоассоциированного вируса / Е.К. Шевченко, П.И. Макаревич, З.И. Цоколаева и др. // Гены и клетки. – 2010. – Т.5. – №1. – С. 60-64.
48. Шевченко, Е.К. Перспективы повышения эффективности генной и клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний: генетически модифицированные клетки / Е.К. Шевченко, А.К. Талицкий, Е.В. Парфенова // Гены и клетки. – 2010. – Т.5. – №2. – С. 19-28.
49. Шурыгин, М.Г. Ангиогенез как адаптивный механизм при ишемии / М.Г. Шурыгин, И.А. Шурыгина, Н.Н. Дремина и др. // Бюллетень Восточно-

Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2013. – Т.93. – №5 – С. 192-195.

50. Эстрин, С.И. Сравнительная оценка интракоронарного и внутривенного введения мезенхимальных стволовых клеток при рефрактерной стенокардии / С.И. Эстрин // Вісник серцево-судинної хірургії. – 2014. – Т. – №22. – С. 410-412.

51. Эстрин, С.И. Сравнительный анализ трансэндокардиального и интракоронарного введения мезенхимальных стволовых клеток при рефрактерной стенокардии / С.И. Эстрин, В.Ю. Михайличенко // Таврический медико-биологический вестник. – 2014. – Т.17. – №2. – С. 146-149.

52. Acquistapace, A. Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer / A. Acquistapace, T. Bru, P.F. Lesault et al. // Stem Cells. – 2011. – Vol. 29. – №5. – P. 812-824.

53. Afzal, M.R. Adult Bone Marrow Cell Therapy for Ischemic Heart Disease: Evidence and Insights From Randomized Controlled Trials / M.R. Afzal, A. Samanta, Z.I. Shah et al. // Circ Res. – 2015. – Vol. 117. – №6. – P. 558-575.

54. Alpert, J.S. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction / J.S. Alpert, K. Thygesen, E. Antman et al. // J Am Coll Cardiol. – 2000. – Vol. 36. – №3. – P. 959-969.

55. Amsalem, Y. Iron-oxide labeling and outcome of transplanted mesenchymal stem cells in the infarcted myocardium / Y. Amsalem, Y. Mardor, M.S. Feinberg et al. // Circulation. – 2007. – Vol. 116. – №11 Suppl. – P. I38-45.

56. Arminan, A. Mesenchymal stem cells provide better results than hematopoietic precursors for the treatment of myocardial infarction / A. Arminan, C. Gandia, J.M. Garcia-Verdugo et al. // J Am Coll Cardiol. – 2010. – Vol. 55. – №20. – P. 2244-2253.

57. Arslan, F. Innate immune signaling in cardiac ischemia / F. Arslan, D.P. de Kleijn, G. Pasterkamp // Nat Rev Cardiol. – 2011. – Vol. 8. – №5. – P. 292-300.

58. Bagno, L.L. Oliveira et al. Adipose-derived stromal cell therapy improves cardiac function after coronary occlusion in rats / L.L. Bagno, J.P. Werneck-de-Castro, P.F. Oliveira et al. // *Cell Transplant.* – 2012. – Vol. 21. – №9. – P. 1985-1996.
59. Assis, A.C. Time-dependent migration of systemically delivered bone marrow mesenchymal stem cells to the infarcted heart / A.C. Assis, J.L. Carvalho, B.A. Jacoby et al. // *Cell Transplant.* – 2010. – Vol. 19. – №2. – P. 219-230.
60. Bagno, L.L. Adipose-derived stromal cell therapy improves cardiac function after coronary occlusion in rats / L.L. Bagno, J.P. Werneck-de-Castro, P.F. Oliveira et al. // *Cell Transplant.* – 2012. – Vol. 21. – №9. – P. 1985-1996.
61. Banovic, M. Brachial approach to NOGA-guided procedures: electromechanical mapping and transendocardial stem-cell injections / M. Banovic, M.C. Ostojic, J. Bartunek et al. // *Tex Heart Inst J.* – 2011. – Vol. 38. – №2. – P. 179-182.
62. Banquet, S. Arteriogenic therapy by intramyocardial sustained delivery of a novel growth factor combination prevents chronic heart failure / S. Banquet, E. Gomez, L. Nicol et al. // *Circulation.* – 2011. – Vol. 124. – №9. – P. 1059-1069.
63. Barbash, I.M. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution / I.M. Barbash, P. Chouraqui, J. Baron et al. // *Circulation.* – 2003. – Vol. 108. – №7. – P. 863-868.
64. Berry, M.F. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance / M.F. Berry, A.J. Engler, Y.J. Woo et al. // *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.* – 2006. – Vol. 290. – №6. – P. H2196-H2203.
65. Braga, L.M. Systemic delivery of adult stem cells improves cardiac function in spontaneously hypertensive rats / L.M. Braga, K. Rosa, B. Rodrigues et al. // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2008. – Vol. 35. – №2. – P. 113-119.
66. Bramucci, E. Effectiveness of adjunctive stent implantation following directional coronary atherectomy for treatment of left anterior descending ostial stenosis / E. Bramucci, A. Repetto, M. Ferrario et al. // *Am J Cardiol.* – 2002. – Vol. 90. – №10. – P. 1074-1078.

67. Cai, B. Bone marrow mesenchymal stem cells protected post-infarcted myocardium against arrhythmias via reversing potassium channels remodelling / B. Cai, G. Wang, N. Chen et al. // *J Cell Mol Med.* – 2014. – Vol. 18. – №7. – P. 1407-1416.
68. Carmeliet, P. Angiogenesis in cancer and other diseases / P. Carmeliet, R.K. Jain // *Nature.* – 2000. – Vol. 407. – №6801. – P. 249-257.
69. Cashman, T.J. Mesenchymal stem cells for cardiac therapy: practical challenges and potential mechanisms / T.J. Cashman, V. Gouon-Evans, K.D. Costa // *Stem Cell Rev.* – 2013. – Vol. 9. – №3. – P. 254-265.
70. Ceccaldi, C. Evaluation of polyelectrolyte complex-based scaffolds for mesenchymal stem cell therapy in cardiac ischemia treatment / C. Ceccaldi, R. Bushkalova, C. Alfarano et al. // *Acta Biomater.* – 2014. – Vol. 10. – №2. – P. 901-911.
71. Chacko, S.M. Myocardial oxygenation and functional recovery in infarct rat hearts transplanted with mesenchymal stem cells / S.M. Chacko, M. Khan, M.L. Kuppusamy et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2009. – Vol. 296. – №5. – P. H1263-1273.
72. Chang, M.G. Proarrhythmic potential of mesenchymal stem cell transplantation revealed in an in vitro coculture model / M.G. Chang, L. Tung, R.B. Sekar et al. // *Circulation.* – 2006. – Vol. 113. – №15. – P. 1832-1841.
73. Chang, W. Anti-death strategies against oxidative stress in grafted mesenchymal stem cells / W. Chang, B.W. Song, J.Y. Moon et al. // *Histol Histopathol.* – 2013. – Vol. 28. – №12. – P. 1529-1536.
74. Chazaud, B. Endoventricular porcine autologous myoblast transplantation can be successfully achieved with minor mechanical cell damage / B. Chazaud, L. Hittinger, C. Sonnet et al. // *Cardiovasc Res.* – 2003. – Vol. 58. – №2. – P. 444-450.
75. Chen, G. Mesenchymal Stem Cells and Mononuclear Cells From Cord Blood: Cotransplantation Provides a Better Effect in Treating Myocardial Infarction / G. Chen, A. Yue, H. Yu et al. // *Stem Cells Transl Med.* – 2016. – Vol. 5. – №3. – P. 350-357.
76. Chen, C.H. Novel living cell sheet harvest system composed of thermoreversible methylcellulose hydrogels / C.H. Chen, C.C. Tsai, W. Chen et al. // *Biomacromolecules.* – 2006. – Vol. 7. – №3. – P. 736-743.

77. Chen, J. Injection of composite with bone marrow-derived mesenchymal stem cells and a novel synthetic hydrogel after myocardial infarction: a protective role in left ventricle function / J. Chen, R. Guo, Q. Zhou et al. // *Kaohsiung J Med Sci.* – 2014. – Vol. 30. – №4. – P. 173-180.
78. Chen, S.L. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction / S.L. Chen, W.W. Fang, F. Ye et al. // *Am J Cardiol.* – 2004. – Vol. 94. – №1. – P. 92-95.
79. Chen, X. Dynamic Tracking of Injected Mesenchymal Stem Cells after Myocardial Infarction in Rats: A Serial 7T MRI Study / X. Chen, M. Lu, N. Ma et al. // *Stem Cells Int.* – 2016. – Vol. 2016. – P. 4656539.
80. Dai, W. Role of a paracrine action of mesenchymal stem cells in the improvement of left ventricular function after coronary artery occlusion in rats / W. Dai, S.L. Hale, R.A. Kloner // *Regen Med.* – 2007. – Vol. 2. – №1. – P. 63-68.
81. Dai, W. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects / W. Dai, S.L. Hale, B.J. Martin et al. // *Circulation.* – 2005. – Vol. 112. – №2. – P. 214-223.
82. Damman, P. 2015 ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: comments from the Dutch ACS working group / P. Damman, A.W. van 't Hof, J.M. Ten Berg et al. // *Neth Heart J.* – 2016. – Vol. 10.1007/s12471-016-0939-y.
83. De Bari, C. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane / C. De Bari, F. Dell'Accio, P. Tylzanowski et al. // *Arthritis Rheum.* – 2001. – Vol. 44. – №8. – P. 1928-1942.
84. de Jong, R. Intracoronary stem cell infusion after acute myocardial infarction: a meta-analysis and update on clinical trials / R. de Jong, J.H. Houtgraaf, S. Samiei et al. // *Circ Cardiovasc Interv.* – 2014. – Vol. 7. – №2. – P. 156-167.
85. de Moraes Sdel, B. Mesenchymal Stem Cells Improve Heart Rate Variability and Baroreflex Sensitivity in Rats with Chronic Heart Failure / B. de Moraes Sdel, L.E. da Silva, R.M. Lataro et al. // *Stem Cells Dev.* – 2015. – Vol. 24. – №18. – P. 2181-2192.

86. de Vos, P. Chemistry and biocompatibility of alginate-PLL capsules for immunoprotection of mammalian cells / P. de Vos, C.G. Hoogmoed, H.J. Busscher // *J Biomed Mater Res.* – 2002. – Vol. 60. – №2. – P. 252-259.
87. Di Nicola, M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli / M. Di Nicola, C. Carlo-Stella, M. Magni et al. // *Blood.* – 2002. – Vol. 99. – №10. – P. 3838-3843.
88. Dmitrieva, R.I. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities / R.I. Dmitrieva, I.R. Minullina, A.A. Bilibina et al. // *Cell Cycle.* – 2012. – Vol. 11. – №2. – P. 377-383.
89. Dominici, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller et al. // *Cytotherapy.* – 2006. – Vol. 8. – №4. – P. 315-317.
90. Du, Y.Y. Immuno-inflammatory regulation effect of mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of myocardial infarction / Y.Y. Du, S.H. Zhou, T. Zhou et al. // *Cytotherapy.* – 2008. – Vol. 10. – №5. – P. 469-478.
91. Ducret, M. Immunophenotyping Reveals the Diversity of Human Dental Pulp Mesenchymal Stromal Cells In vivo and Their Evolution upon In vitro Amplification / M. Ducret, H. Fabre, O. Degoul et al. // *Front Physiol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 512.
92. Eliopoulos, N. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice / N. Eliopoulos, J. Stagg, L. Lejeune et al. // *Blood.* – 2005. – Vol. 106. – №13. – P. 4057-4065.
93. Eun, L.Y. Implanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells fail to metabolically stabilize or recover electromechanical function in infarcted hearts / L.Y. Eun, H. Song, E. Choi et al. // *Tissue Cell.* – 2011. – Vol. 43. – №4. – P. 238-245.
94. Fan, M. The effect of age on the efficacy of human mesenchymal stem cell transplantation after a myocardial infarction / M. Fan, W. Chen, W. Liu et al. // *Rejuvenation Res.* – 2010. – Vol. 13. – №4. – P. 429-438.
95. Feygin, J. Functional and bioenergetic modulations in the infarct border zone following autologous mesenchymal stem cell transplantation / J. Feygin, A. Mansoor, P.

Eckman et al. // *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. – 2007. – Vol. 293. – №3. – P. H1772-H1780.

96. Fiumana, E. Localization of mesenchymal stem cells grafted with a hyaluronan-based scaffold in the infarcted heart / E. Fiumana, G. Pasquinelli, L. Foroni et al. // *J Surg Res*. – 2013. – Vol. 179. – №1. – P. e21-29.

97. Frangogiannis, N.G. Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts / N.G. Frangogiannis // *Curr Med Chem*. – 2006. – Vol. 13. – №16. – P. 1877-1893.

98. Frangogiannis, N.G. The inflammatory response in myocardial infarction / N.G. Frangogiannis, C.W. Smith, M.L. Entman // *Cardiovasc Res*. – 2002. – Vol. 53. – №1. – P. 31-47.

99. Freeman, I. The influence of the sequential delivery of angiogenic factors from affinity-binding alginate scaffolds on vascularization / I. Freeman, S. Cohen // *Biomaterials* – 2009. – Vol. 30. – №11. – P. 2122-2131.

100. Freyman, T. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction / T. Freyman, G. Polin, H. Osman et al. // *Eur Heart J*. – 2006. – Vol. 27. – №9. – P. 1114-1122.

101. Fukushima, S. Direct intramyocardial but not intracoronary injection of bone marrow cells induces ventricular arrhythmias in a rat chronic ischemic heart failure model / S. Fukushima, A. Varela-Carver, S.R. Coppen et al. // *Circulation*. – 2007. – Vol. 115. – №17. – P. 2254-2261.

102. Gandia, C. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction / C. Gandia, A. Arminan, J.M. Garcia-Verdugo et al. // *Stem Cells*. – 2008. – Vol. 26. – №3. – P. 638-645.

103. Gao, F. A promising strategy for the treatment of ischemic heart disease: Mesenchymal stem cell-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer in rats / F. Gao, T. He, H. Wang et al. // *Can J Cardiol*. – 2007. – Vol. 23. – №11. – P. 891-898.

104. Garikipati, V.N. Mesenchymal stem cells from fetal heart attenuate myocardial injury after infarction: an in vivo serial pinhole gated SPECT-CT study in rats / V.N. Garikipati, S. Jadhav, L. Pal et al. // PLoS One. – 2014. – Vol. 9. – №6. – P. e100982.
105. Ge, L, Jiang M, Duan D, Secretome of Olfactory Mucosa Mesenchymal Stem Cell, a Multiple Potential Stem Cell / L. Ge, M. Jiang, D. Duan et al. // Stem Cells Int. – 2016. – art.no 1243659.
106. Gneocchi, M. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells / M. Gneocchi, H. He, O.D. Liang et al. // Nat Med. – 2005. – Vol. 11. – №4. – P. 367-368.
107. Gneocchi, M. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy / M. Gneocchi, Z. Zhang, A. Ni et al. // Circ Res. – 2008. – Vol. 103. – №11. – P. 1204-1219.
108. Gonzalez-Vilchez, F. Spanish Heart Transplantation Registry. 26th Official Report of the Spanish Society of Cardiology Working Group on Heart Failure and Heart Transplantation (1984-2014) / F. Gonzalez-Vilchez, J. Segovia Cubero, L. Almenar et al. // Rev Esp Cardiol (Engl Ed). – 2015. – Vol. 68. – №11. – P. 1008-1021.
109. Grinnemo, K.H. Human mesenchymal stem cells do not differentiate into cardiomyocytes in a cardiac ischemic xenomodel / K.H. Grinnemo, A. Mansson-Broberg, K. Leblanc et al. // Ann Med. – 2006. – Vol. 38. – №2. – P. 144-153.
110. Gronthos, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo / S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahimi et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2000. – Vol. 97. – №25. – P. 13625-13630.
111. Guo, Y. Locally overexpressing hepatocyte growth factor prevents post-ischemic heart failure by inhibition of apoptosis via calcineurin-mediated pathway and angiogenesis / Y. Guo, J. He, J. Wu et al. // Arch Med Res. – 2008. – Vol. 39. – №2. – P. 179-188.
112. Haack, M.L. Treatment options in end-stage heart failure: where to go from here? / M.L. Haack, G.E. Hoogslag, S.F. Rodrigo et al. // Neth Heart J. – 2012. – Vol. 20. – №4. – P. 167-175.

113. Hakuno, D. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors / D. Hakuno, K. Fukuda, S. Makino et al. // *Circulation*. – 2002. – Vol. 105. – №3. – P. 380-386.
114. Hale, S.L. Mesenchymal stem cell administration at coronary artery reperfusion in the rat by two delivery routes: a quantitative assessment / S.L. Hale, W. Dai, J.S. Dow et al. // *Life Sci*. – 2008. – Vol. 83. – №13-14. – P. 511-515.
115. Hao, X. Angiogenic effects of sequential release of VEGF-A165 and PDGF-BB with alginate hydrogels after myocardial infarction / X. Hao, E.A. Silva, A. Mansson-Broberg et al. // *Cardiovasc. Res*. – 2007. – Vol. 75. – №1. – P. 178-185.
116. Hatzistergos, K.E. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation / K.E. Hatzistergos, H. Quevedo, B.N. Oskouei et al. // *Circ Res*. – 2010. – Vol. 107. – №7. – P. 913-922.
117. Hatzistergos, K.E. Stimulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells on cKit+ Cardiac Stem Cells Are Mediated by SDF1/CXCR4 and SCF/cKit Signaling Pathways / K.E. Hatzistergos, D. Saur, B. Seidler et al. // *Circ Res*. – 2016. – Vol. 119. – №8. – P. 921-930.
118. Haynesworth, S.E. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha / S.E. Haynesworth, M.A. Baber, A.I. Caplan // *J Cell Physiol*. – 1996. – Vol. 166. – №3. – P. 585-592.
119. Henry, T.D. Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis / T.D. Henry, B.H. Annex, G.R. McKendall // *Circulation* – 2003. – Vol. 107. – №10. – P. 1359-1365.
120. Hou, M. Transplantation of mesenchymal stem cells from human bone marrow improves damaged heart function in rats / M. Hou, K.M. Yang, H. Zhang et al. // *Int J Cardiol*. – 2007. – Vol. 115. – №2. – P. 220-228.
121. Hou, D., Brinton et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials / D. Hou, E.A. Youssef, T.J. Brinton et al. // *Circulation*. – 2005. – Vol. 112. – №9 Suppl. – P. I150-156.

122. Hu, X. Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction / X. Hu, J. Wang, J. Chen et al. // *Eur J Cardiothorac Surg.* – 2007. – Vol. 31. – №3. – P. 438-443.
123. Hu, X. Fraser et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis / X. Hu, S.P. Yu, J.L. Fraser et al. // *J Thorac Cardiovasc Surg.* – 2008. – Vol. 135. – №4. – P. 799-808.
124. Huang, C.C. A translational approach in using cell sheet fragments of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cellular cardiomyoplasty in a porcine model / C.C. Huang, H.W. Tsai, W.Y. Lee et al. // *Biomaterials.* – 2013. – Vol. 34. – №19. – P. 4582-4591.
125. Huang, X.P. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair / X.P. Huang, Z. Sun, Y. Miyagi et al. // *Circulation.* – 2010. – Vol. 122. – №23. – P. 2419-2429.
126. Hwangbo, S. Therapeutic potential of human adipose stem cells in a rat myocardial infarction model / S. Hwangbo, J. Kim, S. Her et al. // *Yonsei Med J.* – 2010. – Vol. 51. – №1. – P. 69-76.
127. Imanishi, Y. Allogenic mesenchymal stem cell transplantation has a therapeutic effect in acute myocardial infarction in rats / Y. Imanishi, A. Saito, H. Komoda et al. // *J Mol Cell Cardiol.* – 2008. – Vol. 44. – №4. – P. 662-671.
128. In 't Anker, P.S. Kleijburg-van der Keur et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation / P.S. In 't Anker, S.A. Scherjon, C. Kleijburg-van der Keur et al. // *Blood.* – 2003. – Vol. 102. – №4. – P. 1548-1549.
129. Iso, Y. Serrano et al. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment / Y. Iso, J.L. Spees, C. Serrano et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2007. – Vol. 354. – №3. – P. 700-706.
130. Izadpanah, R. Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells / R. Izadpanah, D. Kaushal, C. Kriedt et al. // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68. – №11. – P. 4229-4238.

131. Jain, M. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction / M. Jain, H. DerSimonian, D.A. Brenner et al. // *Circulation*. – 2001. – Vol. 103. – №14. – P. 1920-1927.
132. Jaquet, K. Reduction of myocardial scar size after implantation of mesenchymal stem cells in rats: what is the mechanism? / K. Jaquet, K.T. Krause, J. Denschel et al. // *Stem Cells Dev*. – 2005. – Vol. 14. – №3. – P. 299-309.
133. Jiang, C.Y. Optimal time for mesenchymal stem cell transplantation in rats with myocardial infarction / C.Y. Jiang, C. Gui, A.N. He et al. // *J Zhejiang Univ Sci B*. – 2008. – Vol. 9. – №8. – P. 630-637.
134. Jiang, S. Transcriptional profiling of young and old mesenchymal stem cells in response to oxygen deprivation and reparability of the infarcted myocardium / S. Jiang, H. Kh Haider, R.P. Ahmed et al. // *J Mol Cell Cardiol*. – 2008. – Vol. 44. – №3. – P. 582-596.
135. Jiang, W. Homing and differentiation of mesenchymal stem cells delivered intravenously to ischemic myocardium in vivo: a time-series study / W. Jiang, A. Ma, T. Wang et al. // *Pflugers Arch*. – 2006. – Vol. 453. – №1. – P. 43-52.
136. Jin, J. Transplantation of mesenchymal stem cells within a poly(lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold improves cardiac function in a rat myocardial infarction model / J. Jin, S.I. Jeong, Y.M. Shin et al. // *Eur J Heart Fail*. – 2009. – Vol. 11. – №2. – P. 147-153.
137. Jin, P. Central zone of myocardial infarction: a neglected target area for heart cell therapy / P. Jin, E. Wang, Y.H. Wang et al. // *J Cell Mol Med*. – 2012. – Vol. 16. – №3. – P. 637-648.
138. Kai, D. Stem cell-loaded nanofibrous patch promotes the regeneration of infarcted myocardium with functional improvement in rat model / D. Kai, Q.L. Wang, H.J. Wang et al. // *Acta Biomater*. – 2014. – Vol. 10. – №6. – P. 2727-2738.
139. Kim, Y.S. TNF-alpha enhances engraftment of mesenchymal stem cells into infarcted myocardium / Y.S. Kim, H.J. Park, M.H. Hong et al. // *Front Biosci (Landmark Ed)*. – 2009. – Vol. 14. – P. 2845-2856.

140. Kinnaird, T. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms / T. Kinnaird, E. Stabile, M.S. Burnett et al. // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109. – №12. – P. 1543-1549.
141. Lai, P.F. Mesenchymal stem cell transplantation mitigates electrophysiological remodeling in a rat model of myocardial infarction / P.F. Lai, B.K. Panama, S. Masse et al. // *J Cardiovasc Electrophysiol*. – 2013. – Vol. 24. – №7. – P. 813-821.
142. Lama, V.N. Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts / V.N. Lama, L. Smith, L. Badri et al. // *J Clin Invest*. – 2007. – Vol. 117. – №4. – P. 989-996.
143. Lavorato, V.N. Mesenchymal stem cell therapy associated with endurance exercise training: Effects on the structural and functional remodeling of infarcted rat hearts / V.N. Lavorato, R.J. Del Carlo, D.N. da Cunha et al. // *J Mol Cell Cardiol*. – 2016. – Vol. 90. – P. 111-119.
144. Le Visage, C. Mesenchymal stem cell delivery into rat infarcted myocardium using a porous polysaccharide-based scaffold: a quantitative comparison with endocardial injection / C. Le Visage, O. Gournay, N. Benguirat et al. // *Tissue Eng Part A*. – 2012. – Vol. 18. – №1-2. – P. 35-44.
145. Lee, E.J. Spherical bullet formation via E-cadherin promotes therapeutic potency of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood for myocardial infarction / E.J. Lee, S.J. Park, S.K. Kang et al. // *Mol Ther*. – 2012. – Vol. 20. – №7. – P. 1424-1433.
146. Lee, H.W. Effects of Intracoronary Administration of Autologous Adipose Tissue-Derived Stem Cells on Acute Myocardial Infarction in a Porcine Model / H.W. Lee, H.C. Lee, J.H. Park et al. // *Yonsei Med J*. – 2015. – Vol. 56. – №6. – P. 1522-1529.
147. Lee, S. Cell adhesion and long-term survival of transplanted mesenchymal stem cells: a prerequisite for cell therapy / S. Lee, E. Choi, M.J. Cha et al. // *Oxid Med Cell Longev*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 632902.

148. Lee, Y.S. Human Mesenchymal Stem Cell Delivery System Modulates Ischemic Cardiac Remodeling With an Increase of Coronary Artery Blood Flow / Y.S. Lee, W.S. Joo, H.S. Kim et al. // *Mol Ther.* – 2016. – Vol. 24. – №4. – P. 805-811.
149. Leri, A. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration / A. Leri, J. Kajstura, P. Anversa // *Physiol Rev.* – 2005. – Vol. 85. – №4. – P. 1373-1416.
150. Levit, R.D. Cellular encapsulation enhances cardiac repair / R.D. Levit, N. Landazuri, E.A. Phelps et al. // *J Am Heart Assoc.* – 2013. – Vol. 2. – №5. – P. e000367.
151. Li, C.Y. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy / C.Y. Li, X.Y. Wu, J.B. Tong et al. // *Stem Cell Res Ther.* – 2015. – Vol. 6. – P. 55.
152. Li, L. Aging increases the susceptibility of MSCs to reactive oxygen species and impairs their therapeutic potency for myocardial infarction / L. Li, Y. Guo, H. Zhai et al. // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – №11. – P. e111850.
153. Li, Q. Thomas et al. Intra-myocardial delivery of mesenchymal stem cells ameliorates left ventricular and cardiomyocyte contractile dysfunction following myocardial infarction / Q. Li, S. Turdi, D.P. Thomas et al. // *Toxicol Lett.* – 2010. – Vol. 195. – №2-3. – P. 119-126.
154. Li, R. Clinical efficacy and safety of autologous stem cell transplantation for patients with ST-segment elevation myocardial infarction / R. Li, X.M. Li, J.R. Chen // *Ther Clin Risk Manag.* – 2016. – Vol. 12. – P. 1171-1189.
155. Li, Z. Paracrine role for mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction / Z. Li, J. Guo, Q. Chang et al. // *Biol Pharm Bull.* – 2009. – Vol. 32. – №8. – P. 1343-1346.
156. Lim, F. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas / F. Lim, A.M. Sun // *Science.* – 1980. – Vol. 210. – №4472. – P. 908-910.
157. Liu, B. Effectiveness and safety of selected bone marrow stem cells on left ventricular function in patients with acute myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled trials / B. Liu, C.Y. Duan, C.F. Luo et al. // *Int J Cardiol.* – 2014. – Vol. 177. – №3. – P. 764-770.

158. Liu, B.H. Spheroid formation and enhanced cardiomyogenic potential of adipose-derived stem cells grown on chitosan / B.H. Liu, H.Y. Yeh, Y.C. Lin et al. // *Biores Open Access*. – 2013. – Vol. 2. – №1. – P. 28-39.
159. Liu, J.F. Human mesenchymal stem cells improve myocardial performance in a splenectomized rat model of chronic myocardial infarction / J.F. Liu, B.W. Wang, H.F. Hung et al. // *J Formos Med Assoc*. – 2008. – Vol. 107. – №2. – P. 165-174.
160. Liu, Y. Impaired cardioprotective function of transplantation of mesenchymal stem cells from patients with diabetes mellitus to rats with experimentally induced myocardial infarction / Y. Liu, Z. Li, T. Liu et al. // *Cardiovasc Diabetol*. – 2013. – Vol. 12. – P. 40.
161. Liu, Y. Advanced age impairs cardioprotective function of mesenchymal stem cell transplantation from patients to myocardially infarcted rats / Y. Liu, T. Liu, J. Han et al. // *Cardiology*. – 2014. – Vol. 128. – №2. – P. 209-219.
162. Loffredo, F. Therapeutic vasculogenesis: it takes two / F. Loffredo, R.T. Lee // *Circ Res*. – 2008. – Vol. 103. – №2. – P. 128-130.
163. Lopez, J.J. VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs / J.J. Lopez, R.J. Laham, A. Stamler. // *Cardiovasc Res*. – 1998. – Vol. 40. – №2. – P. 272—281.
164. Lopez, Y. Wharton's jelly or bone marrow mesenchymal stromal cells improve cardiac function following myocardial infarction for more than 32 weeks in a rat model: a preliminary report / Y. Lopez, B. Lutjemeier, K. Seshareddy et al. // *Curr Stem Cell Res Ther*. – 2013. – Vol. 8. – №1. – P. 46-59.
165. Loukogeorgakis, S.P. Stem cells from amniotic fluid--Potential for regenerative medicine / S.P. Loukogeorgakis, P. De Coppi // *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. – 2016. – Vol. 31. – P. 45-57.
166. Ly, H.Q. Stem cells are not proarrhythmic: letting the genie out of the bottle / H.Q. Ly, S. Nattel // *Circulation*. – 2009. – Vol. 119. – №13. – P. 1824-1831.
167. MacDonald, D.J. Persistence of marrow stromal cells implanted into acutely infarcted myocardium: observations in a xenotransplant model / D.J. MacDonald, J.

- Luo, T. Saito et al. // *J Thorac Cardiovasc Surg.* – 2005. – Vol. 130. – №4. – P. 1114-1121.
168. Macia, E. Stem cell therapy is proarrhythmic / E. Macia, P.A. Boyden // *Circulation.* – 2009. – Vol. 119. – №13. – P. 1814-1823.
169. Ma, J. Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction / J. Ma, J. Ge, S. Zhang et al. // *Basic Res Cardiol.* – 2005. – Vol. 100. – №3. – P. 217-223.
170. Majumdar, M.K. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells / M.K. Majumdar, M. Keane-Moore, D. Buyaner et al. // *J Biomed Sci.* – 2003. – Vol. 10. – №2. – P. 228-241.
171. Makino, S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro / S. Makino, K. Fukuda, S. Miyoshi et al. // *J Clin Invest.* – 1999. – Vol. 103. – №5. – P. 697-705.
172. Mathieu, E. Intramyocardial delivery of mesenchymal stem cell-seeded hydrogel preserves cardiac function and attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction / E. Mathieu, G. Lamirault, C. Toquet et al. // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – №12. – P. e51991.
173. Matsumoto, R. Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction / R. Matsumoto, T. Omura, M. Yoshiyama et al. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2005. – Vol. 25. – №6. – P. 1168-1173.
174. Maureira, P. Repairing chronic myocardial infarction with autologous mesenchymal stem cells engineered tissue in rat promotes angiogenesis and limits ventricular remodeling / P. Maureira, P.Y. Marie, F. Yu et al. // *J Biomed Sci.* – 2012. – Vol. 19. – P. 93.
175. Mazhari, R. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche / R. Mazhari, J.M. Hare // *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* – 2007. – Vol. 4 Suppl 1. – P. S21-26.

176. Mazo, M. Transplantation of mesenchymal stem cells exerts a greater long-term effect than bone marrow mononuclear cells in a chronic myocardial infarction model in rat / M. Mazo, J.J. Gavira, G. Abizanda et al. // *Cell Transplant.* – 2010. – Vol. 19. – №3. – P. 313-328.
177. Mazo, M. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction / M. Mazo, V. Planat-Benard, G. Abizanda et al. // *Eur J Heart Fail.* – 2008. – Vol. 10. – №5. – P. 454-462.
178. McMurray, J.J. Heart failure / J.J. McMurray, M.A. Pfeffer // *Lancet.* – 2005. – Vol. 365. – №9474. – P. 1877-1889.
179. Mias, C. Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction / C. Mias, O. Lairez, E. Trouche et al. // *Stem Cells.* – 2009. – Vol. 27. – №11. – P. 2734-2743.
180. Michel, J.B. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators / J.B. Michel // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2003. – Vol. 23. – №12. – P. 2146-2154.
181. Mills, W.R. Stem cell therapy enhances electrical viability in myocardial infarction / W.R. Mills, N. Mal, M.J. Kiedrowski et al. // *J Mol Cell Cardiol.* – 2007. – Vol. 42. – №2. – P. 304-314.
182. Mirosou, M. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart / M. Mirosou, T.M. Jayawardena, J. Schmeckpeper et al. // *J Mol Cell Cardiol.* – 2011. – Vol. 50. – №2. – P. 280-289.
183. Miyahara, Y. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction / Y. Miyahara, N. Nagaya, M. Kataoka et al. // *Nat Med.* – 2006. – Vol. 12. – №4. – P. 459-465.
184. Mohyeddin-Bonab, M. Autologous in vitro expanded mesenchymal stem cell therapy for human old myocardial infarction / M. Mohyeddin-Bonab, M.R. Mohamad-Hassani, K. Alimoghaddam et al. // *Arch Iran Med.* – 2007. – Vol. 10. – №4. – P. 467-473.

185. Mozaffarian, D. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association / D. Mozaffarian, E.J. Benjamin, A.S. Go et al. // *Circulation*. – 2015. – Vol. 10.1161/CIR.0000000000000350.
186. Mu, D. Intracoronary Transplantation of Mesenchymal Stem Cells with Overexpressed Integrin-Linked Kinase Improves Cardiac Function in Porcine Myocardial Infarction / D. Mu, X.L. Zhang, J. Xie et al. // *Sci Rep*. – 2016. – Vol. 6. – P. 19155.
187. Muller-Ehmsen, J. Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction / J. Muller-Ehmsen, B. Krausgrill, V. Burst et al. // *J Mol Cell Cardiol*. – 2006. – Vol. 41. – №5. – P. 876-884.
188. Mylotte, L.A. Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment / L.A. Mylotte, A.M. Duffy, M. Murphy et al. // *Stem Cells*. – 2008. – Vol. 26. – №5. – P. 1325-1336.
189. Naftali-Shani, N. The origin of human mesenchymal stromal cells dictates their reparative properties / N. Naftali-Shani, A. Itzhaki-Alfia, N. Landa-Rouben et al. // *J Am Heart Assoc*. – 2013. – Vol. 2. – №5. – P. e000253.
190. Nagaya, N. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis / N. Nagaya, T. Fujii, T. Iwase et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2004. – Vol. 287. – №6. – P. H2670-2676.
191. Nagaya, N. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy / N. Nagaya, K. Kangawa, T. Itoh et al. // *Circulation*. – 2005. – Vol. 112. – №8. – P. 1128-1135.
192. Nah, D.Y. The inflammatory response and cardiac repair after myocardial infarction / D.Y. Nah, M.Y. Rhee // *Korean Circ J*. – 2009. – Vol. 39. – №10. – P. 393-398.
193. Najimi, M. Adult-derived human liver mesenchymal-like cells as a potential progenitor reservoir of hepatocytes? / M. Najimi, D.N. Khuu, P.A. Lysy et al. // *Cell Transplant*. – 2007. – Vol. 16. – №7. – P. 717-728.

194. Nauta, A.J. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting / A.J. Nauta, G. Westerhuis, A.B. Kruisselbrink et al. // *Blood*. – 2006. – Vol. 108. – №6. – P. 2114-2120.
195. Nayan, M. Superior therapeutic potential of young bone marrow mesenchymal stem cells by direct intramyocardial delivery in aged recipients with acute myocardial infarction: in vitro and in vivo investigation / M. Nayan, A. Paul, G. Chen et al. // *J Tissue Eng*. – 2011. – Vol. 2011. – P. 741213.
196. Neuss, S. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing / S. Neuss, E. Becher, M. Woltje et al. // *Stem Cells*. – 2004. – Vol. 22. – №3. – P. 405-414.
197. Nian, M. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling / M. Nian, P. Lee, N. Khaper et al. // *Circ Res*. – 2004. – Vol. 94. – №12. – P. 1543-1553.
198. Noiseux, N. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation / N. Noiseux, M. Gneocchi, M. Lopez-Illasaca et al. // *Mol Ther*. – 2006. – Vol. 14. – №6. – P. 840-850.
199. Numasawa, Y. Treatment of human mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blocker improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and improved cardiac function via angiogenesis / Y. Numasawa, T. Kimura, S. Miyoshi et al. // *Stem Cells*. – 2011. – Vol. 29. – №9. – P. 1405-1414.
200. Nunez Garcia, A. "Second-generation" stem cells for cardiac repair / A. Nunez Garcia, R. Sanz-Ruiz, M.E. Fernandez Santos et al. // *World J Stem Cells*. – 2015. – Vol. 7. – №2. – P. 352-367.
201. Ohnishi, S. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions / S. Ohnishi, H. Sumiyoshi, S. Kitamura et al. // *FEBS Lett*. – 2007. – Vol. 581. – №21. – P. 3961-3966.
202. Orlic, D. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium / D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti et al. // *Nature*. – 2001. – Vol. 410. – №6829. – P. 701-705.

203. Oswald, J. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro / J. Oswald, S. Boxberger, B. Jorgensen et al. // *Stem Cells*. – 2004. – Vol. 22. – №3. – P. 377-384.
204. Otto Beitnes, J. Intramyocardial injections of human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction modulate scar formation and improve left ventricular function / J. Otto Beitnes, E. Oie, A. Shahdadfar et al. // *Cell Transplant*. – 2012. – Vol. 21. – №8. – P. 1697-1709.
205. Park, S.E. Distribution of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (hUCB-MSCs) in canines after intracerebroventricular injection / S.E. Park, N.Y. Jung, N.K. Lee et al. // *Neurobiol Aging*. – 2016. – Vol. 47. – P. 192-200.
206. Patila, T. Comparison of arrhythmogenicity and proinflammatory activity induced by intramyocardial or epicardial myoblast sheet delivery in a rat model of ischemic heart failure / T. Patila, S. Miyagawa, Y. Imanishi et al. // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – №4. – P. e0123963.
207. Paul, A. Functional assessment of adipose stem cells for xenotransplantation using myocardial infarction immunocompetent models: comparison with bone marrow stem cells / A. Paul, S. Srivastava, G. Chen et al. // *Cell Biochem Biophys*. – 2013. – Vol. 67. – №2. – P. 263-273.
208. Pei, Z. In vivo imaging to monitor differentiation and therapeutic effects of transplanted mesenchymal stem cells in myocardial infarction / Z. Pei, J. Zeng, Y. Song et al. // *Sci Rep*. – 2017. – Vol. 7. – №1. – P. 6296.
209. Pelegrin, P. Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1beta release through pyrophosphates / P. Pelegrin, A. Surprenant // *EMBO J*. – 2009. – Vol. 28. – №14. – P. 2114-2127.
210. Peng, L. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue / L. Peng, Z. Jia, X. Yin et al. // *Stem Cells Dev*. – 2008. – Vol. 17. – №4. – P. 761-773.
211. Piao, H. Effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation in acutely infarcting myocardium / H. Piao, T.J. Youn, J.S. Kwon et al. // *Eur J Heart Fail*. – 2005. – Vol. 7. – №5. – P. 730-738.

212. Pittenger, M.F. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics / M.F. Pittenger, B.J. Martin // *Circ Res.* – 2004. – Vol. 95. – №1. – P. 9-20.
213. Rasmussen, J.G. Comparison of human adipose-derived stem cells and bone marrow-derived stem cells in a myocardial infarction model / J.G. Rasmussen, O. Frobert, C. Holst-Hansen et al. // *Cell Transplant.* – 2014. – Vol. 23. – №2. – P. 195-206.
214. Ratajczak, M.Z. Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies? / M.Z. Ratajczak, M. Kucia, T. Jadczyk et al. // *Leukemia.* – 2012. – Vol. 26. – №6. – P. 1166-1173.
215. Richardson, J.D. Incremental benefits of repeated mesenchymal stromal cell administration compared with solitary intervention after myocardial infarction / J.D. Richardson, P.J. Psaltis, L. Frost et al. // *Cytotherapy.* – 2014. – Vol. 16. – №4. – P. 460-470.
216. Robey, T.E. Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair / T.E. Robey, M.K. Saiget, H. Reinecke et al. // *J Mol Cell Cardiol.* – 2008. – Vol. 45. – №4. – P. 567-581.
217. Ruvinov, E. Alginate biomaterial for the treatment of myocardial infarction: Progress, translational strategies, and clinical outlook: From ocean algae to patient bedside / E. Ruvinov, S. Cohen // *Adv. Drug Deliv.* – 2016. – Vol. 96. – P. 54-76.
218. Ruvinov, E. The promotion of myocardial repair by the sequential delivery of IGF-1 and HGF from an injectable alginate biomaterial in a model of acute myocardial infarction / E. Ruvinov, J. Leor, S. Cohen // *Biomaterials* – 2011. – Vol. 32. – №2. – P. 565-578.
219. Samper, E. Cardiac cell therapy: boosting mesenchymal stem cells effects / E. Samper, A. Diez-Juan, J.A. Montero et al. // *Stem Cell Rev.* – 2013. – Vol. 9. – №3. – P. 266-280.
220. Sassoli, C. Mesenchymal stromal cells affect cardiomyocyte growth through juxtacrine Notch-1/Jagged-1 signaling and paracrine mechanisms: clues for cardiac

- regeneration / C. Sassoli, A. Pini, B. Mazzanti et al. // *J Mol Cell Cardiol.* – 2011. – Vol. 51. – №3. – P. 399-408.
221. Schenke-Layland, K. Adipose tissue-derived cells improve cardiac function following myocardial infarction / K. Schenke-Layland, B.M. Strem, M.C. Jordan et al. // *J Surg Res.* – 2009. – Vol. 153. – №2. – P. 217-223.
222. Segers, V.F. Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms / V.F. Segers, I. Van Riet, L.J. Andries et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2006. – Vol. 290. – №4. – P. H1370-1377.
223. Shahzad, U. Transmyocardial Revascularization Enhances Bone Marrow Stem Cell Engraftment in Infarcted Hearts Through SCF-C-kit and SDF-1-CXCR4 Signaling Axes / U. Shahzad, G. Li, Y. Zhang et al. // *Stem Cell Rev.* – 2015. – Vol. 11. – №2. – P. 332-346.
224. Shalaby, S.M. Comparing the effects of MSCs and CD34+ cell therapy in a rat model of myocardial infarction / S.M. Shalaby, A.S. El-Shal, H.E. Zidan et al. // *IUBMB Life.* – 2016. – Vol. 68. – №5. – P. 343-354.
225. Shim, W.S. Dose-dependent systolic contribution of differentiated stem cells in post-infarct ventricular function / W.S. Shim, G. Tan, Y. Gu et al. // *J Heart Lung Transplant.* – 2010. – Vol. 29. – №12. – P. 1415-1426.
226. Shimizu, T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction / T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi et al. // *Biomaterials.* – 2003. – Vol. 24. – №13. – P. 2309-2316.
227. Silva, G.V. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model / G.V. Silva, S. Litovsky, J.A. Assad et al. // *Circulation.* – 2005. – Vol. 111. – №2. – P. 150-156.
228. Simons, M. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial / M. Simons, B.H. Annex, R.J. Laham et al. // *Circulation.* – 2002. – Vol. 105. – №7. – P. 788-793.

229. Singh, A. Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010-2015) / A. Singh, A. Singh, D. Sen // *Stem Cell Res Ther.* – 2016. – Vol. 7. – №1. – P. 82.
230. Song, H. Reactive oxygen species inhibit adhesion of mesenchymal stem cells implanted into ischemic myocardium via interference of focal adhesion complex / H. Song, M.J. Cha, B.W. Song et al. // *Stem Cells.* – 2010. – Vol. 28. – №3. – P. 555-563.
231. Song, H. Tissue transglutaminase is essential for integrin-mediated survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells / H. Song, W. Chang, S. Lim et al. // *Stem Cells.* – 2007. – Vol. 25. – №6. – P. 1431-1438.
232. Steingen, C. Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells / C. Steingen, F. Brenig, L. Baumgartner et al. // *J Mol Cell Cardiol.* – 2008. – Vol. 44. – №6. – P. 1072-1084.
233. Suuronen, E.J. Comparative effects of mesenchymal progenitor cells, endothelial progenitor cells, or their combination on myocardial infarct regeneration and cardiac function / E.J. Suuronen, J. Price, J.P. Veinot et al. // *J Thorac Cardiovasc Surg.* – 2007. – Vol. 134. – №5. – P. 1249-1258.
234. Tang, J. Mesenchymal stem cells over-expressing SDF-1 promote angiogenesis and improve heart function in experimental myocardial infarction in rats / J. Tang, J. Wang, J. Yang et al. // *Eur J Cardiothorac Surg.* – 2009. – Vol. 36. – №4. – P. 644-650.
235. Tang, J. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion / J. Tang, Q. Xie, G. Pan et al. // *Eur J Cardiothorac Surg.* – 2006. – Vol. 30. – №2. – P. 353-361.
236. Tang, Y.L. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction / Y.L. Tang, Q. Zhao, X. Qin et al. // *Ann Thorac Surg.* – 2005. – Vol. 80. – №1. – P. 229-236; discussion 236-227.
237. Tang, Y.L. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium / Y.L. Tang, Q. Zhao, Y.C. Zhang et al. // *Regul Pept.* – 2004. – Vol. 117. – №1. – P. 3-10.

238. Tano, N. Epicardial placement of mesenchymal stromal cell-sheets for the treatment of ischemic cardiomyopathy; in vivo proof-of-concept study / N. Tano, T. Narita, M. Kaneko et al. // *Mol Ther.* – 2014. – Vol. 22. – №10. – P. 1864-1871.
239. Toma, C. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart / C. Toma, M.F. Pittenger, K.S. Cahill et al. // *Circulation.* – 2002. – Vol. 105. – №1. – P. 93-98.
240. Toma, J.G. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin / J.G. Toma, M. Akhavan, K.J. Fernandes et al. // *Nat Cell Biol.* – 2001. – Vol. 3. – №9. – P. 778-784.
241. Torella, D. Resident cardiac stem cells / D. Torella, G.M. Ellison, I. Karakikes et al. // *Cell Mol Life Sci.* – 2007. – Vol. 64. – №6. – P. 661-673.
242. Uemura, R. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling / R. Uemura, M. Xu, N. Ahmad et al. // *Circ Res.* – 2006. – Vol. 98. – №11. – P. 1414-1421.
243. Virag, J.A. Fibroblast growth factor-2 regulates myocardial infarct repair: effects on cell proliferation, scar contraction, and ventricular function / J.A. Virag, M.L. Rolle, J. Reece et al. // *Am. J. Pathol.* – 2007. – Vol. 171. – №5. – P. 1431-1440.
244. Wang, C.C. Direct intramyocardial injection of mesenchymal stem cell sheet fragments improves cardiac functions after infarction / C.C. Wang, C.H. Chen, W.W. Lin et al. // *Cardiovasc Res.* – 2008. – Vol. 77. – №3. – P. 515-524.
245. Wang, D. Mesenchymal stem cell injection ameliorates the inducibility of ventricular arrhythmias after myocardial infarction in rats / D. Wang, F. Zhang, W. Shen et al. // *Int J Cardiol.* – 2011. – Vol. 152. – №3. – P. 314-320.
246. Wang, T. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells in a rat model of myocardial infarction / T. Wang, S. Sun, Z. Wan et al. // *Resuscitation.* – 2012. – Vol. 83. – №11. – P. 1391-1396.
247. Wang, T. Mesenchymal stem cells improve outcomes of cardiopulmonary resuscitation in myocardial infarcted rats / T. Wang, W. Tang, S. Sun et al. // *J Mol Cell Cardiol.* – 2009. – Vol. 46. – №3. – P. 378-384.

248. Wang, W. Intravenous administration of bone marrow mesenchymal stromal cells is safe for the lung in a chronic myocardial infarction model / W. Wang, Q. Jiang, H. Zhang et al. // *Regen Med.* – 2011. – Vol. 6. – №2. – P. 179-190.
249. Wang, Y. Transplantation of microencapsulated Schwann cells and mesenchymal stem cells augment angiogenesis and improve heart function / Y. Wang, G. Zhang, Y. Hou et al. // *Mol Cell Biochem.* – 2012. – Vol. 366. – №1-2. – P. 139-147.
250. Wang, Z. Rational transplant timing and dose of mesenchymal stromal cells in patients with acute myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled trials / Z. Wang, L. Wang, X. Su et al. // *Stem Cell Res Ther.* – 2017. – Vol. 8. – №1. – P. 21.
251. Wei, F. Mesenchymal stem cells neither fully acquire the electrophysiological properties of mature cardiomyocytes nor promote ventricular arrhythmias in infarcted rats / F. Wei, T.Z. Wang, J. Zhang et al. // *Basic Res Cardiol.* – 2012. – Vol. 107. – №4. – P. 274.
252. Wei, H.J. Bioengineered cardiac patch constructed from multilayered mesenchymal stem cells for myocardial repair / H.J. Wei, C.H. Chen, W.Y. Lee et al. // *Biomaterials.* – 2008. – Vol. 29. – №26. – P. 3547-3556.
253. Wen, Z. Repair mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction / Z. Wen, S. Zheng, C. Zhou et al. // *J Cell Mol Med.* – 2011. – Vol. 15. – №5. – P. 1032-1043.
254. Williams, J.T. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes / J.T. Williams, S.S. Southerland, J. Souza et al. // *Am Surg.* – 1999. – Vol. 65. – №1. – P. 22-26.
255. Wright, E.J. Encapsulated glucagon-like peptide-1-producing mesenchymal stem cells have a beneficial effect on failing pig hearts / E.J. Wright, K.A. Farrell, N. Malik et al. // *Stem Cells Transl Med.* – 2012. – Vol. 1. – №10. – P. 759-769.
256. Xiang, Z. Collagen-GAG scaffolds grafted onto myocardial infarcts in a rat model: a delivery vehicle for mesenchymal stem cells / Z. Xiang, R. Liao, M.S. Kelly et al. // *Tissue Eng.* – 2006. – Vol. 12. – №9. – P. 2467-2478.

257. Yang, J. Differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow to sinus node-like cells / J. Yang, T. Song, P. Wu et al. // *Mol Med Rep.* – 2012. – Vol. 5. – №1. – P. 108-113.
258. Yao, E.H. Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases / E.H. Yao, Y. Yu, N. Fukuda // *Curr Pharm Biotechnol.* – 2006. – Vol. 7. – №2. – P. 101-108.
259. Zandonella, C. Tissue engineering: The beat goes on / C. Zandonella // *Nature.* – 2003. – Vol. 421. – №6926. – P. 884-886.
260. Zheng, S.X. Comparison of cardiac stem cells and mesenchymal stem cells transplantation on the cardiac electrophysiology in rats with myocardial infarction / S.X. Zheng, Y.L. Weng, C.Q. Zhou et al. // *Stem Cell Rev.* – 2013. – Vol. 9. – №3. – P. 339-349.
261. Zhu, X. The comparison of multilineage differentiation of bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells / X. Zhu, J. Du, G. Liu // *Clin Lab.* – 2012. – Vol. 58. – №9-10. – P. 897-903.
262. Zhu, Y. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC / Y. Zhu, T. Liu, K. Song et al. // *Cell Biochem Funct.* – 2008. – Vol. 26. – №6. – P. 664-675.
263. Yoon, Y.S. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction / Y.S. Yoon, A. Wecker, L. Heyd et al. // *J Clin Invest.* – 2005. – Vol. 115. – №2. – P. 326-338.
264. Zuk, P.A. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P.A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno et al. // *Tissue Eng.* – 2001. – Vol. 7. – №2. – P. 211-228.