

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ИЦиГ СО РАН)

На правах рукописи

Чепелева Елена Васильевна

**Характеристика регенеративного потенциала
кардиальных стромальных клеток и кардиальных
производных индуцированных плюрипотентных
стволовых клеток человека**

1.5.22. Клеточная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Павлова Софья Викторовна

Новосибирск 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|-----------|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ | 5 |
| ВВЕДЕНИЕ..... | 9 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 19 |
| 1.1. Ишемическая болезнь сердца | 19 |
| 1.2. Клеточная терапия ишемической болезни сердца..... | 22 |
| 1.2.1. Нерегиональные клетки в терапии ишемической болезни сердца | 24 |
| 1.2.2. Региональные клетки в терапии ишемической болезни сердца..... | 30 |
| 1.2.3. Плюрипотентные клетки в терапии ишемической болезни сердца | 38 |
| 1.3. Потенциальные механизмы клеточной терапии ишемической болезни сердца..... | 41 |
| 1.4. Способы трансплантации клеток в миокард..... | 43 |
| 1.5. Заключение к обзору литературы | 46 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... | 48 |
| 2.1. Получение клеточных культур | 48 |
| 2.1.1. Получение культур клеток из фрагментов предсердия человека..... | 48 |
| 2.1.2. Получение культур клеток из фрагментов предсердия крысы..... | 49 |
| 2.2. Выделение РНК..... | 50 |
| 2.3. Сравнительный анализ уровня экспрессии генов методом ОТ-ПЦР..... | 51 |
| 2.4. Оценка экспрессии генов методом количественной ПЦР в режиме реального времени..... | 54 |
| 2.5. Выявление активности щелочной фосфатазы..... | 56 |

| | |
|--|----|
| 2.6. Иммунофлюоресцентное окрашивание..... | 56 |
| 2.7. Тест на способность клеточных культур к поглощению ацетилированного липопротеина низкой плотности..... | 60 |
| 2.8. Тест на способность клеточных культур к связыванию изолектина В4..... | 60 |
| 2.9. Оценка ангиогенного потенциала <i>in vitro</i> | 61 |
| 2.10. Проточная цитофлуориметрия..... | 61 |
| 2.11. Получение GFP-позитивных культур клеток крысы..... | 62 |
| 2.12. Моделирование экспериментального инфаркта миокарда и интрамиокардиальная трансплантация клеточной культуры, полученной из предсердия крысы..... | 63 |
| 2.13. Эхо-КГ исследование функционального состояния сердца..... | 65 |
| 2.14. Прижизненная визуализация введенных клеток..... | 65 |
| 2.15. Криофиксация и гистологическое окрашивание..... | 65 |
| 2.16. Морфометрический анализ..... | 66 |
| 2.17. Модификация клеточной культуры, полученной из предсердия крысы, экзогенной экспрессией люциферазы..... | 66 |
| 2.18. Получение фибринового геля из крови крыс..... | 67 |
| 2.19. Определение активности люциферазы в белковых экстрактах | 67 |
| 2.20. Трансплантация модифицированной экзогенной экспрессией люциферазы клеточной культуры, полученной из предсердия крысы, в миокард крыс линии WAG..... | 68 |
| 2.21. Направленная дифференцировка ИПСК в кардиомиоциты..... | 69 |
| 2.22. Визуализация потоков кальция в кардиомиоцитах..... | 70 |
| 2.23. Электрофизиологическая характеристика кардиомиоцитов..... | 71 |
| 2.24. Трансплантация кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека, в организм мышей линии SCID..... | 72 |
| 2.25. Просвечивающая электронная микроскопия..... | 74 |
| 2.26. Статистический анализ..... | 74 |

| | |
|---|-----|
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ | 75 |
| 3.1. Получение и характеристика клеточных культур предсердия человека | 75 |
| 3.2. Получение и характеристика клеточных культур предсердия крысы | 89 |
| 3.3. Моделирование инфаркта миокарда и трансплантация аутологичных клеток, полученных из предсердия, на модели постинфарктного кардиосклероза у крыс | 94 |
| 3.4. Оценка эффективности интрамиокардиальной трансплантации клеток на модели острого инфаркта миокарда у крыс..... | 102 |
| 3.5. Получение и характеристика кардиомиоцитов из ИПСК человека. | 106 |
| 3.6. Трансплантация кардиомиоцитов, полученных в ходе направленной дифференцировки ИПСК человека, в организм иммунодефицитных мышей..... | 111 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 126 |
| ВЫВОДЫ | 128 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 129 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

| | |
|------|---|
| АО | диаметр корня аорты |
| АТФ | аденозинтрифосфат |
| Вз | везикулы |
| ГСК | гемопозитические стволовые клетки |
| ДНК | дезоксирибонуклеиновая кислота |
| Дс | десмосомы |
| ДТТ | дитиотреитол |
| ИБС | ишемическая болезнь сердца |
| иКМ | кардиомиоциты, полученные в ходе направленной дифференцировки ИПСК человека |
| ИМ | инфаркт миокарда |
| ИПСК | индуцированные плюрипотентные стволовые клетки |
| КДР | конечный диастолический размер |
| КМ | костный мозг |
| КСК | кардиальные стромальные клетки |
| КСР | конечный систолический размер |
| ЛЖ | левый желудочек |
| МСК | мезенхимальные стволовые клетки |
| Мф | миофибриллы |
| ОТ | обратная транскрипция |
| ПЦР | полимеразная цепная реакция |
| РНК | рибонуклеиновая кислота |
| УО | ударный объем |
| ФВ | фракция выброса |
| ФС | функция сократимости |
| ЩФ | щелочная фосфатаза |
| ЭДТА | этилендиаминтетрауксусная кислота |
| ЭКГ | электрокардиограмма |
| ЭПК | эндотелиальные прогениторные клетки |

| | |
|----------|---|
| ЭСК | эмбриональные стволовые клетки |
| Эхо-КГ | эхокардиография |
| Я | ядро |
| AcLDL | ацетилированный липопротеин низкой плотности (acetylated low-density lipoprotein) |
| ACTB | бета-актин (beta-actin) |
| Ang | ангиопоэтин (angiopoietin) |
| APD | длительность потенциала действия (action potential duration) |
| aSA | саркомерный альфа-актинин (sarcomeric alpha-actinin) |
| aSMA | альфа-актин гладких мышц (alpha-smooth muscle actin) |
| Atr | атриальные кардиомиоциты |
| BMP | костный морфогенетический белок (bone morphogenetic protein) |
| B2M | микроглобулин бета-2 (beta-2 microglobulin) |
| Cx43 | коннексин 43 (connexin 43) |
| CXCR4 | C-X-C хемокиновый рецептор типа 4 (C-X-C chemokine receptor type 4) |
| DAPI | 4',6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindole) |
| dNTP | дезоксинуклеозид трифосфат (deoxynucleotide triphosphates) |
| DMEM | среда Игла в модификации Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) |
| EA.hy926 | культура иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека |
| EGF | эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor) |
| FBS | фетальная бычья сыворотка (fetal bovine serum) |
| FGF | фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor) |
| Fstl-1 | фоллистатин-подобный белок 1 (follistatin-related protein 1) |
| GAPDH | глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) |
| GFP | зелёный флюоресцентный белок (green fluorescent protein) |

| | |
|--------|--|
| HCN4 | управляемый циклическими нуклеотидами гиперполяризационно активируемый канал 4 (hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 4) |
| HGF | фактор роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor) |
| HUVEC | клеточная линия эндотелия пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells) |
| IB4 | изолектин В4 (isolectin B4) |
| IgG | иммуноглобулин G (immunoglobulin G) |
| IGF | инсулиноподобный фактор роста (insulin-like growth factor) |
| И-6 | интерлейкин 6 (interleukin 6) |
| LIF | фактор ингибирования лейкозных клеток (leukemia inhibitory factor) |
| Luc+ | клетки, экспрессирующие люциферазу |
| MAN1 | клеточная линия эмбриональных фибробластов человека |
| MCP1 | фактор хемотаксиса моноцитов 1 (monocyte chemoattractant protein 1) |
| MLC2 | легкая цепь миозина 2 (myosin light chain 2) |
| NG2 | нейронный/глиальный антиген 2 (neuron/glial antigen 2) |
| Nkx2.5 | НК-2 гомеодомен-содержащий транскрипционный фактор 5 (NK-2 homeodomain transcription factor 5) |
| Nod | пейсмейкерные кардиомиоциты |
| PBS | фосфатный буферный солевой раствор (phosphate buffered saline) |
| PDGF | тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor) |
| PDGFR | рецептор тромбоцитарного фактора роста (platelet-derived growth factor receptor) |
| RAG | гены, активирующие рекомбинацию (recombination-activating genes) |
| RPMI | среда, разработанная в институте Розуэлл Парк Мемориал (Roswell Park Memorial Institute medium) |
| Sca-1 | антиген стволовых клеток 1 (stem cell antigen 1) |

| | |
|--------|--|
| SCF | фактор стволовых клеток (stem cell factor) |
| SCID | синдром тяжелого комбинированного иммунодефицита (severe combined immunodeficiency) |
| SDF1 | фактор стромальных клеток 1 (stromal cell-derived factor 1) |
| Shox2 | ген низкорослости, содержащий гомеобокс 2 (short stature homeobox 2) |
| SIRPa | сигнальный регуляторный белок альфа (signal regulatory protein alpha) |
| SR | заменитель сыворотки (serum replacement) |
| SR2 | клетки, полученные при культивировании в среде с 2%-м содержанием заменителя сыворотки |
| SR10 | клетки, полученные при культивировании в среде с суммарным 10%-м содержанием сыворотки |
| TERC | компонент теломеразной РНК (telomerase RNA component) |
| TGFb | трансформирующий ростовой фактор бета (transforming growth factor beta) |
| TGFb1R | рецептор трансформирующего ростового фактора бета 1 (transforming growth factor beta 1 receptor) |
| Tie2 | тирозинкиназа ТЕК (TEK tyrosine kinase) |
| TnT | тропонин Т (troponin T) |
| VEGF | фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor) |
| VEGFR | рецептор фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor receptor) |
| Ventr | вентрикулярные кардиомиоциты |
| vWF | фактор фон Виллебранда (von Willebrand factor) |
| WAG | Wistar Albino Glaxo |
| 293FT | клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

В настоящее время актуальной проблемой научной медицины практического здравоохранения является ишемическая болезнь сердца (ИБС) [Benjamin et al., 2018; Roth et al., 2020]. Инфаркт миокарда (ИМ) – опасное осложнение этой болезни и одна из основных причин смертности и утраты трудоспособности населения. При нарушении кровоснабжения и развитии ишемического поражения миокарда происходит утрата здоровых кардиомиоцитов путем апоптоза и/или некроза [Marin-Garcia and Goldenthal, 2006]. В связи с этим разработка эффективных методов лечения ИБС является актуальной задачей современной медицины [Arjmand et al., 2021].

Большие перспективы в восстановлении функции миокарда открывают методы клеточной терапии, предлагающие пациентам возможность восстановительного лечения в дополнение к используемым в настоящее время хирургическим и фармакологическим методам. Первые клинические испытания клеточной терапии заболеваний сердца были проведены почти 20 лет назад, когда преимущественно использовали трансплантацию гетерогенных популяций клеток взрослого организма: миобластов из скелетной мускулатуры [Menasche et al., 2003; Menasche et al., 2008], мезенхимальных стромальных клеток костного мозга [Hare et al., 2009; Hare et al., 2012], гемопоэтических стволовых клеток [Clifford et al., 2012; Perin et al., 2012], эндотелиальных прогениторных клеток [Friis et al., 2011]. В начале 2000-х годов в качестве перспективного варианта для возможного применения в терапии ИБС начали изучать c-Kit позитивные клетки сердца, открытые группой ученых под руководством Пьеро Анверса [Beltrami et al., 2003]. Предполагалось, что кардиальные c-Kit позитивные клетки являются региональными стволовыми и могут дифференцироваться в кардиомиоциты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки, однако данная гипотеза не нашла

подтверждения [Bolli et al., 2013; Van Berlo et al., 2014; Davis, 2019]. В настоящее время c-Kit позитивные клетки сердца на основании иммунофенотипа относят к региональным мезенхимальным стромальным клеткам, так же, как и клетки, полученные методом кардиосфер [Fathi et al., 2020; Kang et al., 2020]. В большинстве экспериментальных исследованиях с использованием различных моделей ИМ у лабораторных животных отмечалось относительное восстановление сократительной функции сердца после трансплантации c-Kit⁺ кардиальных клеток [Zwetsloot et al., 2016; Парфенова, 2019]. В клиническом исследовании CADUCEUS при интракоронарном введении аутологичных c-Kit⁺ клеток в составе кардиосфер пациентам, перенесшим ИМ, было показано относительное уменьшение зоны кардиосклероза, но достоверных изменений фракции выброса не наблюдалось [Makkar et al., 2012]. В клиническом исследовании CONCERT-HF было показано улучшение функциональных и структурных характеристик левого желудочка у пациентов с ишемической кардиомиопатией после совместной трансплантации аутологичных мезенхимальных стромальных клеток и c-Kit⁺ кардиальных клеток [Bolli et al., 2021]. Регенеративный эффект c-Kit позитивных клеток и клеток кардиосфер при трансплантации остается не изучен до конца, считается, что он может быть обусловлен секрецией паракринных факторов и стимуляцией терапевтического ангиогенеза [Davis, 2019].

В настоящее время проведено более 100 клинических испытаний клеточной терапии при остром ИМ и более 90 – при хронической ишемической кардиомиопатии [Fernández-Avilés et al., 2017; Nakamura and Murry, 2019]. В большинстве данных исследований была показана безопасность данного типа терапии независимо от конкретного исследуемого клеточного продукта, способа доставки, протокола дозирования или характеристик пациентов. Однако преимущества клеточной терапии по сравнению с фармакологической терапией ИБС показаны не были [Madonna et al., 2016; Fernández-Avilés et al., 2017].

Успех клеточной терапии напрямую зависит от эффективного способа доставки и приживания трансплантируемых клеток [Nakamura and Murry, 2019]. Использование трансгенных клеток, несущих ген люциферазы, позволяет провести количественную оценку эффективности трансплантации как биохимическими методами, так и с помощью методов прижизненной визуализации. Для повышения приживаемости клеток в организме реципиента разрабатываются способы трансплантации в составе различных матриксов или тканеинженерных конструкций. Наиболее доступным матриксом является аутологичный фибриновый гель, который может быть получен из крови пациента. Кроме того, в фибриновом геле содержится большое количество противовоспалительных и ангиогенных факторов [Cheng et al., 2012].

Для восстановления утраченной ткани миокарда при заместительной клеточной терапии может применяться трансплантация кардиомиоцитов, полученных с помощью дифференцировки плюрипотентных клеток [Funakoshi et al., 2016; Kolanowski et al., 2017]. В связи с этим актуальной задачей является разработка оптимальной технологии формирования функциональной ткани сердца, способной к генерации ритмической активности и синхронным сокращениям, из полученных *in vitro* клеток [Menasche, 2018]. Для функционального созревания кардиомиоцитов применяют активацию биохимических путей, создание клеточно-инженерных пластов с использованием матриксов, электромагнитную стимуляцию, механическое растяжение клеточных пластов кардиомиоцитов, а также персистенцию незрелых кардиомиоцитов *in vivo* [Masuda and Shimizu, 2016; Funakoshi et al., 2016; Shadrin et al., 2017; Kolanowski et al., 2017].

На сегодняшний день без достаточного количества проведенных экспериментальных и доклинических исследований остается непонятным какой тип клеток и способ их доставки в организм наилучшим образом подходят для использования в клинической практике, а также не имеется достаточно данных о возможных механизмах действия клеточно-опосредованной терапии.

Цель и задачи исследования

Цель работы – морфофункциональная характеристика кардиальных стромальных клеток и кардиальных производных ИПСК с последующей оценкой их выживаемости и сохранения функциональной активности после трансплантации в организм экспериментальных животных.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести иммунофенотипическую характеристику полученных из фрагментов предсердия человека и крысы кардиальных стромальных клеток, оценить их ангиогенный потенциал.

2. Оценить влияние интрамиокардиальной трансплантации кардиальных стромальных клеток на функциональные и морфологические характеристики сердца на модели постинфарктного кардиосклероза у крыс линии WAG.

3. Провести количественную оценку выживаемости кардиальных стромальных клеток, трансплантированных в периинфарктную зону на модели острого инфаркта миокарда у крыс линии WAG.

4. Оценить выживаемость и функциональную активность кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека, после подкожной трансплантации в составе сформированного матрикса на основе матригеля в организм мышей иммунодефицитной линии SCID.

5. Оценить выживаемость и функциональную активность кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека, после почечной субкапсулярной трансплантации в составе сформированных клеточных пластов в организм мышей иммунодефицитной линии SCID.

Научная новизна

Показано, что клеточные культуры, полученные из фрагментов предсердия, гетерогенны по составу (в них присутствуют клетки, экспрессирующие маркеры мезенхимальных клеток, эндотелиальных клеток и перицитов), способны формировать капилляроподобные структуры *in vitro* и синтезировать ангиогенные ростовые факторы и рецепторы. Также показано, что способ получения клеточных культур фрагментов предсердия в составе кардиосфер в бессывороточной среде способствует поддержанию ангиогенного потенциала в условиях *in vitro*. В экспериментах на крысах с экспериментальным ишемическим повреждением миокарда было показано, что аутологичная клеточная культура, содержащая кардиальные стромальные клетки, может оказывать регенеративный эффект и не обладает способностью к длительной персистенции в сердце после трансплантации. Показано, что использование аутологичного фибринового геля в качестве матрикса для введения повышает эффективность трансплантации кардиальных стромальных клеток в перинфарктную зону. Показано, что трансплантированные под фиброзную капсулу почки мышей SCID (на срок до 6-ти недель) клеточные пласты кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека, начинают формировать упорядоченный сократительный аппарат и после эксплантации из организма сохраняют функциональную активность и способность к согласованному сокращению.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы

Данные, полученные в работе, целесообразно использовать для оптимизации методов получения клеточных культур, их предтрансплантационной подготовки и последующей трансплантации с целью лечения ишемических заболеваний сердца. Результаты могут быть включены в факультативные курсы лекций по регенеративной медицине для студентов вузов биологического и медицинского профилей, а также для слушателей курсов повышения квалификации в области регенеративных технологий.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа представляет собой экспериментальное исследование, выполненное на клеточных культурах (кардиальные стромальные клетки человека и крысы, кардиомиоциты, полученные при направленной дифференцировке ИПСК человека) и лабораторных животных (самцы крыс линии WAG, самцы мышей линии SCID). Методологическую основу данного исследования составляют методы молекулярной и клеточной биологии, морфометрии, гисто- и иммуноцитохимии, экспериментального моделирования на животных, статистики, а также анализа данных отечественной и зарубежной литературы. При выполнении исследования и оформлении материала были применены общенаучные методы: теоретический и методологический анализ источников литературы, экспериментальные методы исследования и сравнительный анализ полученных данных.

Степень достоверности полученных результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала и использованием современных методов, соответствующих поставленным задачам. Выводы, сформулированные в диссертации, подтверждены фактическими данными, представленными в таблицах и рисунках, анализом литературы, точностью статистической обработки полученных результатов.

Вклад автора

Основные результаты работы были получены автором самостоятельно. Эксперимент по моделированию инфаркта миокарда проводился совместно с Русаковой Я.Л. (ФГБУ НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина МЗ РФ, г. Новосибирск). Эхо-КГ исследование сердца у крыс проводилось ветеринарным врачом Шехтман Ю.Б. (КДЦ «Евровет», г. Новосибирск). Эксперимент по электрофизиологической характеристике клеток методом локальной фиксации потенциала проводился Сорокоумовым Е.Д. (ФИЦ ИВТ СО РАН, г. Новосибирск). Исследование методом электронной микроскопии проводилось совместно с д.б.н. Бгатовой Н.П. (НИИКЭЛ – филиал ИЦИГ СО РАН, г. Новосибирск).

Апробация результатов

По теме диссертации опубликованы 8 статей в рецензируемых научных журналах, в том числе 5 статей в журналах, входящих в международные базы цитирования (WoS, Scopus):

1. Павлова С.В., Перовский П.П., **Чепелева Е.В.**, Малахова А.А., Дементьева Е.В., Покушалов Е.А., Сухих Г.Т., Закиян С.М. Характеристика кардиальных культур клеток, полученных из экспланта сердечной мышцы человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2013. – №4. – С.132-141. doi:10.1007/s10517-013-2295-x.

2. **Чепелева Е.В.**, Павлова С.В., Малахова А.А., Милевская Е.А., Русакова Я.Л., Подхватилина Н.А., Сергеевичев Д.С., Покушалов Е.А., Караськов А.М., Сухих Г.Т., Закиян.С.М. Терапия хронического кардиосклероза у крыс линии WAG культурами кардиоваскулярных клеток, обогащенными стволовыми клетками сердца // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2015. – №3. – С.191-201. doi:10.1007/s10517-015-3119-y.

3. Павлова С.В., Сергеевичев Д.С., **Чепелева Е.В.**, Козырева В.С., Малахова А.А., Захарова И.С., Григорьева Е.В., Покушалов Е.А., Закиян С.М. Сравнение мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и региональных стволовых клеток сердца и фибробластов кожи человека // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19. – № 4-2. – С. 12-19. doi:10.21688/1681-3472-2015-4-2-12-19.

4. Милевская Е.А., Немудрый А.А., **Чепелева Е.В.**, Малахова А.А., Павлова С.В., Докучаева А.А., Сергеевичев Д.С., Закиян С.М. Оптимизация протокола интрамиокардиальной трансплантации с использованием люминесценции кардиальных мезенхимальных клеток, маркированных экспрессией люциферазы // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19. – № 4-2. – С. 69-76. doi:10.21688/1681-3472-2015-4-2-69-76.

5. Павлова С.В., Розанова И.А., **Чепелева Е.В.**, Малахова А.А., Лыков А.П., Покушалов Е.А., Закиян С.М. Ангиогенный потенциал кардиальных стволовых и мезенхимальных стромальных клеток костного мозга крысы // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19. – № 4-2. – С. 77-84. doi:10.21688/1681-3472-2015-4-2-77-84.

6. Павлова С.В., Леонова Е.А., **Чепелева Е.В.**, Докучаева А.А., Сергеевичев Д.С., Покушалов Е.А. Мониторинг трансплантации кардиальных клеток в зону ишемического поражения миокарда с использованием люциферазной репортерной системы // Гены и клетки. – 2017. – Т. 12. – №4. – С.69-75. doi: 10.23868/201707032.

7. Павлова С.В., **Чепелева Е.В.**, Дементьева Е.В., Григорьева Е.В., Сорокоумов Е.Д., Слотвицкий М.М., Пономаренко А.В., Малахова А.А., Докучаева А.А., Сергеевичев Д.С., Покушалов Е.А., Закиян С.М. Исследование выживаемости и функциональной активности кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК человека, при трансплантации в мышей линии SCID // Гены и клетки. – 2018. – Т. 13. – №. 4. – С. 51-60. doi: 10.23868/201812047.

8. Павлова С.В., **Чепелева Е.В.**, Дементьева Е.В., Закиян С.М. Перспективы использования кардиомиоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, в заместительной терапии повреждений миокарда // Гены и клетки. – 2019. – Т. 14. – № 4-1. – С. 175-176.

Тезисы конференций:

1. **Чепелева Е.В.** Влияние условий культивирования на фенотип клеток, полученных из кардиальной и скелетной мускулатуры крысы // Тезисы докладов XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013», секция биология. 8-3 декабря 2013, Москва. С. 21.

2. **Чепелева Е.В.**, Павлова С.В., Малахова А.А., Перовский П.П., Дементьева Е.В., Покушалов Е.А., Закиян С.М. Регенеративный потенциал кардиальных клеток из экспланта сердечной мышцы человека // Материалы I Национального конгресса по регенеративной медицине. 4-6 декабря 2013, Москва. С. 265.

3. **Чепелева Е.В.**, Павлова С.В., Малахова А.А., Милевская Е.А., Русакова Я.Л., Подхватилина Н.А., Сергеевичев Д.С., Покушалов Е.А., Караськов А.М., Сухих Г.Т., Закиян.С.М. Разработка методов терапии инфаркта миокарда у крыс линии WAG, основанных на трансплантации клеток кардиальной культуры // Материалы симпозиума Новейшие методы клеточных технологий в медицине. 2-6 сентября 2014, Новосибирск. С.36.

4. Милевская Е.А., **Чепелева Е.В.**, Павлова С.В., Покушалов Е.А. Мониторинг трансплантации кардиальных стромальных клеток крысы в зону ишемического поражения миокарда с использованием люциферазной репортерной системы // Сборник материалов форума Биомедицина-2016. 26 июня - 1 июля 2016, Новосибирск. С. 114.

Положения, выносимые на защиту

1. Кардиальные стромальные клетки обладают регенеративным потенциалом за счет паракринной активности – при интрамиокардиальной трансплантации крысам линии WAG на стадии развития хронического кардиосклероза приводят к уменьшению площади постинфарктного фиброза миокарда.

2. Клетки, полученные при кардиальной дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, имеют фенотипические признаки различных типов кардиомиоцитов (атриальных, вентрикулярных и проводящих), сохраняют способность к спонтанному и синхронному сокращению после трансплантации в организм иммунодефицитных мышей SCID на срок до 42-х дней и могут быть использованы для разработки технологий заместительной клеточной терапии ишемической болезни сердца.

Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего в себя 278 источников, в том числе 18 отечественных и 260 зарубежных авторов. Работа изложена на 172 страницах, содержит 46 рисунков и 6 таблиц.

Благодарности

Автор выражает благодарность научному руководителю Павловой Софье Викторовне за неоценимую помощь на всех этапах работы над диссертацией. Автор искренне благодарит коллектив лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН, а также коллектив института экспериментальной биологии и медицины НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина за помощь в организации экспериментов и анализе полученных данных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Ишемическая болезнь сердца

Ишемическая болезнь сердца - распространенное заболевание, являющееся основной причиной смертности и потери трудоспособности среди взрослого населения [Benjamin et al., 2018; Roth et al., 2020] (Рисунок 1).

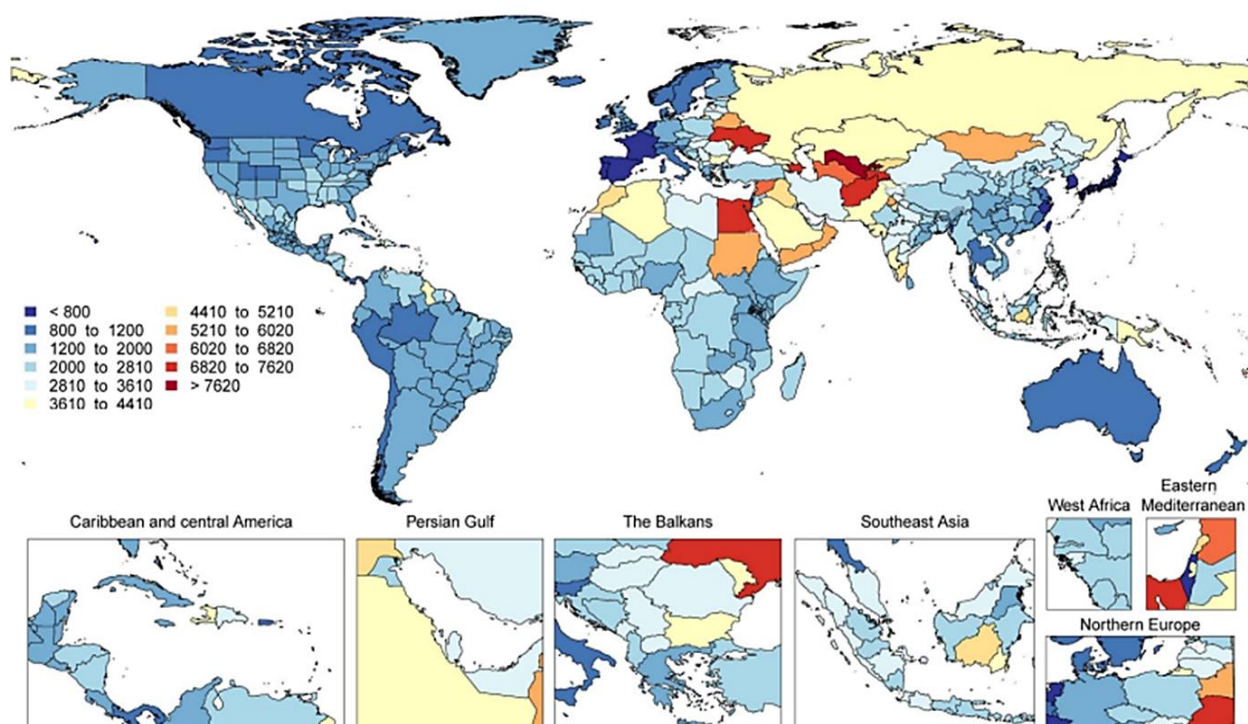


Рисунок 1 – Распространенность ИБС в мире в 2019 году (данные, стандартизованные на 100 000 населения). Адаптировано из [Roth et al., 2020]

Ишемия миокарда возникает, когда потребность тканей сердца в кислороде превышает возможности его доставки по коронарным артериям из-за первичного уменьшения коронарного кровотока и/или снижения коронарного резерва (недостаточная способность к увеличению коронарного кровотока при повышении метаболических потребностей сердечной мышцы) [Карпов и др., 2015]. Термин «инфаркт миокарда» используется в тех случаях, когда имеет место доказанный некроз миокарда вследствие длительной острой ишемии [Thygesen et al., 2012] (Рисунок 2).

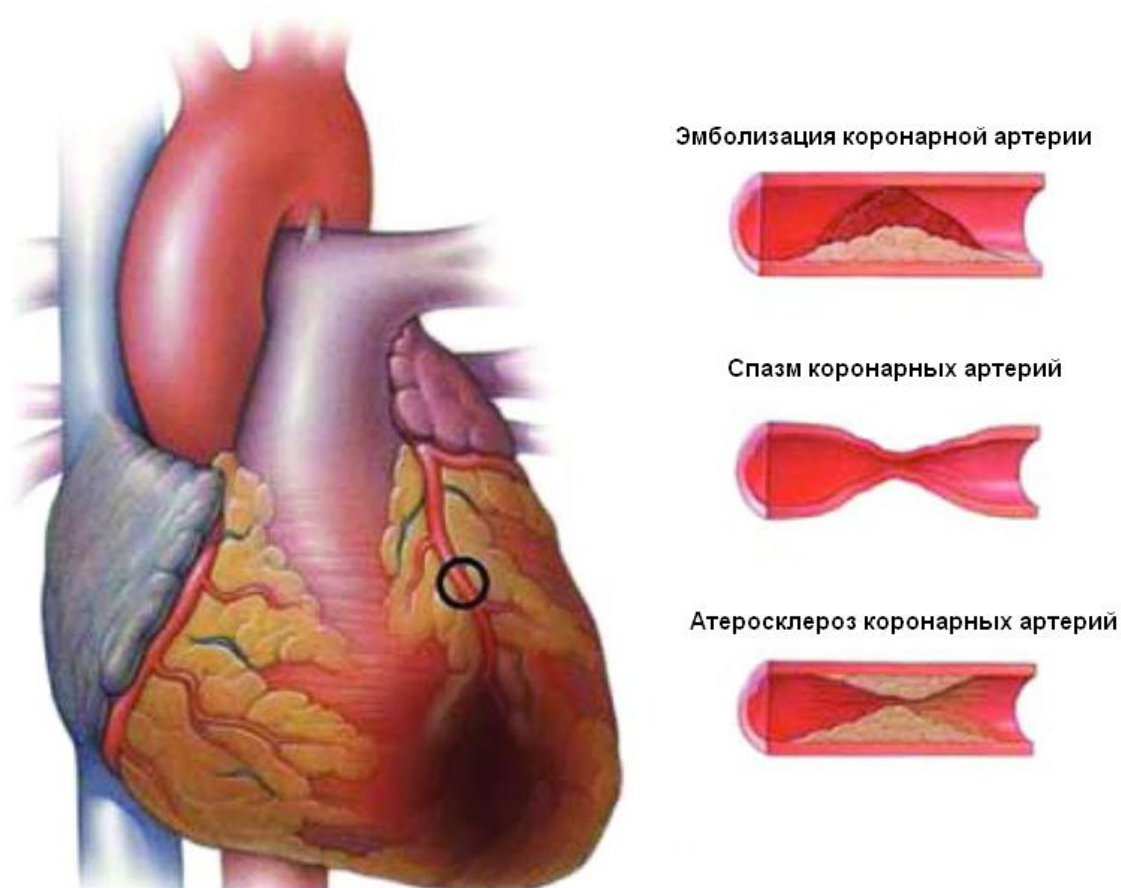


Рисунок 2 – Основные причины развития ИБС. Адаптировано из [Thygesen et al., 2012]

Развитие хирургических и фармакологических методов лечения ИБС привело к увеличению выживаемости пациентов, однако, у людей, перенесших ИМ, высок риск развития постинфарктных осложнений и ухудшения уровня жизни [Rosamond et al., 2012]. После перенесенного ИМ активируются локальные компенсаторные механизмы в сердце, снижается уровень метаболизма в миокарде, что приводит к развитию сердечной недостаточности и, возможно, внезапной смерти [Hendriks et al., 2018]. Среди больных ИБС наиболее тяжелую категорию пациентов представляют больные с выраженной дисфункцией миокарда левого желудочка (ЛЖ) (с фракцией выброса (ФВ) менее 35%) вследствие постинфарктного ремоделирования сердца. Ремоделирование сердца – процесс структурно-геометрических изменений, возникающих под действием патологического фактора и приводящих физиологическую и анатомическую норму к патологии. Перенесенный ИМ

является пусковым фактором структурного преобразования ткани и камеры ЛЖ, которое приводит к развитию нарушений его систолической и диастолической функций. Постинфарктное ремоделирование ЛЖ является ключевым моментом формирования и прогрессирования хронической сердечной недостаточности у пациентов, перенесших ИМ [Severino et al., 2020]. Несмотря на улучшение за последние годы медикаментозной терапии и хирургической техники, проблема лечения ИБС с низкой ФВ ЛЖ остается актуальной [Arjmand et al., 2021].

Основными методами лечения ИБС на сегодняшний день являются медикаментозная терапия и хирургическая реваскуляризация миокарда [Elgendy et al., 2019]. К хирургическим методам реваскуляризации относятся чрескожные коронарные вмешательства (транслюминальная баллонная дилатация, стентирование, эксимерная лазерная ангиопластика) и операция аортокоронарного шунтирования [Maron et al., 2018]. Своевременное проведение реперфузии, тромболитической терапии замедляет неблагоприятное развитие ремоделирования сердца, однако применяемые методы лечения не способны восстанавливать структуру миокарда, а результатом лечения является достижение ремиссии [Lorenzen et al., 2019]. Также подобные операции невозможны при диффузном и дистальном типах атеросклеротического поражения коронарных артерий. Кроме того, не все больные из-за возраста или тяжелых сопутствующих заболеваний в состоянии перенести указанные оперативные вмешательства.

При прогрессировании заболевания на поздних стадиях единственно эффективным методом лечения остается пересадка сердца, однако возможности применения трансплантации сердца ограничены дефицитом донорских органов и жесткими критериями подбора. Поэтому многие годы поиск и внедрение новых методов восстановления кровообращения ишемизированных зон миокарда являются актуальной проблемой кардиохирургии [Michler, 2018]. На современном этапе развития хирургии ИБС большое внимание уделяется развитию альтернативных методов

реваскуляризации, в том числе с использованием тканеинженерных и клеточных технологий. Однако на данный момент не существует единого мнения о значимости того или иного метода, об их вкладе в процессы ангио- и васкулогенеза [Arjmand et al., 2021].

1.2. Клеточная терапия ишемической болезни сердца

В настоящее время во многих клинических испытаниях изучается возможность применения для стимуляции регенерационно-репаративных процессов в сердце различных типов клеток [Marban, 2018; Nakamura and Murry, 2019] (Рисунок 3).

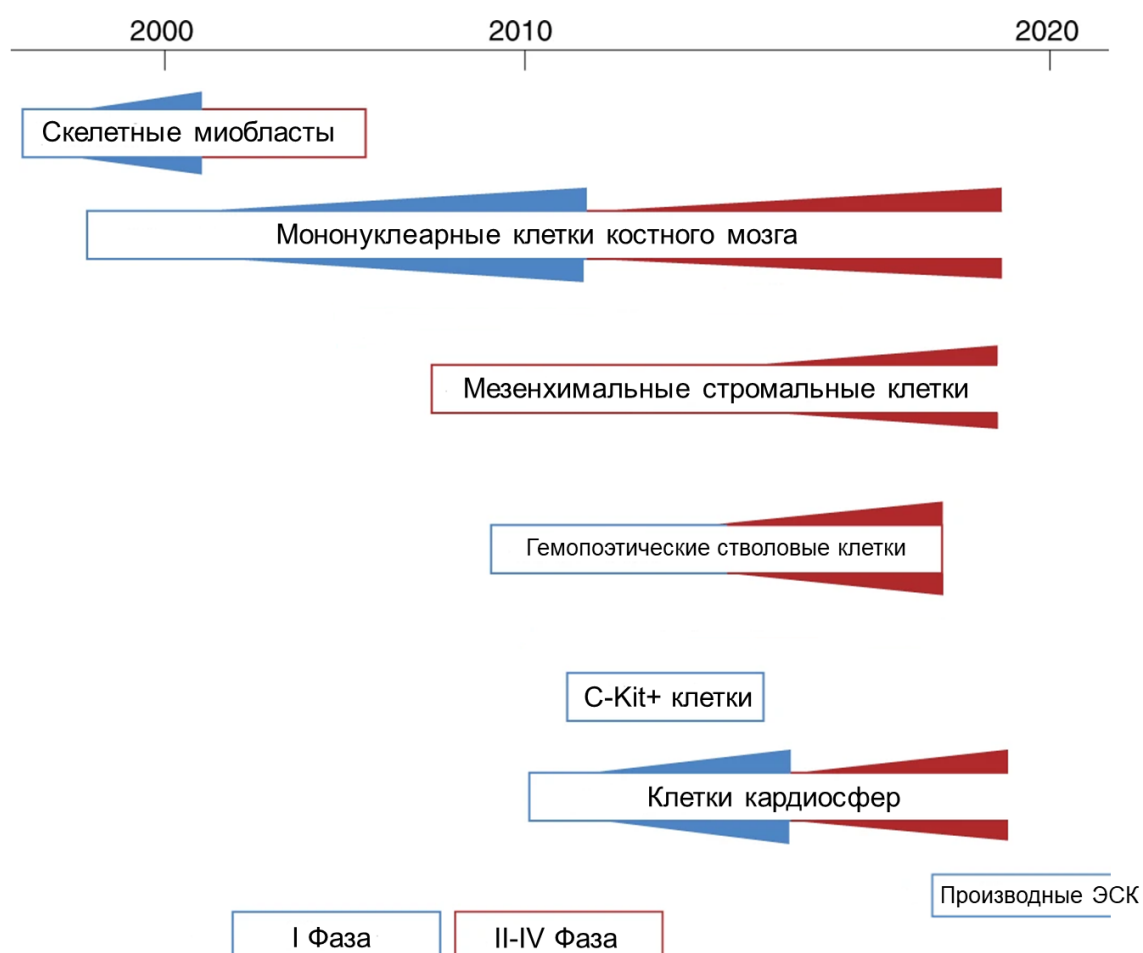


Рисунок 3 – Различные типы клеток в клинических исследованиях терапии ИБС. Толщина треугольников примерно пропорциональна количеству испытаний, проведенных в каждый момент времени; испытания фазы I показаны синим цветом, испытания фазы II и более поздних — красным. ЭСК – эмбриональные стволовые клетки. Адаптировано из [Marban, 2018]

В разработке методов клеточной терапии для лечения ИБС выделяют два основных подхода: первый подход - трансплантация клеток с целью замещения утраченных сократительных элементов миокарда, другой подход заключается в трансплантации клеток с целью паракринной стимуляции регенеративных процессов и восстановления кровоснабжения в ишемически пораженных тканях [Michler, 2018; Nakamura and Murry, 2019] (Рисунок 4).

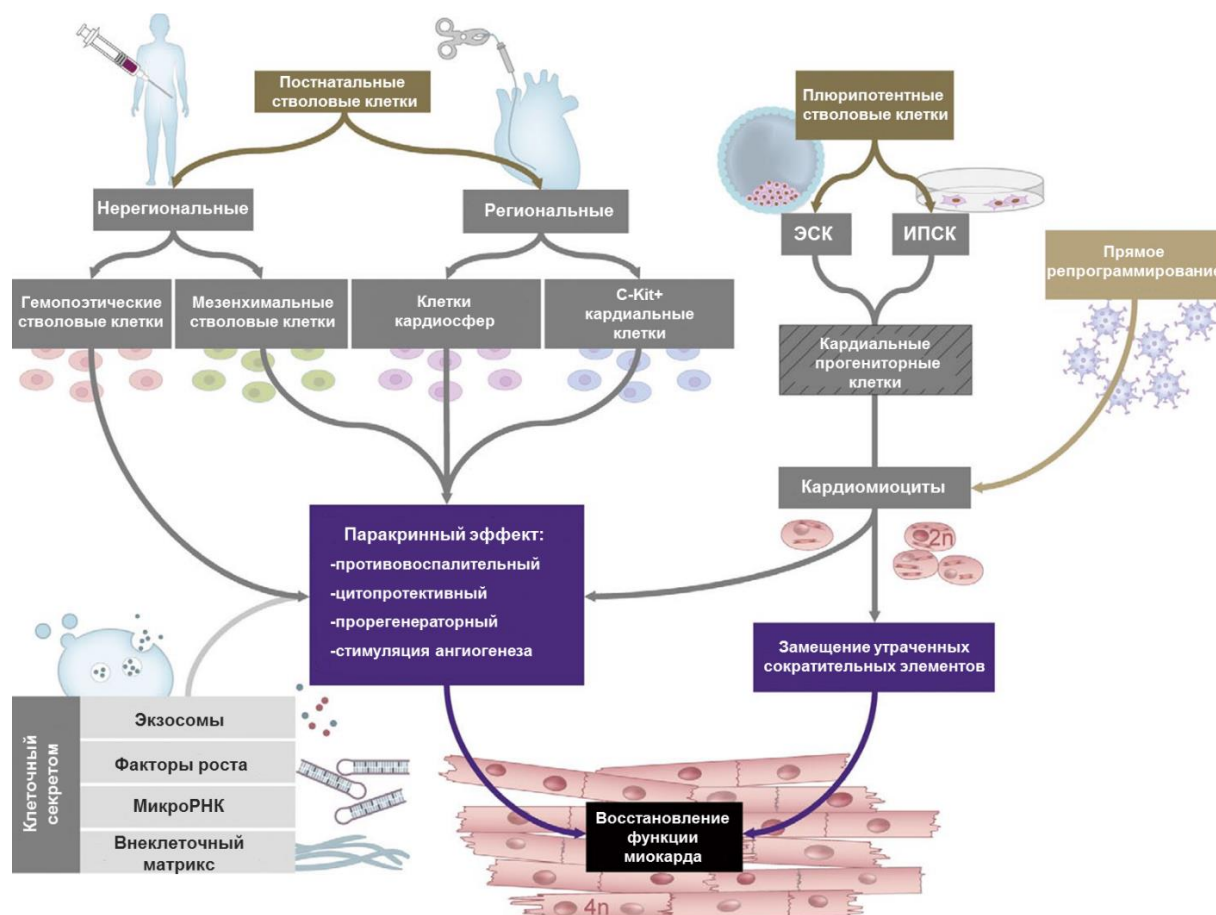


Рисунок 4 – Основные подходы клеточной терапии ИБС. Адаптировано из [Nakamura and Murry, 2019]

За последние три десятилетия вышло большое количество научных работ, посвященных трансплантации в миокард клеток с потенциальной сократительной активностью: эмбриональных кардиомиоцитов [Li et al., 1996], гладкомышечных клеток [Yoo et al., 2000], миобластов, полученных из скелетной мышцы [Murry et al., 1996; Menasche, 2008], а также кардиомиоцитов, полученных при направленной дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [Kawamura et al., 2017;

Gao et al., 2018]. С целью паракринной стимуляции регенерации миокарда использовали мезенхимальные стволовые клетки [Zhang et al., 2019; Chan et al., 2020], гемопоэтические стволовые клетки [Wolfien et al., 2020], эндотелиальные прогениторные клетки [Yue et al., 2020], внеклеточные везикулы [Sluijter et al., 2018], цитокины и факторы роста [Madonna et al., 2019].

Несмотря на большое количество работ, посвященных клеточной терапии ИБС, до сих пор не определен оптимальный тип клеток для трансплантации, недостаточно охарактеризованы свойства этих клеток и механизмы активации репаративных процессов в миокарде.

1.2.1. Нерегиональные клетки в терапии ишемической болезни сердца

Миобласты скелетных мышц

Скелетные миобласты были первым типом клеток, протестированными как в доклинических, так и в клинических исследованиях клеточной терапии ИБС [Muller et al., 2018]. Преимуществом этих клеток является простая возможность получения непосредственно от пациента, а также способность к дифференцировке в сократительные клетки [Witt et al., 2017].

Миобласты происходят из миосателлитных клеток, расположенных под базальной пластинкой скелетных мышечных волокон [Menasche et al., 2008]. Для них характерна экспрессия Pax7, Pax3, c-Met, M-кадгерина, CD34, синдекана-3 и кальцитонина [Hirai et al., 2010]. Во взрослой мышце сателлитные клетки в норме митотически находятся в покое [Sacco et al., 2008]. После повреждения сателлитные клетки активируются, инициируют экспрессию MyoD и вступают в клеточный цикл, в ходе которого дают начало миогенным клеткам-предшественникам, или миобластам [Asakura, 2003]. После нескольких раундов клеточного деления миобласты выходят из клеточного цикла, сливаются друг с другом, формируют многоядерные мышечные трубки и зрелые мышечные волокна. Миобласты, выделенные из скелетной мышцы взрослого организма, могут быть легко размножены *ex vivo*.

Способность миобластов к формированию мышечных волокон в регенерирующих мышцах и эктопических мышечных волокон в неммышечных тканях используется при потенциальном терапевтическом подходе к мышечной дистрофии Дюшенна, урологической дисфункции и сердечной недостаточности [Motohashi et al., 2014].

В ранних неконтролируемых клинических исследованиях сообщалось, что трансплантированные скелетные миобласты приживлялись в сердце, в дальнейшем у пациентов отмечалось улучшение показателей сердечной деятельности [Menasche et al., 2003]. Однако эти результаты не были воспроизведены в последующем рандомизированном контролируемом исследовании с участием 97 пациентов с тяжелой дисфункцией ЛЖ, которым производили трансэпикардальную трансплантацию аутологичных скелетных миобластов во время коронарного шунтирования. Через 6 месяцев после операции у пациентов, получивших лечение клетками, не было отмечено различий функционального состояния ЛЖ по сравнению с контрольной группой, однако возросла частота желудочковой тахикардии, что привело к досрочному завершению исследования [Menasche et al., 2008]. Аналогичные результаты были получены в клиническом исследовании SEISMIC, где использовали трансэндокардальную трансплантацию скелетных миобластов. Через четыре года после процедуры не было отмечено различий в функции ЛЖ между опытной и контрольной группами [Veltman et al., 2008]. Считается, что трансплантированные скелетные миобласты не способны обеспечить полноценную электрическую проводимость в сердце [Alrefai et al., 2015].

Гемопозитические стволовые клетки

Один из типов стволовых клеток костного мозга, использующихся в клеточной терапии, это гемопозитические стволовые клетки (ГСК). ГСК составляют не более 0,1% нефракционированных мононуклеарных клеток костного мозга [Challen et al., 2010]. ГСК способны к самообновлению и дают начало мультипотентным предшественникам, которые в ходе

последовательной дифференцировки продуцируют специализированные клетки, в том числе лимфоциты, дендритные и натуральные киллеры, мегакариоциты, эритроциты, гранулоциты и макрофаги [Rashedi et al., 2007]. Во время дифференцировки ГСК проявляют различные антигенные характеристики, связанные с их свойствами и функциями. Эти антигены позволяют определить субпопуляции стволовых клеток и улучшить результаты трансплантации ГСК за счет повышения чистоты клеточного продукта, используемого в аллотрансплантатах [Hombach-Klonisch et al., 2008]. ГСК человека экспрессируют поверхностный антиген CD34, который обычно используется в качестве маркера в клинических условиях для идентификации и количественного определения популяции клеток-предшественников, подлежащих инфузии [Menichella et al., 1999]. Фракционирование циркулирующих CD34+ ГСК на отдельные функциональные подмножества на основе экспрессии CD90, CD38, c-Kit, CD105, HLA-DR, как правило, является нецелесообразным из-за невозможности точного определения субпопуляций с различными антигенными характеристиками [Hombach-Klonisch et al., 2008].

В 2001 г было проведено исследование по изучению влияния интрамиокардиального введения ГСК во время моделирования ИМ у мышей [Orlic et al., 2001]. Исследователи сообщили, что трансплантированные клетки дифференцировались в кардиомиоциты и эндотелиальные клетки, что привело к относительному улучшению функциональных характеристик сердца у животных. Последующие работы по использованию ГСК в клеточной терапии ИБС не смогли продемонстрировать положительный эффект от их трансплантации, также в этих работах была показана неспособность ГСК дифференцироваться в кардиомиоциты [Balsam et al., 2004; Murry et al., 2004]. Противоречивые результаты, полученные в данных работах, объяснялись использованием различных протоколов выделения и культивирования клеток.

В ряде клинических исследований, посвященных использованию ГСК для лечения пациентов, страдающих ИБС (преимущественно ишемической кардиомиопатией), было показано, что трансплантация ГСК не вызывала

осложнений и была полностью безопасна для пациентов, но существенных улучшений в функциональном состоянии сердца отмечено не было [Clifford et al., 2012; Perin et al., 2012; Assmus et al., 2016]. В настоящее время рассматривается гипотеза, что ГСК могут оказывать паракринный эффект на пораженные ткани сердца с помощью выделения факторов роста, способствующих ангиогенезу [Nakamura and Murry, 2019].

Эндотелиальные прогениторные клетки

В 1997 г была описана группа стволовых клеток костномозгового происхождения, получившая название эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) (за их способность к дифференцировке в эндотелиальные клетки *in vitro*) [Asahara et al., 1997]. ЭПК представляют собой проваскулогенную субпопуляцию ГСК и экспрессируют поверхностные маркеры CD34 и CD133 [Muller et al., 2018]. Возможность применения ЭПК в терапии ИБС основывается на их способности непосредственно участвовать в образовании новых кровеносных сосудов в тканях донора, а также стимулировать ангиогенез с помощью паракринного влияния. Также было показано, что системное введение ЭПК приводит к усилению процесса неоваскуляризации в ишемизированных тканях [Murohara et al., 2000; Kawamoto et al., 2001].

В клиническом исследовании RENEW, посвященном интрамиокардиальной трансплантации аутологичных ЭПК пациентам с рефрактерной стенокардией, была показана безопасность применения этих клеток, также авторами было отмечено улучшение некоторых функциональных показателей ЛЖ [Friis et al., 2011]. В клиническом исследовании PERFECT наблюдалось уменьшение размера постинфарктного рубца, а также улучшение сегментарной перфузии миокарда после интрамиокардиальной трансплантации аутологичных ЭПК во время процедуры аортокоронарного шунтирования у пациентов с острым ИМ, однако различий во ФВ ЛЖ после трансплантации клеток обнаружено не было [Steinhoff et al., 2017].

Мезенхимальные стволовые клетки

Еще одна группа стволовых клеток костного мозга это мезенхимальные стволовые клетки (МСК), также известные как мезенхимальные стромальные клетки или колониобразующие единицы фибробластов. МСК характеризуются адгезией к пластику, способностью дифференцироваться в остеобласты, адипоциты и хондроциты в определенных условиях *in vitro* и экспрессией специфических клеточных маркеров, таких как CD73, CD90 и CD105, в то время как CD14, CD45, CD34, HLA-DR отсутствуют [Muller et al., 2018]. Примечательно, что МСК обладают низким уровнем экспрессии молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС II), что позволяет применять их для аллогенной трансплантации [Karantalis et al., 2015]. Считается, что МСК способны подавлять выработку воспалительных цитокинов и оказывать цитопротективный и ангиогенный эффект [Spees et al., 2016; Bayat and Chien, 2020]. Это делает МСК перспективным источником получения клеточных культур для терапии ИБС.

В исследованиях по интрамиокардиальной трансплантации МСК разным видам лабораторных животных с искусственно вызванным ИМ было показано относительное уменьшение зоны кардиосклероза и усиление ангиогенеза в периинфарктной зоне [Rabbani et al., 2017; Zarniko et al., 2020; Li et al., 2021]. Недавний метаанализ, включающий 58 доклинических исследований, показал общее уменьшение размера постинфарктного рубца примерно на 7%, а также улучшение сократительной функции сердца примерно на 11% после трансплантации МСК на животных моделях острого ИМ и хронической ИБС [Kanelidis et al., 2017].

В 2009 г было проведено клиническое исследование, посвященное внутривенному введению МСК пациентам после перенесенного ИМ [Hare et al., 2009]. В исследовании было показано, что у пациентов, получивших лечение, снижался риск развития аритмии, также было отмечено относительное улучшение функциональных характеристик ЛЖ через 3 месяца после инъекций. В клиническом исследовании POSEIDON, посвященном

применению МСК у пациентов, перенесших коронарное шунтирование при ишемической кардиомиопатии, были получены аналогичные результаты [Hare et al., 2012]. В клиническом исследовании C-CURE МСК обрабатывались цитокиновым коктейлем, предназначенным для индукции кардиогенной дифференцировки, получившиеся в результате клетки назвали кардиопоэтические стволовые. При трансэндокардиальном введении кардиопоэтических стволовых клеток в ЛЖ пациентов, страдающих ишемической кардиомиопатией, было показано относительное улучшение сократительной функции сердца по сравнению с контрольной группой [Bartunek et al., 2013]. В клиническом исследовании PROMETHEUS у пациентов отмечалось относительное уменьшение зоны кардиосклероза и улучшение сократительной функции сердца после интрамиокардиальной трансплантации аутологичных МСК [Karantalis et al., 2014]. В других клинических исследованиях также было отмечено относительное уменьшение зоны кардиосклероза в сердце после трансэндокардиальных инъекций МСК [Suncion et al., 2014; Teerlink et al., 2017; Kim et al., 2018]. Следует отметить, что в некоторых клинических исследованиях не наблюдалось различий между группами, получавшими МСК, и контрольной группой пациентов [Heldman et al., 2014; Chullikana et al., 2015; Perin et al., 2015].

Хотя основным источником МСК является костный мозг, их также можно выделить практически из любого органа [Meirelles et al., 2006]. Особенно уделяется внимание клеткам, полученным из жировой ткани: в экспериментальных исследованиях на животных было показано улучшение сократительной функции сердца и стимуляция ангиогенеза после инъекций МСК, полученных из жировой ткани [Alrefai et al., 2015; Kim et al., 2017].

1.2.2. Региональные клетки в терапии ишемической болезни сердца

C-Kit+ клетки сердца

В 2003 г коллективом авторов под руководством Р. Anversa была выдвинута гипотеза о существовании в постнатальном миокарде так называемых региональных стволовых клеток сердца, экспрессирующих на поверхности рецептор фактора стволовых клеток (SCF) – c-Kit (CD117), данная гипотеза была основана на том факте, что c-Kit является одним из маркеров ГСК и, следовательно, его присутствие может указывать на наличие популяции прогениторных клеток в сердце [Beltrami et al., 2003]. В своей работе исследователи показали, что c-Kit – позитивные (c-Kit⁺) клетки сердца не экспрессируют маркеры ГСК (CD34, CD45) и способны дифференцироваться *in vitro* в кардиомиоцитарном, эндотелиальном и гладкомышечном направлениях [Beltrami et al., 2003]. Той же группой ученых было показано, что при трансплантации c-Kit⁺ клеток в ишемизированное сердце у крыс происходило восстановление до 70% пораженного миокарда предположительно за счет образования новых кардиомиоцитов *in vivo* из клеток донора [Beltrami et al., 2003], аналогичные результаты были получены позднее в экспериментах на собаках и мини-свиньях [Linke et al., 2005; Ellison et al., 2011].

C-Kit⁺ клетки сердца представлены и в левом и в правом желудочках, но в наибольшей степени они локализуются в областях с минимальной гемодинамической нагрузкой (предсердия и верхушка сердца) [Leri et al., 2005; Itzhaki-Alfia et al., 2009; Mishra et al., 2011], а при ишемии миокарда происходит их миграция в зону повреждения [Beltrami et al., 2003; Urbanek et al., 2005; Sanada et al., 2014]. Во время эмбрионального развития сердца c-Kit⁺ клетки, находящиеся в проэпикарде, подвергаются эпителиально-мезенхимальному переходу и дифференцируются в эндотелиоциты, гладкомышечные клетки и фибробласты [Keith and Bolli, 2015; Парфенова, 2019].

Открытие региональных стволовых клеток сердца в научном сообществе было воспринято с энтузиазмом, однако в последующие годы в работах независимых исследовательских групп не удалось показать возможность дифференцировки c-Kit⁺ клеток в кардиомиоцитарном направлении как *in vitro*, так и *in vivo* после трансплантации в сердце [Zaruba et al., 2010; Laflamme and Murry, 2011; Sultana et al., 2015]. При дальнейших исследованиях возможности самообновления миокарда с использованием метода изотопной масс-спектрометрии было показано, что образование новых кардиомиоцитов в нормальных условиях в сердце лабораторных мышей происходит не из c-Kit⁺ клеток, а из уже существующих кардиомиоцитов с очень низкой скоростью (приблизительно 0,76% в год) и при моделировании ишемии миокарда процесс образования новых клеток незначительно возрастает [Senyo et al., 2013]. Также с помощью метода отслеживания клонов в нескольких работах было показано, что лишь <0,01% новообразованных кардиомиоцитов дифференцируются из c-Kit⁺ клеток сердца [Van Berlo et al., 2014; Hatzistergos et al., 2015; Sultana et al., 2015; Liu et al., 2016; Eschenhagen et al., 2017]. В то же время в большинстве экспериментальных работ отмечалось относительное восстановление сократительной функции сердца после трансплантации c-Kit⁺ клеток в ишемизированный миокард. Метаанализ 80 доклинических исследований оценки эффективности трансплантации аутологичных и аллогенных c-Kit⁺ клеток при остром ИМ продемонстрировал среднее увеличение ФВ ЛЖ почти на 11% по сравнению с контрольными группами, причем у мелких животных эффект был более значительным, чем у крупных [Zwetsloot et al., 2016; Парфенова, 2019].

В клиническом исследовании CONCERT-HF было показано улучшение функциональных и структурных характеристик левого желудочка у пациентов с сердечной недостаточностью, вызванной ишемической кардиомиопатией, после совместной трансплантации аутологичных МСК и c-Kit⁺ кардиальных клеток [Bolli et al., 2021].

Согласно гипотезе, выдвинутой Роберто Болли в 2015 г, c-Kit⁺ клетки взрослого сердца имеют эпикардальное происхождение и на основании иммунофенотипа (экспрессия мезенхимальных маркеров CD90, CD105) являются региональными мезенхимальными клетками, а положительное влияние трансплантации c-Kit⁺ клеток на восстановление миокарда после ишемического повреждения, показанное во многих работах, может объясняться их секреторной активностью по аналогии с уже описанным механизмом действия трансплантированных МСК [Keith and Bolli, 2015].

Таким образом, в настоящее время наиболее общепризнанной является точка зрения о том, что c-Kit⁺ клетки сердца, не являются стволовыми клетками, различные исследователи называют их прогениторными клетками сердца или кардиальными мезенхимальными / стромальными клетками [Davis, 2019; Fathi et al., 2020; Kang et al., 2020]. Регенеративный эффект c-Kit⁺ клеток при трансплантации в пораженный миокард может быть обусловлен секрецией цитокинов (TCA-3, SDF-1), факторов роста сосудов (VEGF, HGF, эритропоэтин, FGFb, остеопонтин, SCF), регуляторных факторов дифференцировки сердца (Activin A, Dkk homolog-1, TGF- β) и стимуляцией ангиогенеза в месте введения [Muller et al., 2018; Дергилев и др., 2019; Парфенова, 2019; Davis, 2019].

Клетки кардиосфер

Термин «кардиосфера» был введен в 2004 г по отношению к популяции недифференцированных клеток, полученных после ферментативной обработки эксплантов стенки предсердия [Messina et al., 2004]. Кардиосферы представляют собой гетерогенную клеточную популяцию: в них содержится ядро, состоящее из c-Kit⁺ клеток, несколько слоев клеток, экспрессирующих коннексин 43 (Cx43 - основной коннексин щелевых контактов в сердце), и наружный слой, состоящий из клеток, на поверхности которых обнаруживается CD105 [Smith et al., 2007; Leri et al., 2011].

Несмотря на обширный и растущий интерес к этому типу клеток, об их происхождении известно относительно мало: предположительно, кардиосферы возникают из стромальных клеток, присутствующих в интактном миокарде и пролиферирующих в первичной культуре в процессе формирования кардиосферы *in vitro* [Marban and Liao, 2022].

В исследованиях с использованием клеток кардиосфер для терапии экспериментального ИМ у грызунов было показано относительное улучшение функциональных характеристик сердца [Messina et al., 2004]. Исследования по сравнению эффективности лечения экспериментального ИМ у мышей с помощью МСК костного мозга, МСК жировой ткани, ГСК и клеток кардиосфер показали, что в группе, получившей трансплантацию клеток кардиосфер восстановление сердечной мышцы происходило наилучшим образом [Li et al., 2012]. Авторы объясняли это преимущество тем, что межклеточные взаимодействия в составе кардиосферы обеспечивают оптимальные условия для функционирования трансплантированных клеток в миокарде. В то же время в нескольких экспериментальных исследованиях на животных с искусственно вызванным ИМ не было обнаружено терапевтического эффекта после интрамиокардиальной трансплантации клеток кардиосфер [Kasai-Brunswick et al., 2017; Zhao et al., 2018].

В 2007 г был разработан клинический протокол получения клеток кардиосфер человека с помощью эндомиокардиальной биопсии [Smith et al., 2007]. Наличие терапевтического потенциала клеток кардиосфер человека, было показано в экспериментах с моделированием ишемии-реперфузии у свиней [Johnston et al., 2009]. В первой фазе клинических испытаний CADUCEUS исследовалось интракоронарное введение аутологичных клеток кардиосфер пациентам, перенесшим ИМ [Makkar et al., 2012]. Авторы использовали эндокардиальную биопсию для получения участков сердечной мышцы и последующего выделения кардиосфер, которые вводили пациентам через 2–4 недели после ИМ. Было показано, что использование кардиосфер является безопасным для организма человека. Результаты магнитно-

резонансной томографии, проведенной через 3 месяца, показали, что у пациентов, получивших лечение, наблюдается относительное уменьшение зоны кардиосклероза, возрастание массы здорового миокарда и толщины стенки левого желудочка, но достоверных изменений фракции выброса не наблюдалось [Makkar et al., 2012]. В последующих клинических испытаниях в США использовались аллогенные клетки кардиосфер, которые, как было установлено, обладают сходным терапевтическим эффектом и являются более перспективными для использования в качестве клеточного продукта для терапии ИБС [Marban and Liao, 2022]. К ним относятся ALLSTAR (пациенты после ИМ со слабо выраженной сердечной недостаточностью и низкой ФВ) [Makkar et al., 2020], DYNAMIC (пациенты после ИМ с более выраженной сердечной недостаточностью и низкой ФВ) [Chakravarty et al., 2019], HOPE-Duchenne и HOPE-2 (пациенты с мышечной дистрофией Дюшенна и связанной с ней кардиомиопатией) [Taylor et al., 2019; McDonald et al., 2022]. Эти испытания, которые в настоящее время завершены, подтвердили не только безопасность клинического применения клеток кардиосфер, но и то, что они могут обладать болезнью-модифицирующей биологической активностью [Marban and Liao, 2022].

Преобладающая концепция эффективности клеток кардиосфер основывается на «паракринной гипотезе», согласно которой трансплантированные клетки продуцируют везикулы, содержащие биологически активные молекулы [Gnecchi et al., 2008; Marban and Liao, 2022]. Терапевтическое действие клеток кардиосфер включает в себя антифибротический эффект [Tseliou et al., 2014; Tseliou et al., 2015], антиапоптотический эффект [Cheng et al., 2012; Li et al., 2011], стимуляцию ангиогенеза [Chimenti et al., 2010; Tseliou et al., 2014], модуляцию воспалительных процессов и окислительного стресса [Tseliou et al., 2014; Aminzadeh et al., 2015] и стимулирование повторного входа кардиомиоцитов в клеточный цикл [Malliaras et al., 2013].

Эпикардальные прогениторные клетки

Эпикард — наружный слой стенки сердца, тесно прилежащий к миокарду, образован эпикардальными мезотелиальными клетками, коллагеновыми и эластическими волокнами [Дергилев и др., 2021]. Формирование функционирующего сердца в процессе эмбриогенеза идет за счет кардиогенной мезодермы, сердечного нервного гребня и проэпикарда [Meilhac et al., 2015]. Практически у всех позвоночных проэпикард представляет собой кластер прогениторных клеток, расположенный в венозном полюсе эмбрионального сердца [Risebro et al., 2015]. В эмбриогенезе эпикардальные прогениторные клетки появляются в процессе эпителиально-мезенхимального перехода и способствуют развитию кардиальных фибробластов, гладкомышечных клеток и перицитов [Rao and Spees, 2017]. Начиная со второй половины эмбрионального развития, клетки эпикардального мезотелия постепенно утрачивают способность к пролиферации, превращаются в слой покоящихся клеток эпикарда и остаются таковыми в постнатальном периоде [Chen et al., 2002; Дергилев и др., 2021].

Долгое время считалось, что во взрослом сердце эти клетки функционально неактивны, однако в недавних исследованиях было показано, что они могут участвовать в регенерации тканей сердца при возрастных изменениях или после повреждения миокарда [Zhou et al., 2011]. Единая доказанная концепция этих влияний пока еще отсутствует, однако на различных животных моделях было показано, что эпикард участвует в реципрокном паракринном сигналинге, стимулируя пролиферацию кардиомиоцитов, рекрутирование макрофагов, а также рост и созревание коронарных сосудов [Quijada et al., 2020]. Следует отметить, что результаты исследований, идентифицирующих сигнальные пути, посредством которых реализуется участие эпикардальной ткани в регенерации миокарда, в значительной мере зависят как от способа нанесения повреждения (как правило, криоповреждение или резекция верхушки сердца), так и от видовой принадлежности используемых лабораторных животных [Cao and Poss, 2018].

Наиболее предпочтительной моделью считаются низшие позвоночные, в особенности рыбы *Danio rerio*, обладающие повышенной способностью к регенерации поврежденной сердечной мышцы во взрослом возрасте [Cano-Martínez et al., 2010]. Довольно часто исследования выполняют на новорожденных мышах, так как уже к 7-дневному возрасту их миокард теряет способность к регенерации, и его повреждения приводят к образованию рубцовой ткани [Darehzereshki et al., 2015].

В настоящее время сложилось мнение, что эпикард представляет собой гетерогенную группу из нескольких субпопуляций клеток, имеющих различный потенциал к реактивации экспрессии эмбриональных генов (*Wt1*, *Raldh2*, *Tbx18*) при повреждении миокарда, последующей пролиферации и активации эпителиально-мезенхимального перехода, что может иметь большое клиническое значение для терапевтического использования [Cao and Poss, 2018]. После активации эпикард выделяет сигнальные митогенные факторы для кардиомиоцитов, способствуя регенерации сердца [Foglia and Poss, 2016; Karra and Poss, 2017]. Основными регуляторами данного процесса, известными к настоящему времени, являются TGF β , PDGF, FGF, IGF, BMP, ретиноевая кислота, сигнальные пути Notch, NF- κ B, Hippo/Yap, Sonic Hedgehog, Wnt/ β -катенин и белки внеклеточного матрикса [Cao and Poss, 2018; Дергилев и др., 2021]. Также показано, что эпикардальные мезотелиальные клетки взрослого сердца человека в процессе эпителиально-мезенхимального перехода способны образовывать стромальные клетки сердца, экспрессирующие рецептор c-Kit [Di Meglio et al., 2010]. Таким образом регенеративный потенциал эпикардальных прогениторных клеток обусловлен выделением паракринных факторов и детерминирован спецификой реакций на каждый из активированных сигнальных путей, при этом непосредственного участия в образовании кардиомиоцитов из эпикардальных клеток обнаружено не было [Rao and Spees, 2017]. Все это свидетельствует о том, что для стимуляции регенеративных процессов в поврежденном сердце взрослого человека требуется активация эпикарда,

направленная на неоваскуляризацию и регенерацию, с блокированием фиброцитарного звена и провоспалительных факторов.

Первой попыткой фармакологического воздействия на эти процессы было использование тимозина $\beta 4$, который принимает участие в процессе васкуляризации неонатального сердца [Smart et al., 2007]. В экспериментах с моделированием ИМ у мышей были получены данные, что предварительная премедикация тимозином $\beta 4$ приводит к активации покоящихся эпикардиальных прогениторных клеток, что, в свою очередь, повышает уровень ангиогенеза в пораженных тканях [Smart et al., 2007; Smart et al., 2011]. Однако при введении тимозина $\beta 4$ в раннем постинфарктном периоде активации эпикардиальных клеток не наблюдали [Zhou et al., 2012].

Другие исследователи использовали для этих целей прокинетицин-1 (Prok1) и VEGF-A [Urayama et al., 2008; Zangi et al., 2013]. Кроме того, было показано, что субэпикардиальная имплантация коллагеновых патчей, содержащих Fstl-1 (фоллистатин-подобный белок 1, который секретируется эпикардиальными клетками и отвечает за регенерацию сердечной мышцы у млекопитающих за счет активации ангиогенных факторов) приводит к относительному восстановлению сократительной функции сердца у мышей и свиней с искусственным ИМ [Wei et al., 2015].

Таким образом, воздействия на эпикард являются относительно новым подходом к решению сложнейшей задачи терапевтической регенерации ишемических поражений сердца. Одним из направлений является создание тканеинженерных заплат с соответствующими компонентами экстрацеллюлярного матрикса, наполненных эпикардиальными клетками – зрелыми или прогениторными. Существует возможность использования других типов клеток, в том числе, генно-модифицированных таким образом, чтобы эти тканевые конструкторы могли секретировать митогены и влиять на неоваскуляризацию поврежденного миокарда. Дополнительным методом может стать стимулирование процессов репарации с помощью вирусных векторов, нацеленных на зрелые и прогениторные эпикардиальные клетки.

1.2.3. Плюрипотентные стволовые клетки в терапии ишемической болезни сердца

Эмбриональные стволовые клетки

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) происходят из внутренней клеточной массы бластоцисты на ранних стадиях развития эмбриона. ЭСК являются плюрипотентными, это означает, что они могут дифференцироваться во все три первичных зародышевых листка: эктодерму, энтодерму и мезодерму [Eckfeldt et al., 2005]. При правильно подобранных условиях культивирования ЭСК способны дифференцироваться в различные типы клеток взрослого организма, то есть обладают значительным терапевтическим потенциалом для лечения ИБС. Однако имеется ряд ограничений, снижающих возможность практического применения ЭСК в клеточной терапии: во-первых, недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки обладают онкогенным потенциалом, и их трансплантация может привести к образованию опухолей у реципиентов; во-вторых, ЭСК являются аллогенными клетками, что может привести к отторжению трансплантированных клеток организмом; и, наконец, применение ЭСК ограничивается законодательством многих стран из-за ряда морально-этических проблем [Ilic and Ogilvie, 2017; Rikhtegar et al., 2019].

На начальных этапах изучения возможности применения трансплантации ЭСК в терапии ИБС считалось, что они могут дифференцироваться в кардиомиоциты *in vivo* под влиянием микроокружения тканей сердца [Min et al., 2002]. Впоследствии это предположение было опровергнуто, после того как было показано образование тератом после внутримиекардиального введения недифференцированных ЭСК [Blin et al., 2010].

На следующих этапах внимание исследователей было сосредоточено на дифференцировке ЭСК в кардиомиоцитарном направлении *in vitro* и последующей трансплантации полученных клеток в миокард [Mummery et al.,

2012]. В нескольких экспериментальных исследованиях было показано, что кардиомиоциты, полученные из ЭСК человека и мыши, встраивались в миокард и принимали участие в репарации тканей сердца у экспериментальных животных [Laflamme et al., 2007; Fernandes et al., 2010; Pearl et al., 2011; Chong and Murry, 2014]. В клиническом исследовании ESCORT была показана краткосрочная безопасность трансплантации кардиальных производных ЭСК человека пациентам с тяжелой постинфарктной дисфункцией ЛЖ: за время наблюдения не было отмечено образования опухолей и аритмий, при этом у трех пациентов из шести развилась клинически бессимптомная аллоиммунизация [Menasche et al., 2018].

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки

В 2006 г была показана возможность репрограммирования дифференцированных соматических клеток в плюрипотентное состояние [Takahashi and Yamanaka, 2006]. Полученные клетки были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК). Открытие метода получения ИПСК с помощью репрограммирования дифференцированных клеток решает проблемы, возникающие при использовании ЭСК. Прежде всего, исчезает необходимость использования эмбрионов человека. Появляется возможность избежать проблем отторжения и гистонесовместимости. Кроме того, можно проводить исправление мутаций в клетках, полученных от пациента [Xu et al., 2009]. В итоге клетки, образованные после дифференцировки модифицированных ИПСК, могут применяться для пациент-специфичной терапии.

Направленную дифференцировку ИПСК в кардиомиоциты можно осуществлять с помощью факторов, участвующих в сигнальных путях BMP, TGFb/activin/NODAL, Wnt, и FGF [BurrIDGE et al., 2012] (Рисунок 5).

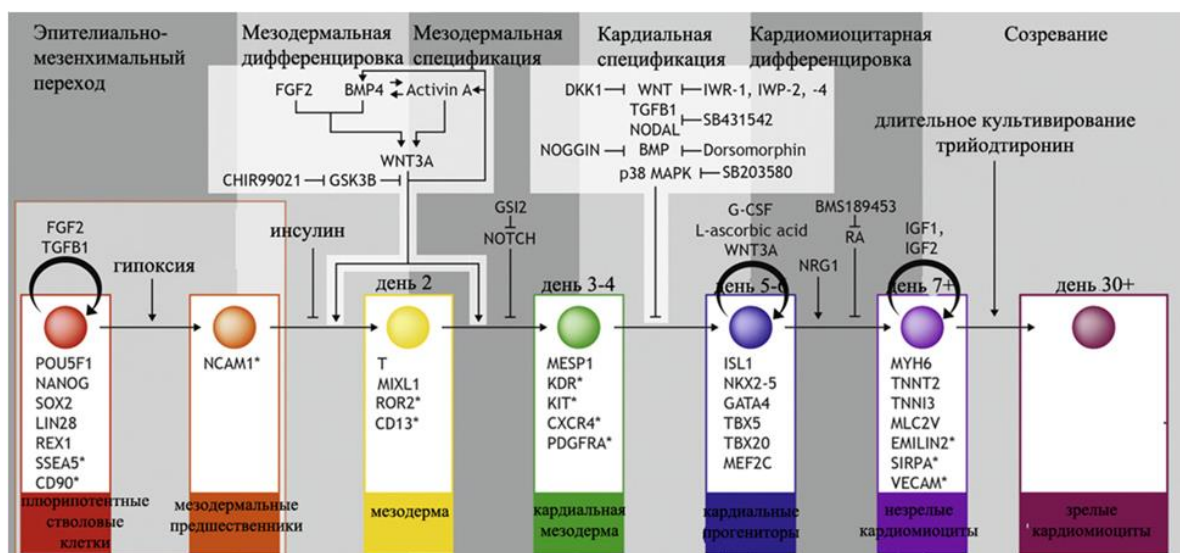


Рисунок 5 – Дифференцировка плюрипотентных стволовых клеток в кардиомиоциты. Указаны основные маркеры, характерные для определенной стадии дифференцировки клеток (звездочкой отмечены поверхностные маркеры). → — активация, ⊥ — ингибирование. Адаптировано из [Burrige et al., 2012]

ИПСК при определенных условиях способны дифференцироваться не только в кардиомиоциты, но и в эндотелиальные клетки артерий, вен и лимфатических сосудов [Narazaki et al., 2008; Pfannkuche et al., 2009; Zhang et al., 2009]. При трансплантации ИПСК человека мышам с экспериментальным ИМ было показано, что они способны дифференцироваться *in vivo* в гладкомышечном, эндотелиальном и кардиомиоцитарном направлениях [Nelson et al., 2009; Ieda et al., 2010].

Кардиомиоциты, полученные в результате направленной дифференцировки ИПСК, являются перспективным типом клеток для использования в терапии ИБС с целью замещения утраченных сократительных элементов миокарда [Lian et al., 2013; Burrige et al., 2014]. Дифференцированные кардиомиоциты обладают свойствами сократимости, возбудимости, а также отвечают на сигналы симпатической и парасимпатической нервной системы [Rojas et al., 2017; Павлова и др., 2018]. Однако на сегодняшний день не существует оптимальной технологии формирования и трансплантации функциональной ткани сердца, способной к генерации ритмической активности и синхронным сокращениям, из полученных *in vitro* клеток [Menasche, 2018].

1.3. Потенциальные механизмы клеточной терапии ишемической болезни сердца

Изучение механизмов, с помощью которых различные типы трансплантированных клеток регулируют регенерацию ишемически пораженных тканей сердца имеет огромное значение для развития и улучшения методов клеточной терапии. Способность восстанавливать поврежденную ткань может быть основана на прямом (интеграция в миокард для компенсации потери кардиомиоцитов или эндотелиальных клеток) и/или непрямом (паракринном) механизмах [Yu et al., 2017; Muller et al., 2018]. Данные, полученные из многочисленных исследований *in vitro* и *in vivo* привели к выводу, что фундаментальным механизмом, который опосредует положительные эффекты клеточной терапии, является паракринная передача сигналов [Gnecchi et al., 2008; Menasche and Vanneaux, 2016].

Паракринная передача сигналов позволяет трансплантированным клеткам воздействовать на окружающие ткани сердца путем активации различных сигнальных путей, а также не зависит от установления функциональных межклеточных контактов с клетками реципиента [Gallina et al., 2015]. Биологически активные молекулы, такие как TGF β , VEGF, SDF1, EGF, HGF могут секретироваться трансплантированными стволовыми клетками и клетками-предшественниками в межклеточное пространство или кровотока [Hodgkinson et al., 2016; Plotnikov et al., 2017]. Таким образом, высвобождение цитокинов или внеклеточных везикул является системным событием, которое способствует различным регенеративным процессам, таким как неоваскуляризация, снижение апоптоза эндогенных кардиомиоцитов, активация тканевых клеток-предшественников или привлечение клеток, принимающих участие в восстановлении пораженных тканей [Mirotsoy et al., 2011; Gallina et al., 2015]. На характеристики секретомы трансплантированных клеток и его способности к регенерации миокарда существенно влияют статус здоровья и возраст донора, а также методы

получения и предтрансплантационной подготовки клеточного материала [Muller et al., 2018].

Неоваскуляризация является важной частью процессов регенерации, поскольку данный процесс позволяет пополнение ишемически поврежденных тканей питательными веществами и кислородом. В исследовании с использованием мышинной модели ИМ было обнаружено, что клетки кардиосфер человека после трансплантации высвобождают проангиогенные факторы, включая VEGF, HGF и IGF1, авторы данной работы наблюдали усиление неоваскуляризации в перинфарктной зоне на 20% после подкожной инъекции клеток, что было связано преимущественно с паракринным сигналингом [Chimenti et al., 2010]. Недавно опубликованное исследование еще раз подтвердило стимулирующее влияние клеток кардиосфер на ангиогенез у мышей и идентифицировало эндоглин (CD105), корецептор для TGF β , как важный медиатор этой паракринно-стимулируемой неоваскуляризации [Redgrave et al., 2017]. Также было показано, что крысиные c-Kit⁺ клетки сердца значительно улучшали ангиогенез после аутологичной трансплантации в перинфарктную зону путем секреции VEGF [Bao et al., 2017].

МСК, полученные из разных источников, способны высвободить проангиогенные факторы, способствуя образованию новых кровеносных сосудов [Gallina et al., 2015; Zhao et al., 2017]. Было показано, что МСК жировой ткани секретируют VEGF, HGF и IGF1 *in vitro* и увеличивают плотность капилляров в перинфарктной зоне после трансплантации крысам [Wang et al., 2009]. Поскольку прямая эндотелиальная дифференцировка инъецированных клеток в данной работе была очень низкой (<1%), авторы пришли к выводу, что улучшение неоваскуляризации в основном стимулировалось паракринным выбросом цитокинов [Wang et al., 2009]. Терапевтическая активность секрета МСК костного мозга была также показана в работе L. Timmers и соавт., которые внутривенно вводили кондиционную среду МСК человека свиньям с экспериментальным ИМ

[Timmers et al., 2011]. Через 3 недели у животных, получавших кондиционную среду, наблюдалось значительно большее число капилляров в пограничной области, чем у контрольной группы [Timmers et al., 2011].

Доклинические исследования с применением ГСК и ЭПК показали значительное повышение плотности капилляров и увеличение неоваскуляризации в ишемически пораженных тканях сердца после ИМ [Kawamoto et al., 2006; Iwasaki et al., 2006; Skorska et al., 2017]. Также было показано, что ГСК и ЭПК способны секретировать проангиогенные факторы VEGF, FGFb, IGF1, HGF и SDF-1 α [Asahara et al., 2011; Bongiovanni et al., 2014].

1.4. Способы трансплантации клеток в миокард

Способ доставки клеток в сердце реципиента должен обеспечить возможность достаточному количеству жизнеспособных донорских клеток попасть в поврежденные участки миокарда вскоре после трансплантации и сохраниться в течение длительного времени, эффективно приживаясь и функционируя [Nakamura and Murry, 2019]. В настоящее время не существует оптимального способа трансплантации клеток в сердце: обычно используются такие взаимозаменяемые методы как интрамиокардиальное, интракоронарное и внутривенное введение [Nakamura and Murry, 2019; Madonna et al., 2019].

С помощью интракоронарного метода введения можно напрямую доставить клетки в пораженные участки миокарда через коронарные артерии [Sheng et al., 2013]. Эта процедура, как правило, проводится во время первичного чрескожного коронарного вмешательства у пациентов с острым ИМ. С помощью ретровирусной трансфекции плазмидами, экспрессирующими GFP, была продемонстрирована возможность транскоронарной миграции трансплантированных c-Kit⁺ стромальных клеток сердца и последующего их приживания в миокарде животного-реципиента [Dawn et al., 2005]. Однако при интракоронарном введении наблюдается

вымывание клеток в системный кровоток и, как следствие, незначительная приживляемость в сердце, что может быть достаточным для паракринных эффектов, но не для восстановления миокарда при заместительной терапии [Madonna et al., 2019]. Кардиомиоциты, полученные с помощью направленной дифференцировки ИПСК, не могут быть доставлены с помощью интракоронарной инфузии в больших количествах, поскольку есть риск закупорки микрососудистого русла [Nakamura and Murry, 2019].

Внутривенное введение путем периферической инъекции — наиболее простой и наименее инвазивный способ, не требующий хирургических и эндоскопических вмешательств. Концепция эффективности внутривенного метода введения стволовых клеток основана на существовании эффекта «хоуминга» — усиления миграции клеток в места поврежденного миокарда [Szydla, 2019]. Однако при таком способе доставки отмечается, что большая часть трансплантированных клеток из системного кровотока попадает в легкие и незначительное число клеток обнаруживается в сердце, а также в печени и селезенке [Barbash et al., 2003].

Интрамиокардиальное введение клеток в сердце можно произвести двумя способами: трансэндокардиальным и трансэпикардиальным. Трансэпикардиальный метод используется во время операции на открытом сердце. Данный метод обеспечивает точную доставку клеток в нужный участок миокарда с помощью прямой визуализации области ишемии. Трансэндокардиальное интрамиокардиальное введение является эффективным и вместе с тем малоинвазивным способом трансплантации клеток. Введение клеток производится с помощью специальной системы (NOGA-system), состоящей из катетера с иглой, и системы электромеханического картирования [Cheng and Law, 2017] (Рисунок 6).

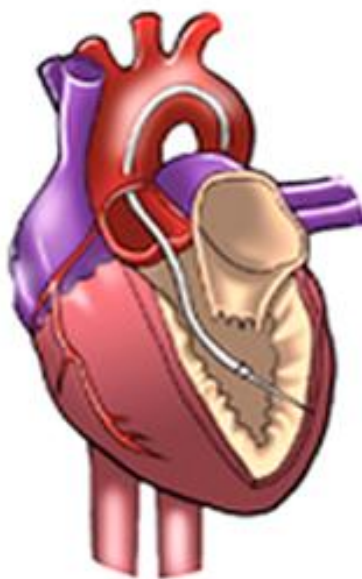


Рисунок 6 – Интрамиокардиальная трансплантация клеток с помощью эндоваскулярного инъекционного катетера. Адаптировано из [Katz et al., 2012]

В экспериментальном исследовании при моделировании инфаркта миокарда у мини-свиней было показана одинаковая эффективность трансэндокардиального и трансэпикардиального методов трансплантации культуры аутологичных скелетных миобластов [Larose et al., 2010]. При сравнении различных способов трансплантации CD34⁺ аутологичных стволовых клеток костного мозга пациентам с неишемической дилатационной кардиомиопатией было показано, что при использовании интрамиокардиального введения в сердце приживается большее количество трансплантированных клеток, чем при интракоронарном введении [Vrtovec et al., 2013]. Однако при использовании метода интрамиокардиальной инъекции клеток существует риск перфорации миокарда [Nakamura and Murry, 2019].

При используемых способах трансплантации клеток отмечается их относительно невысокая приживаемость в организме: максимум 10–15% вне зависимости от количества введенных клеток [Nguyen et al., 2016]. Для повышения приживаемости клеток в организме реципиента может использоваться трансплантация в составе различных матриц или тканеинженерных конструкций [Alrefai et al., 2015; Madonna et al., 2019; Arjmand et al., 2021] (Рисунок 7).

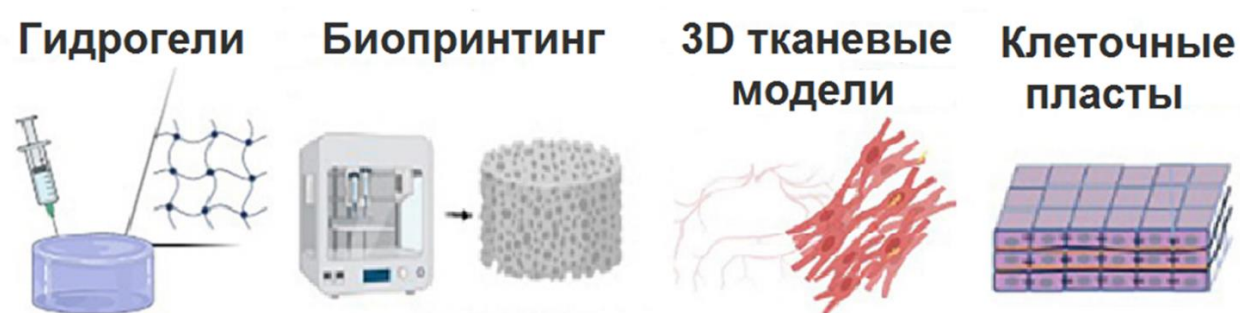


Рисунок 7 – Тканеинженерные методы, разрабатываемые для клеточной терапии ИБС. Адаптировано из [Arjmand et al., 2021]

1.5. Заключение к обзору литературы

Применение клеточной терапии у пациентов с ИБС в дополнение к хирургическим и фармакологическим методам лечения может способствовать более полному восстановлению пораженного миокарда и улучшению качества жизни пациентов. Однако проведенные экспериментальные и клинические исследования по трансплантации клеток демонстрируют в целом скромные, а в некоторых случаях даже отрицательные или противоречивые результаты. Это может объясняться различными причинами, связанными как с методами получения и предтрансплантационной подготовки клеточного материала, выбранным способом доставки клеток в организм, а также используемым дизайном исследования и неоднородностью критериев включения. Во многих исследованиях также систематически не учитывались особенности пациентов, такие как пожилой возраст, наличие сопутствующих заболеваний и клиническая картина течения ИБС.

На сегодняшний день остается непонятным, какой тип клеток лучше всего подходит для использования в клинической практике. Для клеточной терапии ИБС были использованы многие типы клеток, но сделано это было без достаточного количества доклинических и экспериментальных исследований, определяющих механизм их действия при трансплантации в сердце.

Комбинированная терапия действительно может обеспечивать дополнительные преимущества, учитывая разнообразную активность различных типов клеток, но в настоящее время нет достаточных данных для определения наиболее эффективных комбинаций.

Неисследованным также остается вопрос подбора количества трансплантированных клеток как для заместительной терапии, так и для терапии с помощью паракринного эффекта. В отсутствие хорошо проведенных и надлежащим образом контролируемых доклинических исследований оптимальная дозировка клеточного материала для трансплантации в миокард остается неизвестной, и ее необходимо определять эмпирическим путем для каждого исследования.

Несмотря на ряд нерешенных вопросов, существующий опыт применения клеток для терапии ИБС дает основу для последующей разработки новых протоколов получения и подготовки клеточного материала для трансплантации, а также для разработки эффективных и безопасных способов доставки клеток в организм.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Получение клеточных культур

2.1.1. Получение культур клеток из фрагментов предсердия человека

Культуры клеток человека получали из послеоперационного материала (ушко правого предсердия), предоставленного НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина, все пациенты подписывали информированное согласие на участие в научном исследовании перед процедурой. Полученные экспланты сердца механически измельчали до фрагментов размера 1–2 мм³ и обрабатывали 0,2%-м раствором коллагеназы NB4 (Serva) в течение 60 мин при 37°C. Супернатант отбирали в отдельную пробирку, добавляли равный объем фосфатно-солевого буферного раствора (PBS (Биолот)), центрифугировали 5 мин при 300 g, осадок аккуратно ресуспендировали в ростовой среде и помещали суспензию в культуральную посуду. Далее клетки культивировали при 37°C и содержании CO₂ в атмосфере 5% в ростовой среде FD (50% - DMEM (Invitrogen), 50% - F12 (Invitrogen)) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS (Autogene Bioclear)), 100 ед/мл пенициллина (Gibco), 100 ед/мл стрептомицина (Gibco), 2 ммоль/л L-глутамин (Invitrogen) [Павлова и др., 2013].

Для получения кардиосфер клеточную культуру промывали PBS (Биолот), снимали раствором 0,25%-го трипсина в PBS (Биолот), трипсин инактивировали средой FD с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки FBS (Autogene Bioclear). Далее суспензию клеток помещали в пробирку и центрифугировали 5 мин при 300 g. Среду удаляли, клетки ресуспендировали в культуральной среде FD с добавлением 2% Knockout serum replacement (Invitrogen), 100 ед/мл пенициллина (Gibco), 100 ед/мл стрептомицина (Gibco), 2 ммоль/л L-глутамин (Invitrogen) и высаживали на культуральную посуду, обработанную поли-D-лизином (BD) при плотности клеток более 30000 кл/см² [Li et al., 2010].

2.1.2. Получение культур клеток из фрагментов предсердия крысы

Культуры клеток предсердия получали из крыс линии WAG/G, в возрасте 20 дней, полученных из вивария конвенциональных животных ИЦиГ СО РАН. Манипуляции с животными были одобрены биоэтической комиссией ИЦиГ СО РАН, протокол № 23.4 от 04.07.2014 г. Животных декапитировали, извлекали сердце, предсердия механически измельчали до фрагментов размера 1–2 мм³ и обрабатывали 0,2%-м раствором коллагеназы NB4 (Serva) в течение 60 мин при 37°C. Супернатант отбирали в отдельную пробирку, добавляли равный объем PBS (Биолот), центрифугировали 5 мин при 300 g, осадок аккуратно ресуспендировали в ростовой среде и помещали суспензию в культуральную посуду. Половину полученных клеток культивировали при 37°C и содержании CO₂ в атмосфере 5% в ростовой среде FD (50% - DMEM (Invitrogen), 50% - F12 (Invitrogen)) с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки (FBS (Autogene Bioclear)), 5% Knockout serum replacement (Invitrogen), 100 ед/мл пенициллина (Gibco), 100 ед/мл стрептомицина (Gibco), 2 ммоль/л L-глутамин (Invitrogen); другую половину клеток культивировали при 37°C и содержании CO₂ в атмосфере 5% в ростовой среде FD с добавлением 2% Knockout serum replacement, 100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина, 2 ммоль/л L-глутамин [Чепелева и др., 2015].

Для проведения иммунофлюоресцентного анализа, теста на поглощение ацетилированного липопротеина низкой плотности (AcLDL), связывания изолектина В4 (IB4) клетки суспензионной культуры переводили на ростовую среду, содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки FBS для прикрепления к поверхности культурального пластика или предметного стекла.

2.2. Выделение РНК

РНК выделяли с помощью TRI Reagent (Sigma) согласно инструкции производителя. Осадок клеток, собранных с 25 см² культуральной емкости, гомогенизировали в 1 мл TRI Reagent до полного лизиса. К лизату добавляли 200 мкл хлороформа, перемешивали и оставляли на 10 мин при комнатной температуре. Полученную смесь центрифугировали 15 мин при 12000 g и 4°C. Верхнюю фазу с РНК переносили в чистую пробирку. Добавляли 500 мкл изопропанола, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 10 мин. РНК осаждали центрифугированием 10 мин при 12000 g и 4°C. Супернатант отбирали, осадок РНК дважды промывали 75%-м раствором этилового спирта, затем сушили при комнатной температуре и растворяли в 45 мкл воды.

Для очистки образцов РНК от контаминации ДНК использовали набор реагентов TURBO DNA-free (Ambion). К полученному раствору РНК добавляли 0,1 объема 10×DNAaseI буфера, 2 ед DNAaseI и инкубировали 30 мин при 37°C. Затем к смеси добавляли 0,1 объема DNAase Inactivation Reagent, инкубировали 2 мин при комнатной температуре и центрифугировали 1 мин при 11500 g. Супернатант, содержащий РНК, переносили в свежую пробирку и хранили при -70°C. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific), при длине волны 260 нм.

В качестве контрольных образцов для сравнения экспрессии генов использовали образцы РНК, выделенные из тканей сердца крысы. Для выделения РНК не более 30 мг ткани помещали в гомогенизатор, добавляли 1 мл TRI Reagent и гомогенизировали до полного лизиса. Полученный раствор переносили в чистую пробирку, далее выделяли РНК по приведенному выше методу.

2.3. Сравнительный анализ уровня экспрессии генов методом ОТ-ПЦР

Для проведения одной реакции обратной транскрипции (20 мкл) смешивались: РНК – 2 мкг; Random hexamer primer (Invitrogen) – 50 пмоль; бидистиллированная вода – до 10 мкл. Полученную смесь инкубировали 5 мин при 70°C, затем переносили на лед. После чего добавляли смесь dNTP (Sigma) по 10 ммоль/л каждого – 4 мкл; 5×RT-буфер (Invitrogen) – 4 мкл; обратную транскриптазу M-MLV (Promega) – 1 мкл; ингибитор РНКазы RNAsine (Promega) – 1 мкл. Смесь инкубировали 60 мин при 42°C, затем 10 мин при 95°C, хранили при -20°C.

Для проведения одной полимеразной цепной реакции смешивали: смесь dNTP (Sigma) по 10 ммоль/л каждого – 1 мкл; 10×ПЦР буфер (100 ммоль/л KCl; 200 ммоль/л Трис-HCl, pH 8,8; 100 ммоль/л (NH₄)₂SO₄; 0,1% Triton X-100) – 5 мкл; раствор MgCl₂ (25 ммоль/л) – 6 мкл; кДНК – 2 мкл; Taq-полимеразу (5 ед/мкл) (Медиген) – 0,5 мкл; праймеры (10 ммоль/л) – по 1 мкл; бидистиллированная вода – до 50 мкл. Реакцию проводили на амплификаторе C1000 Touch (Bio-Rad). Программа: 95°C – 5 мин; 35 циклов: 95°C – 30 сек, 58°C – 30 сек, 72°C – 40 сек. Праймеры, использованные в реакции, синтезированы ООО «Биоссет» (Новосибирск) с очисткой методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Последовательности праймеров даны в Таблице 1.

Для электрофоретического разделения фрагментов ДНК использовали 2%-й агарозный гель, приготовленный на трис-ацетатном буфере (40 ммоль/л Трис-HCl, pH 8,0; 20 ммоль/л ацетат натрия; 1 ммоль/л ЭДТА), с добавлением бромистого этидия (0,01 мкг/мл). На гель наносили образцы, содержащие 0,3–0,5 мкг ДНК, с добавлением 0,1 объема буфера, содержащего 15% фиколла и 0,025% ксиленцианола. Электрофорез проводили при напряженности электрического поля 4 В/см. После электрофореза гель фотографировали с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad).

Таблица 1 – Праймеры для ОТ-ПЦР анализа

| Исследуемая последовательность ДНК | Структура праймеров |
|------------------------------------|--|
| <i>GAPDH</i> (человек, крыса) | F 5'-TGTTG-CCATC-AATGA-CCCCT-T-3' R 5'-CTCCA-CGACG-TACTC-AGCG-3' |
| <i>C-Kit</i> (человек) | F 5'- GCGTG-GGCGA-CGAGA-TTAGG-CTG -3' R 5'- CATGA-TGCCC-GCCTT-GGGGT-CAG -3' |
| <i>GATA4</i> (человек) | F 5'- GGAGA-TGCGT-CCCAT-CAAGA-C -3' R 5'- GGAGA-CGCAT-AGCCT-TGTGG -3' |
| <i>MEF2C</i> (человек) | F 5'- AGCAA-GAATA-CGATG-CCATC -3' R 5'- GAAGG-GGTGG-TGGTA-CGGTC -3' |
| <i>αSMA</i> (человек) | F 5- CACTG-CCTTG-GTGTG-TGACA-AT -3' R 5- CGTAG-CTGTC-TTTT-GTCCC-ATTC -3' |
| <i>CD105</i> (человек) | F 5- CTTGG-CCTAC-AATTC-CAGCC -3' R 5- CTTGA-GGTGT-GTCTG-GGAGC -3' |
| <i>CD90</i> (человек) | F 5- ATGAA-CCTGG-CCATC-AGCAT-CGC -3' R 5- TCACA-GGGAC-ATGAA-ATCCG-TGG -3' |
| <i>CD31</i> (человек) | F 5- GAAGT-TGGCT-GGAGG-TGCTC -3' R 5- GCTGT-TGGTG-GAAGG-AGTGC -3' |
| <i>VE-cadherin</i> (человек) | F 5- GCCAA-CATCA-CAGTC-AAG -3' R 5- GCCAT-ATCCT-CGCAG-AAG -3' |
| <i>IGF2</i> (человек) | F 5- GACAC-CCTCC-AGTTC-GTCTG-TG -3' R 5- ACACG-TCCCT-CTCGG-ACTTG -3' |
| <i>IGF1R</i> (человек) | F 5- CCAGA-GAACA-TGGAG-AGCGT-C -3' R 5- TGTGG-GCGTA-AGGCT-GTCTC -3' |
| <i>IGF2R</i> (человек) | F 5- TGCTG-GCCCT-GTTGC-TCTAC -3' R 5- AGGAG-GCAGC-TGGAT-CTCTT-C -3' |
| <i>HGF</i> (человек) | F 5- TCACG-AGCAT-GACAT-GACTC-C -3' R 5- AGCTT-ACTTG-CATCT-GGTTC-C -3' |

продолжение таблицы 1

| Исследуемая последовательность ДНК | Структура праймеров |
|--|--|
| <i>HGFR (человек)</i> | F 5'- CCCCCG-AGCGC-TTTGT-GAGCA -3' R 5'- AAGTC-AGCGG-CGCAA-GGACC -3' |
| <i>PDGFb (человек)</i> | F 5'-GATCCGCTCCTTTGATGATC-3' R 5'-GTCTCACACTTGCATGCCAG-3' |
| <i>PDGFRb (человек)</i> | F 5'-CAGTAAGGAGGACTTCCTGGAG-3' R 5'-CCTGAGAGATCTGTGGTTCCAG-3' |
| <i>Ang1 (человек)</i> | F 5'-GCCTACACTTTCATTCTTCCAGA-3' R 5'-TCTTCCTTGTGTTTTTCCTTCCAT-3' |
| <i>Ang2 (человек)</i> | F 5'-GGCAG-CGTTG-ATTTT-CAGAG-GACT-3' R 5'-TTTAA-TGCCG-TTGAA-CTTAT-TTGT-3' |
| <i>Tie2 (человек)</i> | F 5'-GGAAGCATGGACTCTTTAGC-3' R 5'-CACAGAAATAAGCACCATTTGA-3' |
| <i>TGFb1 (человек)</i> | F 5'-TGGTGGAAACCCACAACGAA-3' R 5'-AGAAGTTGGCATGGTAGCCC-3' |
| <i>TGFb1R(человек)</i> | F 5'- TTGCTGGACCAGTGTGCTTC-3' R 5'-TGACACCAACCAGAGCTGAG-3' |
| <i>VEGF (человек)</i> | F 5'-ATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGT-3' R 5'-TGGCCTTGGTGAGGTTTGATCC-3' |
| <i>VEGFR2 (человек)</i> | F 5'-GACCATGCCAGCATAGCTG-3' R 5'-TGGAGGTGACTGAGTGCAG-3' |
| <i>Nestin (человек)</i> | F 5'-AGAGGGGAATTCCTGGAG-3' R 5'-CTGAGGACCAGGACTCTCTA-3' |
| <i>NG2 (человек)</i> | F 5'-ACACTGACAGACAGTTTTGTCCT-3' R 5'-ATGGTGTAGACCAGATCCTCAGA-3' |

продолжение таблицы 1

| Исследуемая последовательность ДНК | Структура праймеров |
|--|--|
| <i>C-Kit</i> (крыса) | F 5'- GGCCT-AGCCA-GAGAC-ATCA -3' R 5'- GAGAG-GCTGT-GTGGA-AGAGG -3' |
| <i>Sca-1</i> (крыса) | F 5'- CGGTC-ATTCA-GACCA-CACAC-AG -3' R 5'- TGGGT-TGAAG-TTCTC-GCTCT-TG -3' |
| <i>αSMA</i> (крыса) | F 5- GAAGG-AATAG-CCACG-CTCAG -3' R 5- TCAAT-GTCCC-AGCCA-TGTA -3' |
| <i>VEGFR2</i> (крыса) | F 5'- TCAAT-GTGGT-GAACC-TGCTG-G -3' R 5'- TTCTC-TTGCC-CCGTA-AGTAA-GTTG -3' |
| <i>NG2</i> (крыса) | F 5'- CTCGCCACCTCCAAGAACAC -3' R 5'- GCCCAGCCTCCTGCCATT -3' |
| <i>PDGFRβ</i> (крыса) | F 5'- CAGGG-CGAGA-GCATC-ACCAT-CA -3' R 5'- CAGCA-GCCGC-ACATA-GCCAT-TTT -3' |
| <i>Nestin</i> (крыса) | F 5'- GTGCG-TGACT-ACCAG-GAGCG-CGTG-3' R 5'-CATCT-TGAGG-TGTGC-CAGTT-GCTGC-3' |

2.4. Оценка экспрессии генов методом количественной ПЦР в режиме реального времени

Количественная ПЦР в режиме реального времени (qRT-PCR) проводили на приборе LightCycler 480-II (Roche), в 96-ти луночном планшете LightCycler 480 Multiwell Plate 96 (Roche). Каждая реакция (общим объемом 20 мкл) содержала 10 мкл смеси БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2 \times) (Биолабмикс), по 400 нМ прямого и обратного праймеров и 2 мкл реакционной смеси ОТ, содержащей кДНК. Использовали стандартную программу: 95 $^{\circ}$ C, 5 мин; 95 $^{\circ}$ C, 15 сек; T $^{\circ}$ C отжига праймеров, 1 мин, шаг 2 (40 циклов); 95 $^{\circ}$ C, 30 сек, 65 $^{\circ}$ C, 1 мин; 97 $^{\circ}$ C; 40 $^{\circ}$ C, 10 сек. В качестве референсных генов использовали АСТВ,

TERC и B2M. Каждая реакция проводилась в трех повторностях. Для анализа полученных результатов qRT-PCR применяли $2^{-\Delta\Delta CT}$ метод [Livak and Schmittgen, 2001]. Для анализа данных экспрессии референсных генов использовали программу geNorm [Vandesompele et al., 2002]. Праймеры, использованные в реакции, синтезированы ООО «Биоссет» (Новосибирск) с очисткой методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Последовательности праймеров даны в Таблице 2.

Таблица 2 – Праймеры для ПЦР в режиме реального времени

| Исследуемая последовательность ДНК | Структура праймеров |
|------------------------------------|--|
| <i>Ang1</i> (человек) | F 5'-ATGGGGGAGGTTGGACTGTA-3' R 5'-TGCCTCTGACTGGTAATGGC-3' |
| <i>CXCR4</i> (человек) | F 5'-TGGCCTTATCCTGCCTGGTATTGT-3' R 5'-AGGAGTCGATGCTGATCCCAATGT-3' |
| <i>FGF2</i> (человек) | F 5'-AGCGACCCTCACATCAAGCTACAA-3' R 5'-TAGCCAGGTAACGGTTAGCACACA-3' |
| <i>SDF1</i> (человек) | F 5'-TAGTCAAGTGCGTCCACGA-3' R 5'-GGACACACCACAGCACAAAC-3' |
| <i>VEGFR2</i> (человек) | F 5'-CGGTCAACAAAGTCGGGAGA-3' R 5'-CAGTGCACCACAAAGACACG-3' |
| <i>VEGF</i> (человек) | F 5'-TTTCTGCTGTCTTGGGTGCATTGG-3' R 5'-ACCACTTCGTGATGATTCTGCCCT-3' |
| <i>ACTB</i> (человек) | F 5'-GTGCGTGACATTAAGGAGAAG-3' R 5'-GAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3' |
| <i>TERC</i> (человек) | F 5'-GTCGCTGGTCAGTTCGTGATT-3' R 5'-AGCAGTTGGCTGTTGTACCTCTC-3' |
| <i>B2M</i> (человек) | F 5'-CACCCCCACTGAAAAAGATG-3' R 5'- ATATTAAAAAGCAAGCAAGCAGAA-3' |

2.5. Выявление активности щелочной фосфатазы

Для выявления в клетках активности эндогенной щелочной фосфатазы удаляли ростовую среду из лунки с клеточной культурой, промывали PBS и фиксировали клетки при помощи высушивания на воздухе 15–20 мин или в 3,7%–4%-м растворе формальдегида в PBS в течение 20 мин при 4°C. В случае обработки формальдегидом, клетки промывали 2–3 раза в PBS. Далее инкубировали зафиксированные клетки в растворе 100 mM Tris-HCl pH 9,0; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 0,4 мкг/мл Naphtol phosphate (Sigma); 1 мкг/мл Fast Violet B Salt (Sigma). Время инкубации составляло 30 мин в темноте при комнатной температуре. Затем промывали клетки PBS и анализировали с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 40C (Zeiss).

2.6. Иммунофлюоресцентное окрашивание

Препараты на стеклах фиксировали в 4%-м растворе формальдегида в PBS 10 мин, отмывали в PBS 2 раза по 10 мин, пермеабелизовали в течение 40 мин в 0,5%-м растворе Triton X-100 (Bio-Rad) в PBS и отмывали в PBS 2 раза по 10 мин. Далее препараты инкубировали при комнатной температуре 1 ч с блокирующим буфером (10 мг/мл раствор бычьего сывороточного альбумина (Sigma) в PBS), 2 ч при комнатной температуре с первичными антителами и 40 мин при комнатной температуре со вторичными антителами. Используемые первичные и вторичные антитела приведены в Таблице 3. От несвязавшихся антител препараты отмывали 3 раза по 10 мин в PBS. Для общего окрашивания ядер препаратов использовался DAPI в Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories). Анализ препаратов проводили на флюоресцентном микроскопе Eclipse Ti-E (Nikon) с помощью программного обеспечения фирмы Imstar, конфокальном микроскопе LSM 780 NLO (Zeiss) и инвертированном микроскопе THUNDER Imager Live Cell & 3D Cell Culture & 3D Assay (Leica)

на базе ЦКП «Центр микроскопического анализа биологических объектов СО РАН».

Таблица 3 – Первичные и вторичные антитела, использованные при иммунофлюоресцентном окрашивании

| Антитела | Тип | Источник | Каталожный номер | Рабочее разведение |
|--------------------|----------------------------|-------------|------------------|--------------------|
| Первичные антитела | | | | |
| Anti-CD29 | Мышиные моноклональные | eBioscience | 14-0299-37 | 1:100 |
| Anti-CD44 | Крысиные моноклональные | eBioscience | 14-0441-82 | 1:100 |
| Anti-CD105 | Мышиные моноклональные | Abcam | ab114052 | 1:100 |
| Anti-CD90 | Мышиные моноклональные | eBioscience | 14-0909-82 | 1:100 |
| Anti-CD31 | Кроличьи моноклональные | Abcam | ab76533 | 1:100 |
| Anti-CD31 | Мышиные моноклональные | Abcam | ab64543 | 1:100 |
| Anti-aSMA | Мышиные моноклональные | DAKO | M0851 | 1:100 |
| Anti-VEGFR2 | Кроличьи поликлональные | Abcam | ab2349 | 1:100 |

продолжение таблицы 3

| Антитела | Тип | Источник | Каталожный номер | Рабочее разведение |
|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------|--------------------|
| Anti-Nestin | Мышиные моноклональные | Abcam | ab254048 | 1:100 |
| Anti-Collagen I | Кроличьи поликлональные | Abcam | ab34710 | 1:100 |
| Anti-Fibronectin | Мышиные моноклональные | Abcam | ab6328 | 1:100 |
| Anti-von Willebrand factor | Кроличьи поликлональные | Abcam | ab6994 | 1:100 |
| Anti-c-Kit | Кроличьи поликлональные | Santa Cruz Biotechnology | sc-168 | 1:100 |
| Anti-TnT | Мышиные моноклональные | Abcam | ab8295 | 1:100 |
| Anti-Nkx2.5 | Кроличьи поликлональные | Santa Cruz Biotechnology | sc-14033 | 1:100 |
| Anti-MLC2 | Кроличьи поликлональные | Abcam | ab79935 | 1:100 |
| Anti-HCN4 | Крысиные моноклональные | Abcam | ab32675 | 1:100 |
| Anti-SIRPa | Мышиные моноклональные | Biolegend | 323806 | 1:100 |
| Anti-HNA | Мышиные моноклональные | Abcam | ab191181 | 1:100 |

продолжение таблицы 3

| Антитела | Тип | Источник | Каталожный номер | Рабочее разведение |
|---|----------------------------|---------------------------------|------------------|--------------------|
| Anti-GATA4 | Мышиные моноклональные | Santa Cruz Biotechnology | sc-25310 | 1:100 |
| Anti-aSA | Мышиные моноклональные | Abcam | ab9465 | 1:100 |
| Anti-Sca-1 | Кроличьи поликлональные | Sigma-Aldrich | AB4336 | 1:100 |
| Вторичные антитела | | | | |
| Alexa Fluor 568 anti-mouse IgG ₁ | Козьи поликлональные | Molecular Probe (Invitrogen) | A21124 | 1:400 |
| Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG ₁ | Козьи поликлональные | Molecular Probe (Invitrogen) | A21121 | 1:400 |
| Alexa Fluor 568 anti-mouse IgG2a | Козьи поликлональные | Molecular Probe (Invitrogen) | A21134 | 1:400 |
| Alexa Fluor 568 anti-rabbit IgG (H+L) | Козьи поликлональные | Molecular Probe (Invitrogen) | A11011 | 1:400 |
| Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (H+L) | Козьи поликлональные | Molecular Probe (Invitrogen) | A11008 | 1:400 |
| Alexa Fluor 568 anti-rat IgG (H+L) | Козьи поликлональные | Molecular Probe (Invitrogen) | A11077 | 1:400 |
| Alexa Fluor 488 anti-rat IgG (H+L) | Козьи поликлональные | Molecular Probe (Invitrogen) | A48262 | 1:400 |

2.7. Тест на способность клеточных культур к поглощению ацетилированного липопротеина низкой плотности

Клетки в течение 48 ч культивировались при 37°C и содержании CO₂ в атмосфере 5% в ростовой среде FD (50% - DMEM (Invitrogen), 50% - F12 (Invitrogen)) с добавлением 10% Knockout serum replacement (Invitrogen), 100 ед/мл пенициллина (Gibco), 100 ед/мл стрептомицина (Gibco), 2 ммоль/л L-глутамин (Invitrogen). Затем монослой клеток промывали PBS, наливали свежую ростовую среду с добавлением ацетилированного липопротеина низкой плотности с зеленой флюоресцентной меткой в концентрации 10–15 мг/мкл (AcLDL, Invitrogen) и инкубировали в течение 5–7 ч при 37°C и содержании CO₂ в атмосфере 5%. Детекцию свечения клеток проводили на флюоресцентном микроскопе Eclipse Ti-E (Nikon) с помощью программного обеспечения фирмы Imstar.

2.8. Тест на способность клеточных культур к связыванию изолектина В4

Препараты на стеклах фиксировали в 4%-м растворе формальдегида в PBS 10 мин, отмывали в PBS 2 раза по 10 мин, пермеабелизовали в течение 40 мин в 0,5%-м растворе Triton X-100 (Bio-Rad) в PBS и отмывали в PBS 2 раза по 10 мин. Далее препараты инкубировали с 0,1мМ CaCl₂ в PBS в течение 30 мин при комнатной температуре, затем инкубировали с блокирующим буфером 10 мин при комнатной температуре, ополаскивали 0,1мМ CaCl₂ в PBS, инкубировали с изолектином В4 (Isolectin GS-IB4 From Griffonia simplicifolia, Alexa Fluor® 594 Conjugate, Sigma), растворенным в концентрации 1:75 в 0,1мМ CaCl₂ в PBS при 4°C в течение ночи, затем отмывали в PBS 2 раза по 15 мин. Анализ препаратов проводили на флюоресцентном микроскопе Eclipse Ti-E (Nikon) с помощью программного обеспечения фирмы Imstar.

2.9. Оценка ангиогенного потенциала *in vitro*

Исследование ангиогенной активности культур клеток проводили с помощью стандартного теста в тонком слое матригеля с пониженным содержанием ростовых факторов (MatrigelTM, BD Biosciences) [Staton et al., 2009]. В лунку охлажденного культурального планшета заливали матригель из расчета 100 мкл/см², гель полимеризовался в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем в лунки высевали клетки с плотностью 10⁴ клеток/см². Равномерно распределяли клеточную суспензию по поверхности матригеля и оставляли при 37°C и содержании CO₂ в атмосфере 5%. В качестве положительного контроля были использованы клетки HUVEC (клетки эндотелия пупочной вены человека), в качестве отрицательного контроля МСК костного мозга человека. Формирование капилляроподобных структур наблюдали через 6 и 18 ч с помощью микроскопа Eclipse Ti-E (Nikon). Оценка длины капилляроподобных структур проводилась в программе AngioTool [Zudaire et al., 2011].

2.10. Проточная цитофлуориметрия

Для анализа клеток на проточном цитометре культуры клеток диссоциировали диспазой (1 мг/мл, Stemcell Technologies), инкубировали с антителами к CD73-PE (Becton Dickinson), CD10-APC, CD13-PC7, CD14-PC7, CD29-FITC, CD34-APC, CD44-FITC, CD45-PB, CD90-FITC, CD90-APC, CD105-PE, CD166-PE (Beckman Coulter), CD117-APC (Miltenyi Biotec), SIRPa-PE (Biolegend) и соответствующими изотипическими контролями согласно рекомендациям производителей антител. Анализ проводили на приборе FACS Canto II (BD Biosciences) в программе FACS Diva (FACS-анализ).

2.11. Получение GFP-позитивных культур клеток крысы

Для маркирования клеточной культуры, полученной из предсердия крысы, конститутивной экспрессией зеленого флюоресцентного белка (GFP) использовали лентивирусную плазмиду pGrip, несущую ген GFP под контролем промотора CMV. Плазмида была любезно предоставлена д.б.н. М.А. Лагарьковой (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России).

Для получения вирусных частиц клетки 293FT высевали по 10^6 в покрытые желатином (Sigma) культуральные флаконы площадью 25 cm^2 в среду Advanced DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS (Autogene Bioclear)), 1 mM GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific). На следующий день клетки 293FT трансфицировали плазмидами при плотности 75–85%. Для трансфекции использовали Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Сначала отбирали среду и заливали по 4 мл Advanced DMEM/F-12 на один культуральный флакон. Затем в одной пробирке смешивали 0,5 мл Advanced DMEM/F-12 и 10 мкг плазмид, в другой пробирке 0,5 мл Advanced DMEM/F-12 и 25 мкл Lipofectamine 2000 с плазмидами в следующем соотношении по массе: pGrip: psPAX2: pMD2.G = 25: 16: 9, или 5 мкг, 3,2 мкг и 1,8 мкг, соответственно.

Через 5 мин объединяли содержимое пробирок с плазмидами и Lipofectamine 2000. Инкубировали смесь 20 мин при комнатной температуре, после чего добавляли в культуральные флаконы с клетками. Через 5 ч меняли среду на Advanced DMEM/F-12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 1 mM GlutaMAX, 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина по 5 мл на каждый флакон.

Спустя 48, 72, 96 ч после трансфекции собирали среду, содержащую вирусные частицы, добавляя по 5 мл свежей среды на флакон. Собранную среду хранили при 4°C . После последнего сбора среду фильтровали и центрифугировали (70000 g , 4°C , 120 мин). Супернатант удаляли, а осадок

ресуспендировали в 500 мкл среды Advanced DMEM/F-12, оставляли на ночь при 4°C для полного растворения и использовали для последующей трансдукции.

За сутки до трансдукции кардиальные стромальные клетки крысы высеивали по 5×10^4 на покрытые желатином лунки культуральных планшетов площадью 4 см² (плотность приблизительно 60%). За 1 ч до трансдукции меняли ростовую среду на свежую (1 мл) и добавляли в нее гексадиметрина бромид (Polybrene, Sigma H9269) до конечной концентрации 4 мкг/мл. Затем добавляли 100 мкл среды с вирусами. Через 16 ч после трансдукции меняли среду на свежую ростовую.

Флюоресценцию GFP в клетках, трансдуцированных лентивирусом рGrip, наблюдали через 48 ч после трансдукции.

2.12. Моделирование экспериментального инфаркта миокарда и интрамиокардиальная трансплантация клеточной культуры, полученной из предсердия крысы

В эксперименте использовали самцов крыс линии WAG/G в возрасте 4–5 месяцев и массой 250–300 г, полученных из вивария конвенциональных животных ИЦиГ СО РАН. Манипуляции с животными были одобрены биоэтической комиссией ИЦиГ СО РАН, протокол № 23.4 от 04.07.2014 г.

Животные, использованные в эксперименте, содержались в стандартных условиях вивария, воду и пищу получали без ограничения. Эксперименты с животными выполняли в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755 и приложение к приказу МЗ СССР № 565 от 04.10.1977) и принципами Хельсинкской декларации, разработанной Всемирной медицинской ассоциацией (2000).

Экспериментальных крыс наркотизировали препаратами Золетил-100 (30 мг/кг; Virbac Sante Animale) и Домитор (0,25 мг/кг; Orionpharma) интраперитонеально, за 15 мин до наркоза проводили премедикацию сульфатом атропина (0,1 мг/кг) подкожно. Животное фиксировали на операционном столе в положении на правом боку, кожу дезинфицировали этиловым спиртом. Крысу интубировали, вентиляцию легких проводили кислородом при помощи аппарата Rodent Ventilator (Ugo Basile). Доступ в грудную клетку осуществляли латерально между 4 и 5 ребром, разрезали поверхностные и глубокие мышцы и фасции, обнажали сердце и убирали перикард. Постоянную окклюзию левой нисходящей коронарной артерии проводили между пульмонарным конусом и левым предсердием на уровне ушка левого предсердия атравматичной иглой размером 6-0 и кривизной 3/8 круга [Rei et al., 2014]. На грудные мышцы и кожу накладывали швы лигатурой диаметра 5.0, после чего животное было способно дышать самостоятельно. Перед операцией и через 15 мин после нее регистрировали электрокардиограммы с помощью прибора Cardiovit AT-102 (Schiller). После перевязки коронарной артерии наблюдали побледнение передней стенки сердца (ниже места окклюзии) и поднятие зубца ST на кардиограмме, свидетельствующее об ишемическом поражении миокарда. Через 7 дней после моделирования инфаркта крысам проводили повторное электрокардиографическое исследование.

Через 6 недель после операции животные случайным образом делились на опытную (6 шт) и контрольную (5 шт) группы. Крысам открывали грудную клетку (описанным выше методом), животным из опытной группы делали инъекции GFP-позитивных клеток (10^6 клеток), растворенных в 100 мкл PBS, животным из контрольной группы делали инъекции 100 мкл PBS. Инъекции производились интрамиокардиально в зоне ишемической полутени инсулиновым шприцем BD Microfine со встроенной иглой 30G.

2.13. Эхо-КГ исследование функционального состояния сердца

Эхо-КГ исследования сердца крыс проводились в КДЦ «Евровет», г. Новосибирск за три дня до моделирования инфаркта миокарда и через 6 и 12 недель после. Крысы находились под изофлюрановым наркозом. Для проведения Эхо-КГ использовали ультразвуковой сканер SonoAce X8 (Samsung Medison) и линейный датчик LN5-12 с частотой 12 МГц, полученные данные обрабатывали в модальном режиме по методу Тейхольца и методу Симпсона.

2.14. Прижизненная визуализация введенных клеток

Экспериментальным крысам проводили операцию по моделированию инфаркта миокарда и интрамиокардиальные инъекции кардиальных стромальных клеток крысы (по методу, описанному выше). Для визуализации клеток использовали прижизненный митохондриальный краситель MitoTracker® Red FM (Invitrogen). Крыс выводили из эксперимента через 24 и 48 ч с помощью эвтаназии в CO₂-камере, в качестве контроля использовали крыс, которым вводили равный объем PBS. Визуализацию трансплантированных клеток проводили на приборе In-vivo Multispectral Imaging System FX (Kodak).

2.15. Кривофиксация и гистологическое окрашивание

Через 6 недель после трансплантации клеток животных выводили из эксперимента с помощью инъекции 1 мл 7,5%-го раствора KCl в сердце (для остановки сердца в диастоле), во время инъекции животные находились под изофлюрановым наркозом. Извлекали сердце, разрезали поперечно на 4 сегмента, 2 средних сегмента замораживали в среде Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek). Срезы производили толщиной 10 мкм с использованием криостата

Microm HM-550 (Thermo Fisher Scientific) и прикрепляли к стеклам SuperFrost Plus (Menzel-Gläser). Полученные срезы использовали для иммунофлюоресцентного анализа (по описанной выше методике), а также окрашивали гематоксилин-эозином и пикро-Маллори по общепринятым методикам.

Кардиосферы фиксировали в течение ночи в 4%-м растворе формальдегида в PBS при 4°C, промывали PBS три раза по 20 мин, далее инкубировали 60 мин в 20%-ом растворе сахарозы в воде и ночь в 30%-ом растворе сахарозы в воде при +4°C. Изготовление криосрезов проводили по описанной выше методике.

2.16. Морфометрический анализ

Относительная площадь зоны хронического кардиосклероза (отношение площади пораженной ткани к общей площади левого желудочка), относительный периметр зоны хронического кардиосклероза, толщина стенки и просвет левого желудочка были определены на фотографиях криосрезов сегментов сердца, окрашенных по методу пикро-Маллори, с помощью программы ImageJ. Для анализа проводили не менее 8 измерений в серии с 1 сегмента. Для подсчета плотности сосудов микроциркуляторного русла, позитивно окрашенных на изолектин В4, на фотографиях криосрезов сегментов сердца использовали количественный способ оценки в абсолютных цифрах на площади 0,55 мм² при увеличении x100 (оценивали не менее трех полей зрения).

2.17. Модификация клеточной культуры, полученной из предсердия крысы, экзогенной экспрессией люциферазы

Для маркирования клеточной культуры, полученной из предсердия крысы, конститутивной экспрессией люциферазы использовали

лентивирусную плазмиду pLenti PGK V5-Luc Neo (Addgen #21471) и последующую селекцию клеток с помощью генетицина (G418, Sigma). Нарботку вирусных частиц и трансдукцию проводили методом, указанным в п. 2.11.

2.18. Получение фибринового геля из крови крыс

Цельную кровь крыс линии WAG/G центрифугировали при 400 g в течение 10 мин в присутствии 0,2% цитрата натрия и отбирали плазму, содержащую фибриноген и тромбоциты, делили на аликвоты и замораживали при -70°C . Полимеризация фибринового геля активировалась добавлением ионов Ca^{2+} в составе среды DMEM (Invitrogen) в течение 2–4 мин. Подобранный время позволяет проводить инъекции суспензии клеток так, чтобы фибриновый гель формировался непосредственно в миокарде и служил матриксом для трансплантированных клеток [Cheng et al., 2012; Милевская и др., 2015].

2.19. Определение активности люциферазы в белковых экстрактах

Люминесценция регистрировалась на приборе Wallac 1420 Multilabel Counter Victor-3 (Perkin-Elmer) с использованием набора Luciferase Assay Reporter System (Promega). Получение клеточного лизата и детекцию активности люциферазы проводили согласно рекомендациям Promega с небольшими модификациями. После добавления лизирующего буфера (25 mM Трис pH 7,8; 2 mM ЭДТА; 2 mM ДТТ; 10% глицерола; 1% Тритон X-100) клетки разрушали методом замораживания в жидком азоте и размораживания на водяной бане при температуре 37°C . Образцы миокарда измельчали в небольшом количестве азота и лизировали в равном объеме двукратного лизирующего буфера с добавлением ингибиторов протеаз Complete Mini, EDTA Free (Roche) в течение 15 мин, замораживали,

размораживали, центрифугировали при 10000 g 5 мин и собирали супернатант. К осадку добавляли 0,5 мл однократного лизирующего буфера, процедуру лизиса клеток повторяли. Второй супернатант смешивали с первым и хранили при температуре -70°C до определения активности люциферазы [Manthorpe et al., 1993; Павлова и др., 2017].

2.20. Трансплантация модифицированной экзогенной экспрессией люциферазы клеточной культуры, полученной из предсердия крысы, в миокард крыс линии WAG

Эксперимент выполняли на 5–6-месячных самцах крыс линии WAG/G массой 250–300 г, полученных из вивария конвенциональных животных ИЦиГ СО РАН. Манипуляции с животными были одобрены биоэтической комиссией ИЦиГ СО РАН, протокол № 23.4 от 04.07.2014 г.

Животные, использованные в эксперименте, содержались в стандартных условиях вивария, воду и пищу получали без ограничения. Эксперименты с животными выполняли в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755 и приложение к приказу МЗ СССР № 565 от 04.10.1977) и принципами Хельсинкской декларации, разработанной Всемирной медицинской ассоциацией (2000).

Крыс наркотизировали, интубировали, доступ к сердцу и моделирование инфаркта миокарда осуществляли по описанной выше методике (п. 2.12). Инфаркт подтверждали по показателям электрокардиограммы (поднятие зубца ST) и бледности миокарда ниже места окклюзии. Через 30 мин после моделирования ИМ вводили клетки инсулиновым шприцем BD Microfine со встроенной иглой 30G в периинфарктную зону.

Одной группе животных клетки инъецировали в количестве 10^6 в 100 мкл среды DMEM, второй группе животных - 10^6 клеток в 100 мкл смеси

DMEM/фибриновый гель в соотношении 1:1, в каждой группе во всех временных точках число животных равнялось 3. Интенсивность люминесценции оценивали в 7 временных точках: 1 ч, 48 ч, 72 ч, 5 дней, 8 дней, 10 дней и 14 дней после инъекции.

Для детекции трансплантированных клеток в составе миокарда использовали реактив MitoTracker® Red FM (Invitrogen), согласно рекомендациям производителя. Визуализацию меченых клеток в составе ткани сердца проводили при помощи прибора In-vivo Multispectral Imaging System FX (Kodak) сразу после эвтаназии. Крыс выводили из эксперимента инъекцией 1 мл 7,5%-го раствора KCl в сердце. На приборе In-vivo Multispectral Imaging System FX выделяли зону миокарда с введенными клетками. Образцы ткани замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C до момента проведения последующего анализа. Для каждого опыта отбирали и хранили при температуре -70°C контрольную аликвоту для определения и расчета люминесценции клеток.

Для каждого опыта рассчитывали значение люминесценции одной клетки в контроле и по значению люминесценции опытного образца определяли абсолютное количество клеток, которое нормировали на количество трансплантированных клеток.

2.21. Направленная дифференцировка ИПСК в кардиомиоциты

ИПСК человека линии iMA1L, полученной в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН, культивировали на матригеле с пониженным содержанием ростовых факторов (Matrigel GFR, $9\text{мкг}/\text{см}^2$; Corning) в среде Essential 8™ (Thermo Fisher Scientific). При плотности ИПСК 95% на 3–4-й день культивирования клетки пассировали 1:12 с помощью 0,5мМ ЭДТА (Thermo Fisher Scientific) с добавлением 10 мкМ Y-27632 (StemRD) или запускали в кардиальную дифференцировку. Протокол дифференцировки основан на активации сигнального пути Wnt и индукции

мезодермальных предшественников с помощью комбинации ростовых факторов ActivinA (Peprotech) 2–5 мкг/мл и BMP4 (Peprotech) 2,5–10 мкг/мл, либо 6мкМ CHIR99021 (StemRD) в среде RPMI 1640 (Lonza) с B27 supplement без инсулина (Thermo Fisher Scientific) в течение 48 ч, и терминальной дифференцировкой в кардиомиоциты с помощью ингибитора IWP2 (Sigma-Aldrich) в концентрации 5мкМ на 4–5-й день [Lian et al., 2013; BurrIDGE et al., 2014]. Начиная с 10-го дня дифференцировки проводили метаболическую селекцию кардиомиоцитов с использованием RPMI 1640 без D-глюкозы (Thermo Fisher Scientific) дополненной 213 мкг/мл L-аскорбиновой кислоты 2-фосфат (Sigma-Aldrich), 500 мкг/мл рекомбинантного альбумина человека, экспрессированного в *Oryza sativa* (Sigma-Aldrich) и 5 мМ DL-лактата натрия (L4263, Sigma-Aldrich). На 14–20-й день клетки рассаживали с помощью TrypLE™ Express (Thermo Fisher Scientific) в среду RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) с добавкой B27 и 20%-м содержанием фетальной бычьей сыворотки (Autogene Bioclear) в присутствии 10 мкМ Y-27632 (StemRD) на обработанные Matrigel GFR поверхности. Через 2 дня меняли среду на RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) с добавкой B27 и продолжали культивировать кардиомиоциты до 1 года. Для формирования клеточных пластов кардиомиоциты рассаживали в плотности 250000 клеток на 1 см² на термочувствительный пластик Nunc UpCell (Thermo Fisher Scientific). При понижении температуры до 20°C клеточные пласты кардиомиоцитов откреплялись от пластика и использовались для трансплантации.

2.22. Визуализация потоков кальция в кардиомиоцитах

В среду к культивируемым кардиомиоцитам, матригельным трансплантатам кардиомиоцитов, сформированным клеточным пластам кардиомиоцитов добавляли кальций-зависимый флюоресцентный краситель Fluo8 (Abscam) до концентрации 4мкМ на 30–40 мин при

температуре 37°C. От несвязавшегося красителя отмывали раствором Tyrode, pH7,4 (Sigma-Aldrich) и документировали осцилляцию потоков кальция в клетках с помощью флюоресцентного микроскопа Eclipse Ti-E (Nikon) с камерой DS Qi1Mc и программным пакетом NIS (Nikon). Видео с фиксированными параметрами видеонаблюдения (130 кадров в секунду) обрабатывали с помощью программы ImageJ и строили графики интенсивности сигнала от времени.

2.23. Электрофизиологическая характеристика кардиомиоцитов

Регистрация потенциала действия проводилась после метаболической селекции кардиомиоцитов на отдельных спонтанно сокращающихся клетках методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в модификации whole cell и режиме фиксации тока на аппаратном комплексе, в который входят усилитель Multiclamp 700B (Molecular Devices) и система сбора данных Digidata 1550 (Axon Instruments) под контролем программного пакета pCLAMP 10 (Molecular Devices). Оцифровка сигнала проводилась с частотой 10 кГц. После установления контакта при отсутствии стимула на клетку подавался поддерживающий потенциал в -70 мВ. Стекланные электроды вытягивались из боросиликатных заготовок (Sutter Instrument) и обладали сопротивлением в 4–6 МОм. Электроды заполнялись раствором, содержащим 10 мМ NaCl, 145 мМ C₆H₁₁KO₇, 10 мМ HEPES, 1 мМ MgCl₂*6H₂O и нейтрализованным добавлением КОН до значений pH 7,2–7,4. Клетки постоянно омывались раствором температурой 32°C, аэрируемым газовой смесью из 95% O₂ и 5% CO₂, содержащим 140 мМ NaCl, 2,8 мМ KCl, 10 мМ HEPES, 1 мМ MgCl₂*6H₂O, 2 мМ CaCl₂*2H₂O и нейтрализованным добавлением NaOH до значений pH 7,2–7,4.

2.24. Трансплантация кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека, в организм мышей линии SCID

Эксперименты на лабораторных животных проводили в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755 и приложение к приказу МЗ СССР № 565 от 04.10.1977) и принципами Хельсинкской декларации, разработанной Всемирной медицинской ассоциацией (2000). Исследования проводились на базе ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН, разрешение этической комиссии № 22.4 от 30.05.2014 г.

Эксперименты по трансплантации кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека (10–30-й пассаж) проводились на самцах иммунодефицитных мышей линии SCID возрастом 6–8 недель и весом 26–30 г, наркотизированных препаратами Золетил-100 (30 мг/кг; Virbac Sante Animale) и Домитор (0,25 мг/кг; Orionpharma) интраперитонеально.

Интрамиокардиальная трансплантация

Доступ к сердцу проводили без интубации методом ручного выведения сердца из грудной полости через минимальный разрез [Gao et al., 2010]. Трансплантацию кардиомиоцитов человека (3×10^5 в 20 мкл в смеси RPMI/МатригельGFR 1:1) в миокард проводили инсулиновым шприцем BD Microfine со встроенной иглой 30G. Контрольным животным инъецировали смесь RPMI/МатригельGFR 1:1 без клеток. Количество животных в эксперименте равнялось 10 (по 5 в опытной и контрольной группах). Животных выводили из эксперимента через 5 недель после операции с помощью эвтаназии в CO₂-камере. Перед эвтаназией животным проводилось ЭКГ исследование на приборе Cardiovit AT-102 (Schiller). Далее извлекали сердце, криофиксацию, иммуофлюоресцентное и стандартное гистологическое окрашивание миокарда проводили по описанным выше методикам.

Подкожная трансплантация

Для формирования подкожного матригельного трансплантата мышам вводили 2×10^6 кардиомиоцитов в 200 мкл смеси RPMI/Матригель GFR 1:1. Количество животных в эксперименте равнялось 15 (по 3 в каждой временной точке). Через 2, 7, 14, 21 и 28 дней после операции животных выводили из эксперимента с помощью эвтаназии в CO₂-камере. Далее извлекали матригельный трансплантат и делили его на 2 части, половину использовали для приготовления гистологических препаратов и иммунофлюоресцентного анализа, другую половину для проведения оптического картирования потоков ионов кальция в клетках по описанным выше методикам. Для контроля использовали кардиомиоциты, которые культивировали в слое матригеля при 37°C и содержании CO₂ в атмосфере 5% весь срок эксперимента.

Почечная субкапсулярная трансплантация

Трансплантация сформированных клеточных пластов кардиомиоцитов осуществлялась под фиброзную капсулу почки мышей. Доступ к почке осуществляли методом ручного выведения из брюшной полости. Обрезанным наконечником на 200 мкл (Axigen) нарушали целостность фиброзной капсулы и вводили пласт кардиомиоцитов с помощью автоматической пипетки. Количество животных в эксперименте равнялось 30 (по 5 в каждой временной точке). Через 2, 7, 14, 21, 28 и 42 дня после операции животных выводили из эксперимента с помощью эвтаназии в CO₂-камере. Далее из-под капсулы почки извлекали клеточный пласт кардиомиоцитов и делили его на 2 части, половину использовали для приготовления гистологических препаратов и иммунофлюоресцентного анализа, другую половину для проведения оптического картирования потоков ионов кальция в клетках по описанным выше методикам. Для контроля использовали сформированные клеточные пласты кардиомиоцитов, которые культивировали в слое матригеля при 37°C и содержании CO₂ в атмосфере 5% весь срок эксперимента.

2.25. Просвечивающая электронная микроскопия

Для электронно-микроскопического исследования фрагменты клеточных пластов кардиомиоцитов фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, с последующей дополнительной фиксацией в течение 1 ч в 1%-м растворе OsO₄ на PBS (pH 7,4). После этого исследуемый материал дегидратировали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации, начиная с 30%-го до 100%-го раствора, заливали эпоксидной смолой Epon (Serva). Из блоков готовили полутонкие срезы толщиной около 1 мкм на ультратоме UC7/FC7 (Leica), окрашивали толуидиновым синим. Затем проводили выборку определенных участков препарата для ультраструктурного исследования под световым микроскопом DME (Leica). Далее полученные ультратонкие срезы толщиной 70–100 нм контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца [Савченко и др., 2021]. Ультратонкие срезы изучали при помощи электронного микроскопа Libra 120 (Zeiss), документировали при помощи цифровой камеры и программного обеспечения iTEM 5.2 (Jeol) на базе ЦКП «Центр микроскопического анализа биологических объектов СО РАН».

2.26. Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc). Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для выявления различий между группами использовали t-критерий Стьюдента. Отличия между группами считали достоверными при $P < 0,05$. Результаты на графиках и в таблицах представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение среднего.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основными методами реваскуляризации миокарда при ИБС являются аортокоронарное шунтирование и ангиопластика со стентированием коронарных артерий. Однако в некоторых случаях использование этих техник невозможно вследствие отсутствия пластического материала, а также диффузного и/или терминального поражения миокарда и кровеносного русла. В связи с этим активно изучается возможность применения альтернативных технологий восстановления функции миокарда, в том числе методами клеточных технологий с использованием стволовых или прогениторных клеток различного происхождения [Michler, 2018]. Кардиальные стромальные клетки (c-Kit⁺ и производные кардиосфер) являются одним из наиболее перспективных кандидатов на применение в клеточной терапии ИБС ввиду их безопасности и относительной простоты выделения аутологичного материала, а также они могут оказывать положительный эффект на регенеративные процессы в миокарде [Makkar et al., 2012; Marban, 2018; Davis, 2019; Bolli et al., 2021].

3.1. Получение и характеристика клеточных культур предсердия человека

В данной работе в качестве источника для получения кардиальных стромальных клеток человека были выбраны фрагменты тканей ушка правого предсердия, иссекаемые в ходе стандартного этапа операции аортокоронарного шунтирования. Образцы тканей предсердия человека от 11 пациентов были получены в ходе хирургического вмешательства на базе НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина и затем транспортировались в лабораторию в стерильном флаконе с культуральной средой. Первичные культуры были получены из ушка правого предсердия с помощью механического

измельчения и последующей ферментативной обработки коллагеназой. В среднем через 18 дней полученные первичные культуры пересаживали для дальнейшего пассирования, получения кардиосфер или для проведения анализа. Общий вид первичной культуры клеток предсердия человека представлен на Рисунке 8.

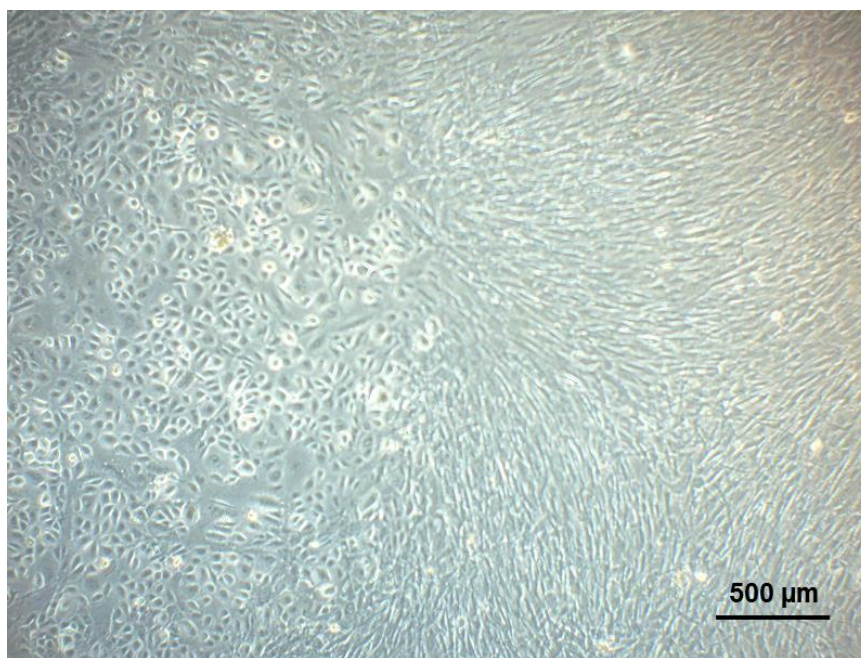


Рисунок 8 – Культура клеток предсердия человека (0 пассаж). Фазовый контраст. Шкала – 500 мкм

Состав полученной клеточной культуры предсердия охарактеризовали методом иммунофлуоресцентного окрашивания: было показано, что практически все клетки первичной культуры на 0-м пассаже имеют маркеры мезенхимальных клеток CD105, CD90, также присутствуют клетки, экспрессирующие гладкомышечный актин (α SMA), белок межклеточных контактов эндотелиальных клеток (CD31), белки внеклеточного матрикса коллаген, фибронектин и фактор фон Виллебранда (Рисунок 9).

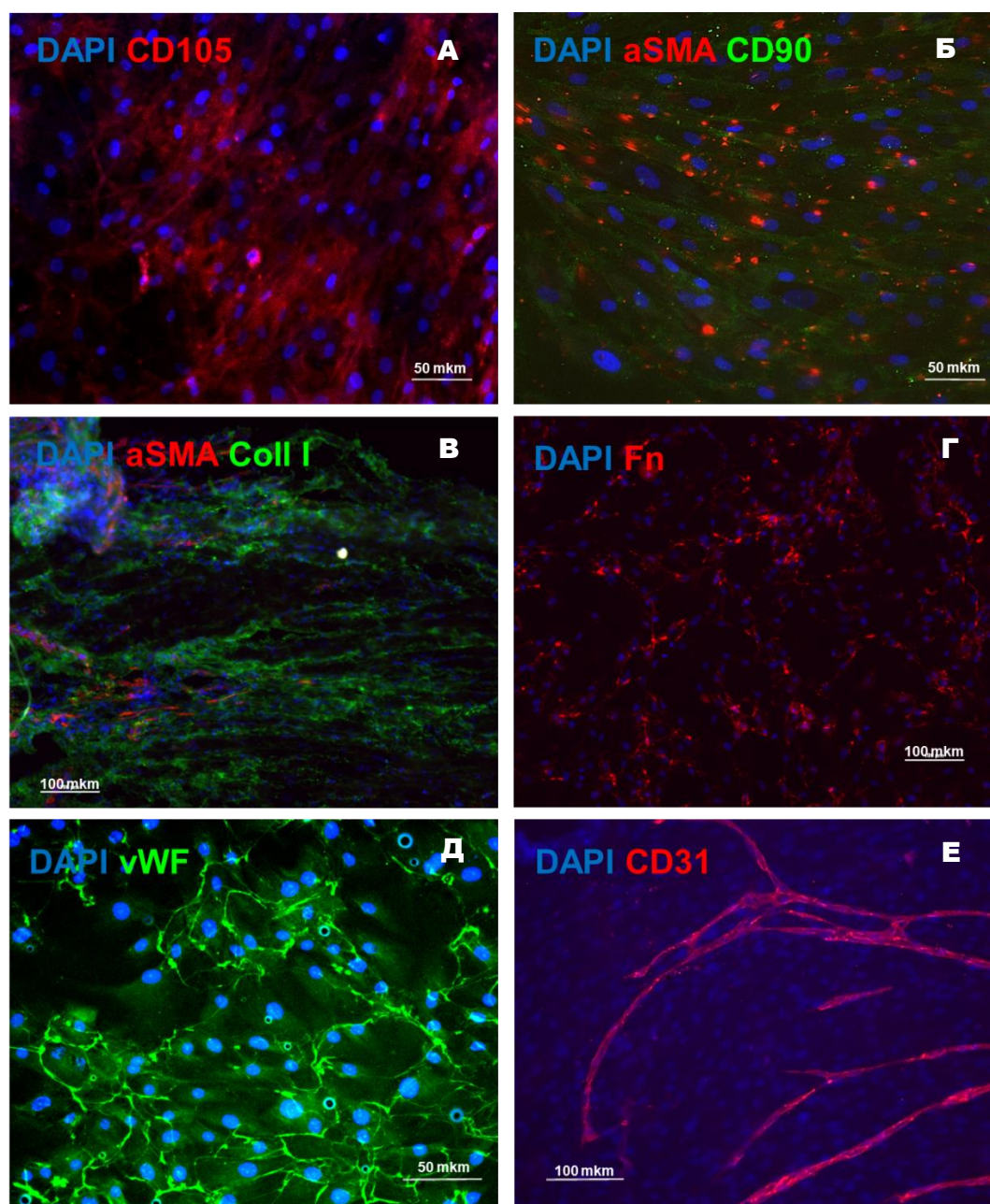


Рисунок 9 – Культура клеток предсердия человека (0 пассаж), окрашивание антителами к белкам: А – CD105; Б – aSMA (красный), CD90 (зеленый); В – aSMA (красный), коллаген I (зеленый); Г – фибронектин; Д – фактор фон Виллебранда; Е – CD31. Ядра окрашены DAPI (синий). Шкала – 50 мкм (А, Б, Д), 100 мкм (В, Г, Е)

В качестве способа культивирования клеток, полученных из фрагментов предсердия человека, использовали метод кардиосфер, основанный на процессе формирования сферических структур кардиальными стромальными клетками в среде без присутствия сыворотки на пластике со слабоадгезивным покрытием [Li et al., 2010]. При плотности клеток более 30000 кл/см² сферы образовывались на 1–2-й день культивирования, их формирование происходило путем агрегации и последующего роста (Рисунок 10).

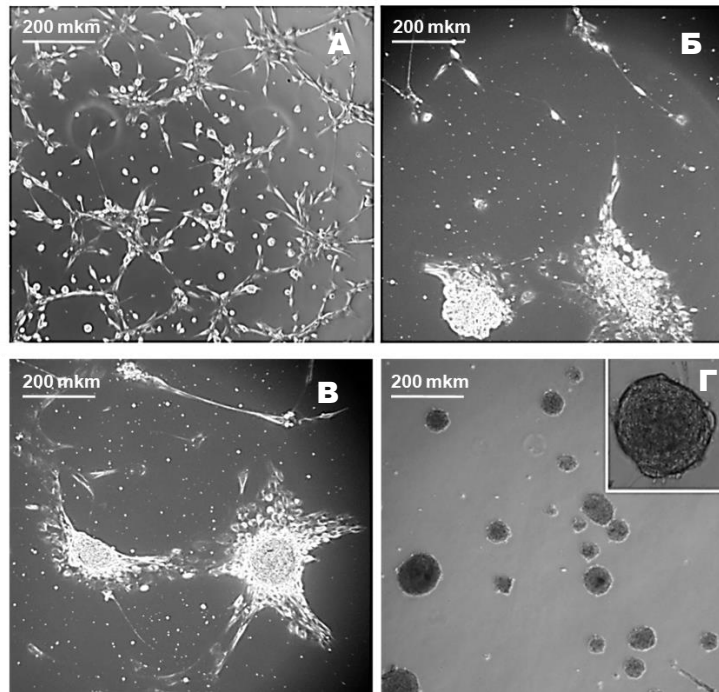


Рисунок 10 – Формирование кардиосфер в культуре клеток предсердия человека. А – 2-й день; Б – 4-й день; В – 5-й день; Г – 7-й день. Фазовый контраст. Шкала – 200 мкм

Препараты криосрезов кардиосфер анализировали методом иммунофлюоресцентного окрашивания. Кардиосферы были сформированы клетками, которые в основном являлись CD105+/aSMA+/vWF+. Встречались отдельные CD31+ и c-Kit+ клетки, также в клетках кардиосфер было показано наличие транскрипционного фактора GATA4 (Рисунок 11).

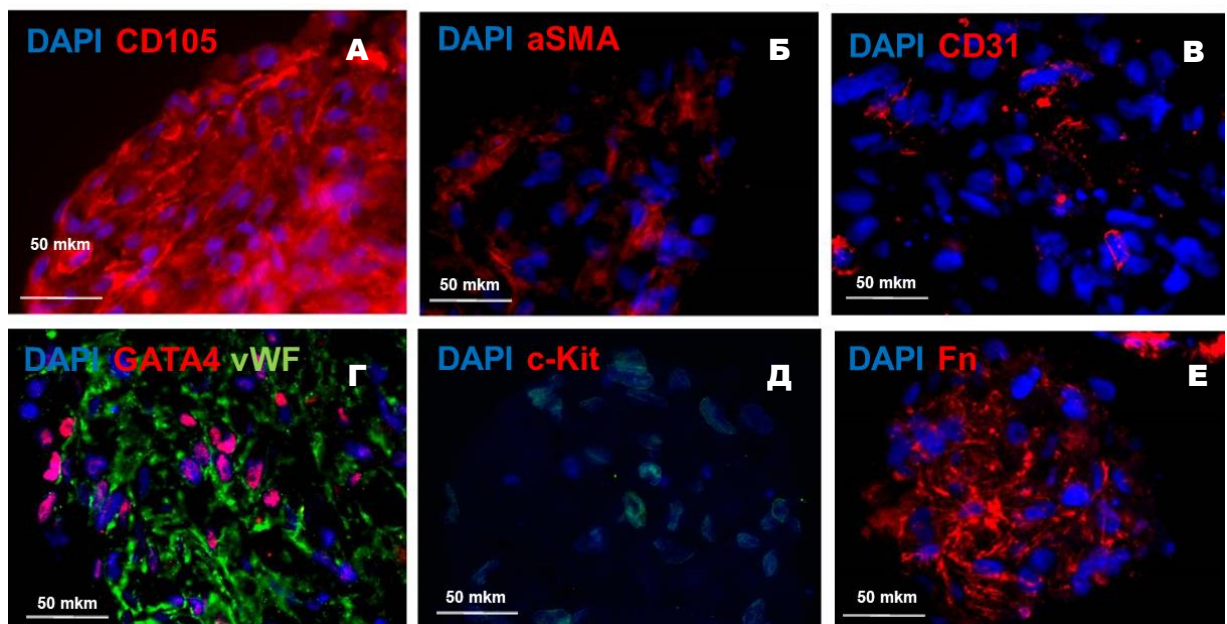


Рисунок 11 – Криосрезы кардиосфер, окрашенные антителами к белкам: А – CD105; Б – aSMA; В - CD31; Г – vWF (зеленый), GATA4 (красный); Д – c-Kit; Е – фибронектин. Шкала – 50 мкм

В клеточных культурах фрагментов предсердия человека, а также в полученных из них кардиосферах была показана экспрессия генов кардиомиоцитарных транскрипционных факторов (*GATA4*, *MEF2C*), гладкомышечного актина (α *SMA*), факторов роста (*HGF*, *IGF2*), рецепторов факторов роста (*VEGFR2*, *IGF1R*, *IGF2R*, *HGFR*), генов, характерных для эндотелиальных клеток (*CD31*, *VE-cadherin*) и *c-Kit*, регионального маркера кардиальных стромальных клеток (Рисунок 12).

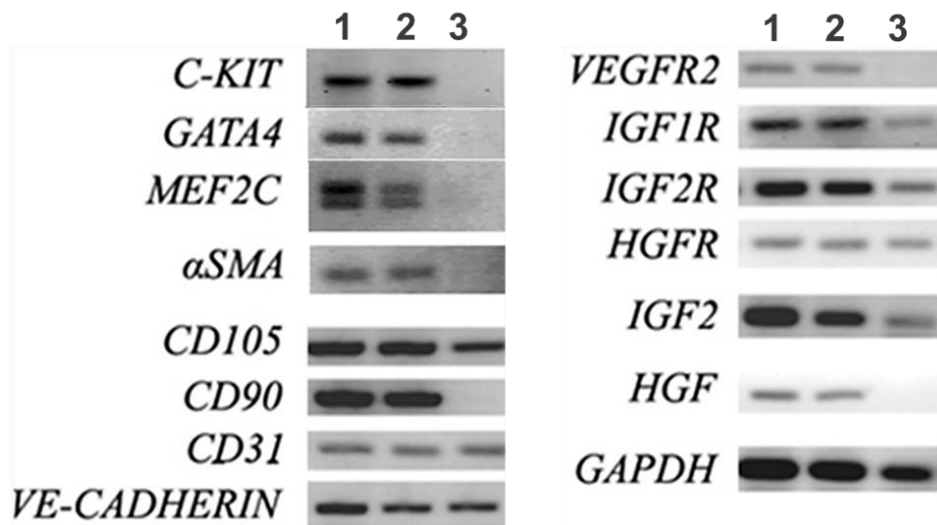


Рисунок 12 – Анализ экспрессии генов: 1 – первичная клеточная культура предсердия человека; 2 – клетки кардиосфер; 3 – HUVEC (клетки эндотелия пупочной вены человека)

Через 3 дня культивирования кардиосферы собирали из суспензии, переносили в новые культуральные флаконы в стандартной среде с 10%-м содержанием FBS (эмбриональной бычьей сыворотки), где они распластывались, и культивировали в течение 3–5 пассажей для последующего анализа.

Состав полученной клеточной культуры предсердия человека на 3-м пассаже (1,5 месяца от начала культивирования) охарактеризовали методом иммунофлюоресцентного окрашивания: было показано, что практически все клетки имеют мезенхимальные маркеры CD29, CD44, CD90 и CD105, в культуре присутствуют клетки, экспрессирующие маркеры эндотелиальных клеток и перицитов CD31, α SMA, VEGFR2, нестин, белки внеклеточного

матрикса коллаген, фибронектин и фактор фон Виллебранда, также было показано наличие c-Kit, регионального маркера кардиальных стромальных клеток (Рисунок 13).

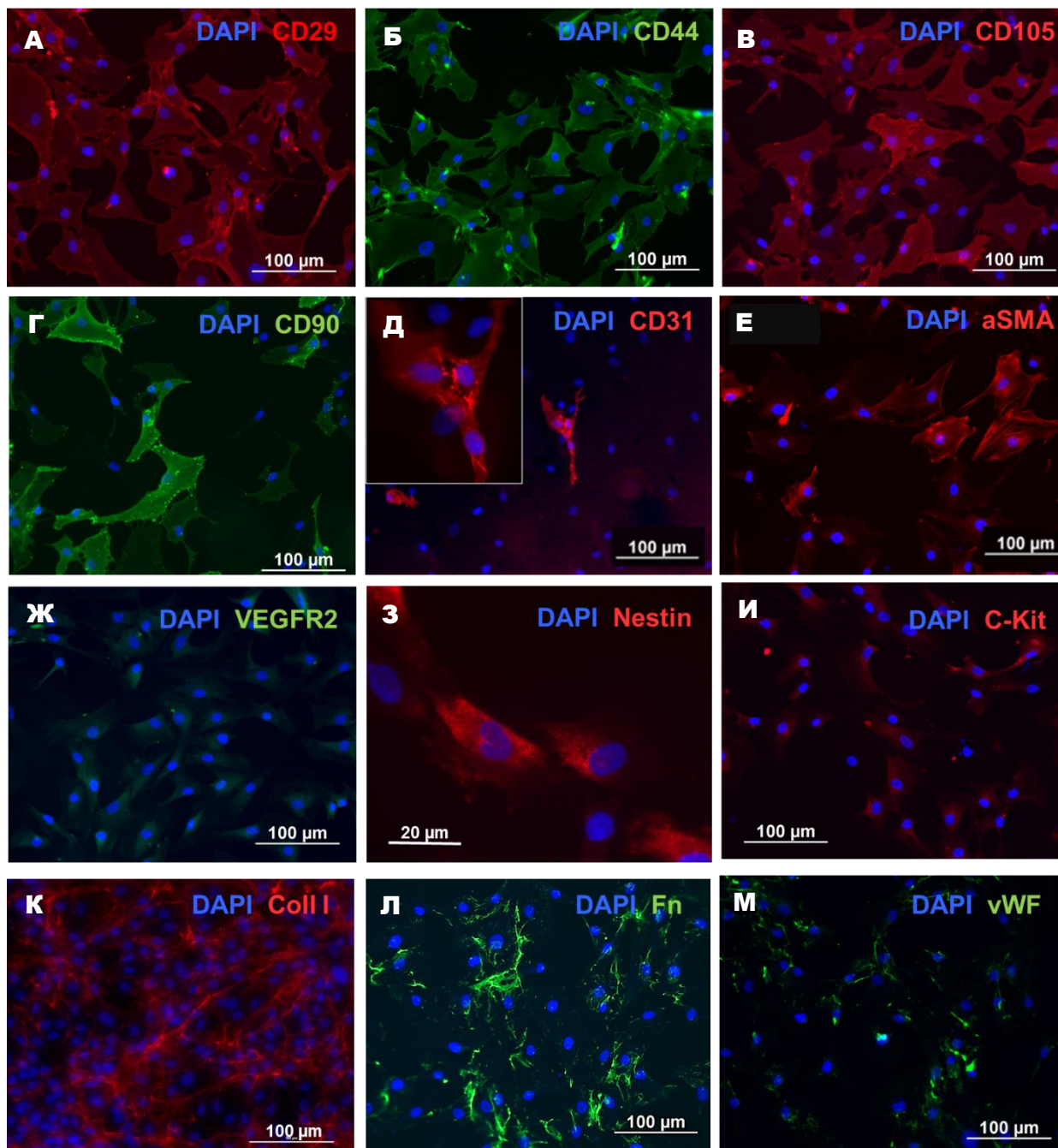


Рисунок 13 – Культура клеток предсердия человека (3 пассаж), окрашивание антителами к белкам: А – CD29; Б – CD44; В – CD105; Г – CD90; Д – CD31; Е – aSMA; Ж – VEGFR2; З – нестин; И – c-Kit; К – коллаген I; Л – фибронектин; М – фактор фон Виллебранда. Ядра окрашены DAPI (синий). Шкала – 100 мкм

На 3–4-м пассаже поверхностные маркеры клеток культуры предсердия человека, полученные от 3-х разных пациентов, были проанализированы методом проточной цитофлуориметрии (Рисунок 14).

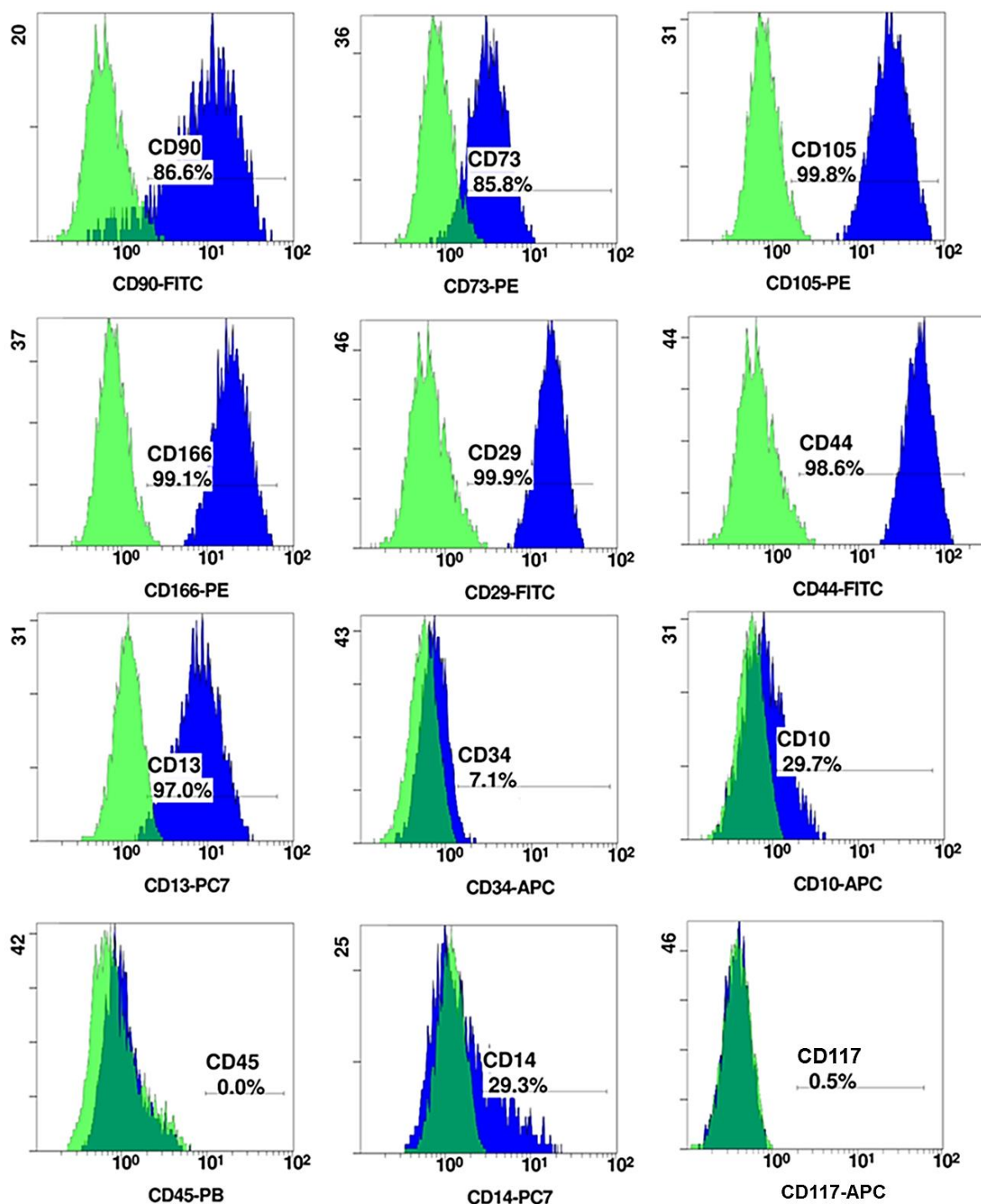


Рисунок 14 – Пример исследования клеточной культуры предсердия человека (3 пассаж) методом проточной цитофлуориметрии

Практически все клетки имели на своих мембранах маркеры МСК — CD73, CD90, CD105, CD166, CD44, CD29, CD13 (85–99% клеток). У части клеток был выявлен маркер CD10, который идентифицирует поверхностную нейтральную эндопептидазу и является общим маркером лимфоидных предшественников. Вне лимфоидной системы CD10 экспрессируется на многих стромальных и эпителиальных клетках, в фибробластах кожи соответствует белку эластазе [Morisaki et al., 2010]. Также у части клеток был обнаружен маркер миелоидных клеток CD14. Маркер гемопоэтической линии CD45 (<1%) в клетках культуры предсердия человека обнаружен не был, небольшая часть клеток экспрессировала CD34 (от 0 до 7%). Хотя CD34 и используется в качестве одного из маркеров ГСК, он также обнаружен на клетках, которые не являются стволовыми или клетками-предшественниками (например, эндотелиальные клетки) [Broxmeyer et al., 1995]. Следует отметить, что c-Kit (CD117) методом проточной цитометрии выявлен не был. Возможно, что при культивировании происходит интернализация рецептора c-Kit с поверхности клетки [Koninckx et al., 2011]. Имеются данные, что интернализация происходит при связывании белка SCF, который может присутствовать в ростовой среде, содержащей сыворотку [Jahn et al., 2002]. Также это можно объяснить использованием в экспериментах антител разных производителей: anti-CD117-APC, Miltenyi Biotec для проточной цитометрии и Anti-c-Kit, Santa Cruz Biotechnology для иммунофлюоресцентного окрашивания.

Таким образом было показано, что клеточные культуры предсердия человека, полученные методом кардиосфер, имеют маркеры характерные для МСК. Экспрессия клетками, полученными из сердца человека, мезенхимальных маркеров, характерных для МСК костного мозга, была также показана в других исследованиях, при этом данные об экспрессии маркера c-Kit (CD117) противоречивы [Koninckx et al., 2011; Matuszczak et al., 2014]. Согласно теории M.C.L. Keith и R. Volli, положительное влияние трансплантации кардиальных стромальных клеток на восстановление

миокарда после ишемического повреждения, показанное ранее во многих работах [Rota et al., 2008; Johnston et al., 2009; Tang et al., 2010; Lee et al., 2011; Bolli et al., 2013], может быть объяснено паракринным влиянием за счет высвобождения факторов роста и цитокинов из клеток донора по аналогии с уже описанным механизмом действия трансплантированных МСК [Mirotsov et al., 2011; Liang et al., 2014; Keith and Bolli, 2015]. В работе по изучению влияния трансплантации МСК при ишемии миокарда было показано, что данные клетки экспрессируют и секретируют ростовые факторы VEGF, HGF, MCP1 (фактор хемотаксиса моноцитов), SDF1 (хемоаттрактант В-лимфоцитов и гемопоэтических стволовых клеток), принимающие участие в процессах ремоделирования сосудистой сети [Kinnaird et al., 2004].

Для изучения экспрессии ростовых факторов клеточная культура предсердия человека была проанализирована методом ОТ-ПЦР на 3-м пассаже. В культуре выявляется наличие мРНК генов эндотелиальных факторов роста *PDGFb*, *Ang1*, *Ang2*, *VEGF*, *TGFb1* (и их рецепторов *PDGFRb*, *Tie2*, *VEGFR2*, *TGFb1R*), а также маркеров перицитов (клеток, участвующих в образовании стенки сосудов) *NG2* и *Nestin* (Рисунок 15).

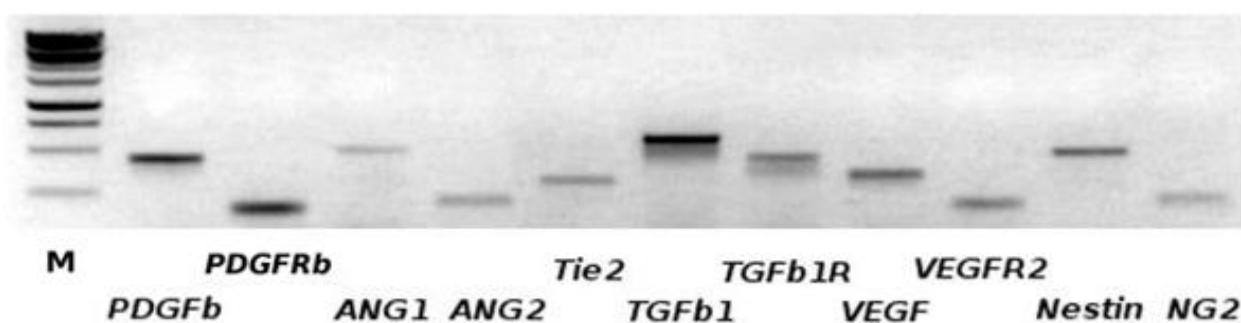


Рисунок 15 – Гены эндотелиальных факторов и рецепторов, экспрессирующиеся в культуре клеток предсердия человека

Также с помощью метода ПЦР в режиме реального времени в нескольких культурах клеток человека, полученных от разных пациентов, на 3-м пассаже была произведена количественная оценка экспрессии генов ангиогенных факторов и рецепторов: *Ang1*, *FGF2*, *VEGF*, *VEGFR2*, *CXCR4*, *SDF1*. Для сравнения в качестве контроля была использована культура

иммortalизованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 (культура была любезно предоставлена сотрудниками лаборатории клеточных технологий НИИКЭЛ) (Рисунок 16). По результатам данного анализа можно сделать вывод, что количественная экспрессия ангиогенных факторов и рецепторов в клеточных культурах, полученных от разных пациентов, может варьировать и, по-видимому, отражает гетерогенный состав популяции, состоящей из различных типов клеток, одни из которых могут производить ангиогенные факторы, в то время как другие могут их воспринимать через соответствующие рецепторы.

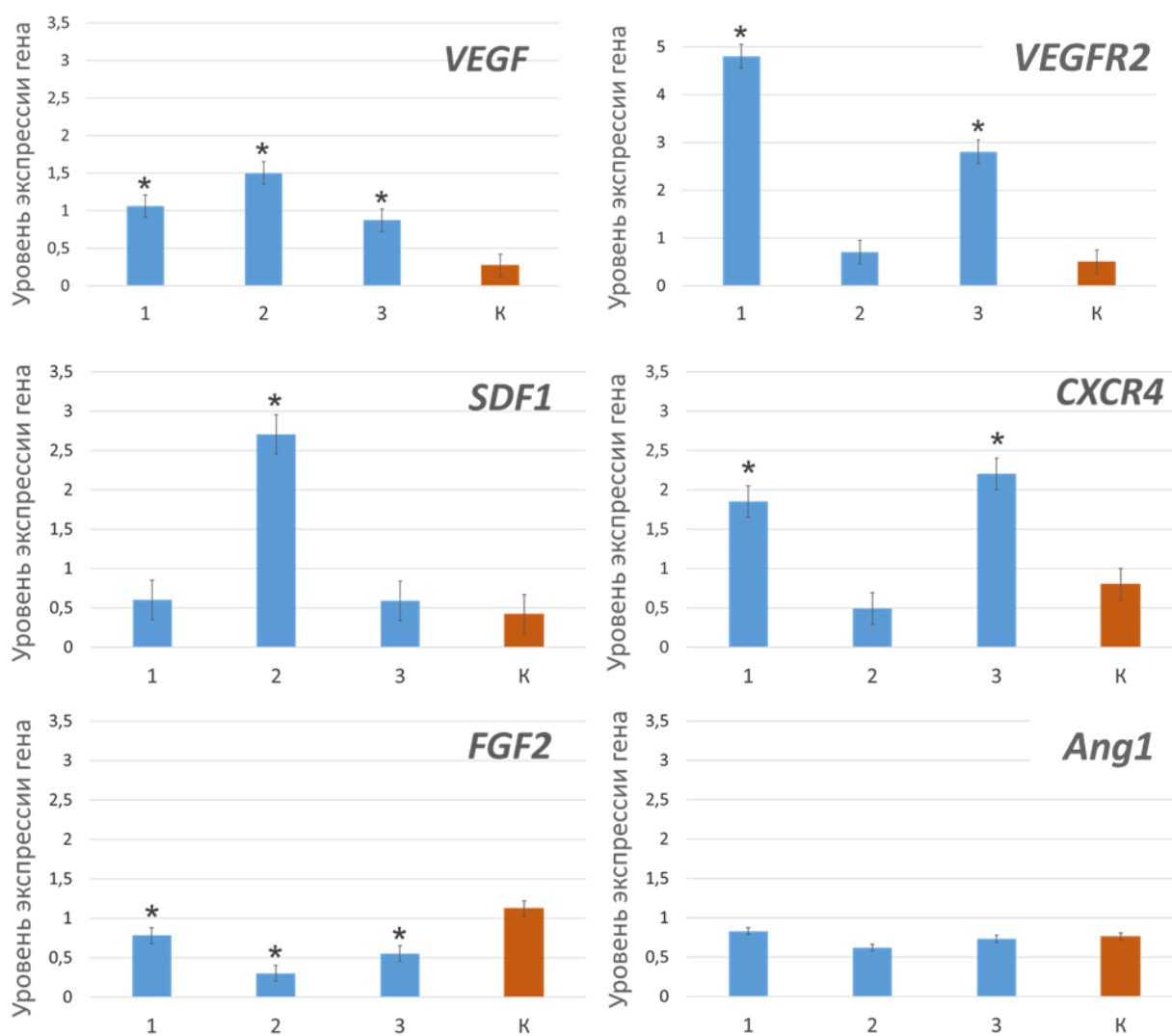


Рисунок 16 – Анализ экспрессии генов ангиогенных факторов и рецепторов в культурах кардиальных стромальных клеток, полученных из предсердия человека (1,2,3). Оценка методом ПЦР в режиме реального времени. К – культура эндотелиальных клеток EA.hy926.
* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Способность к секреции ангиогенных факторов VEGF, HGF, EGF, SDF1a, FGF2B в культуре клеток, полученных из фрагментов ушка правого предсердия человека, была показана в работе наших коллег из лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН [Захарова и др., 2015; Zakharova et al., 2017].

Таким образом в полученной нами культуре клеток было показано большое разнообразие ангиогенных факторов, вовлеченных в многоступенчатые процессы развития сосудов микроциркуляторного русла и формирования сложной трехмерной сосудистой сети, что делает ее перспективной для применения в терапевтическом ангиогенезе с целью лечения ишемических повреждений миокарда. Терапевтический ангиогенез или «биологическое шунтирование» - тактика улучшения перфузии ишемизированных тканей путем усиления естественных процессов, недостаточных для их адекватной неоваскуляризации [Коваль и др., 2013]. Этот термин вошел в клиническую практику после успешного применения гомологов VEGF у неоперабельных больных с ИБС или критической ишемии нижних конечностей [Isner et al., 1996].

Для изучения ангиогенных свойств клеточной культуры, полученной из фрагментов предсердия человека, *in vitro* использовали функциональный тест, основанный на способности эндотелиальных клеток формировать капилляроподобные структуры при культивировании на поверхности MatrigelTM (экстракт компонентов базальной мембраны, получаемый как продукт культивирования опухолевых клеток саркомы линии Engelbreth-Holm-Swarm, содержащий ламинин, нидоген, коллаген IV типа и гепарансульфат протеогликан) [Staton et al., 2009]. В качестве положительного контроля были использованы клетки HUVEC (клетки эндотелия пупочной вены человека), в качестве отрицательного контроля МСК костного мозга человека (Рисунок 17). Контрольные культуры клеток были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН.

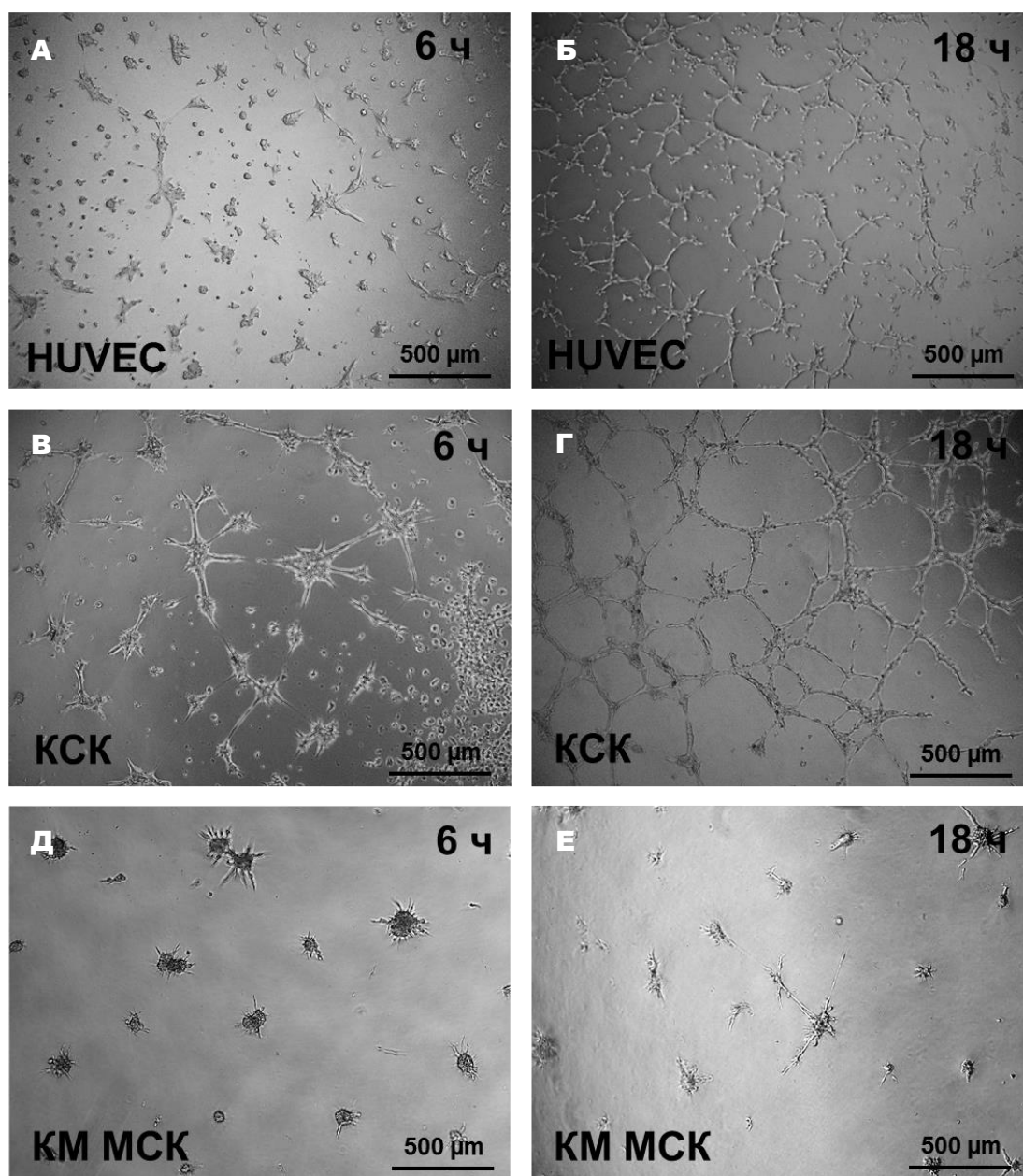


Рисунок 17 – Формирование капилляроподобных структур при культивировании на Matrigel™: А – HUVEC, 6 ч; Б – HUVEC, 18 ч; В – КСК (кардиальные стромальные клетки), 6 ч; Г – КСК (кардиальные стромальные клетки), 18 ч; Д – МСК костного мозга (КМ), 6 ч; Е – МСК костного мозга, 18 ч. Фазовый контраст. Шкала – 500 мкм

Было показано, что при культивировании на Matrigel™ клеточная культура предсердия человека формирует капилляроподобные структуры, что свидетельствует об определенном ангиогенном потенциале культуры. Морфометрический анализ сформированных структур показал, что общая длина и количество точек ветвления в культуре предсердия человека были достоверно выше, чем у культуры МСК костного мозга человека (Рисунок 18).

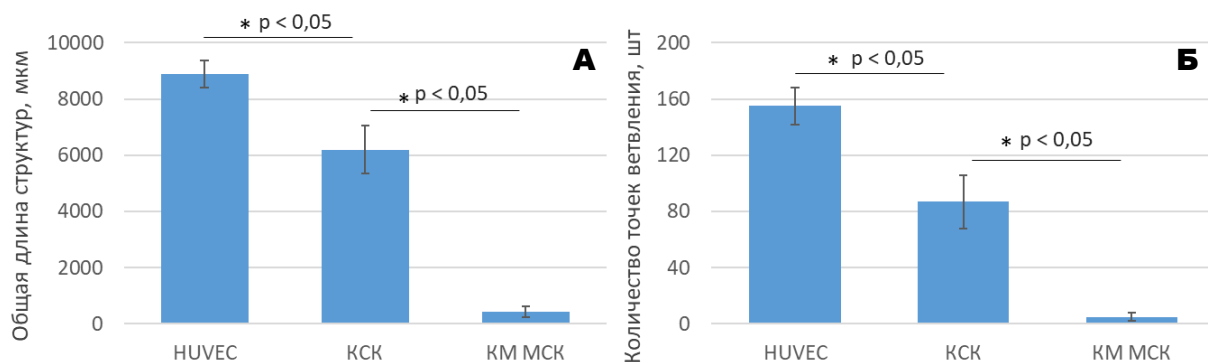


Рисунок 18 – Анализ общей длины капилляроподобных структур (А) и количества точек ветвления (Б) при культивировании на Matrigel™ в течение 18ч. HUVEC – клетки эндотелия пупочной вены человека, КСК – кардиальные стромальные клетки предсердия человека, КМ МСК – МСК костного мозга человека. * - $p < 0,05$

Поскольку микрососуды состоят из эндотелиоцитов и перицитов, и показано, что оба типа этих клеток при совместном культивировании на поверхности Matrigel™ участвуют в формировании капилляроподобных структур [Darland and D'Amore, 2001; Nees et al., 2012], а также в культуре выявлялись характерные для перицитов маркеры (NG2 и Nestin), было сделано предположение, что в клеточной культуре предсердия человека должны присутствовать перициты. Было показано, что часть клеток в полученной культуре окрашивалась на щелочную фосфатазу, что является одним из отличительных свойств перицитов [Nees et al., 2012] (Рисунок 19).

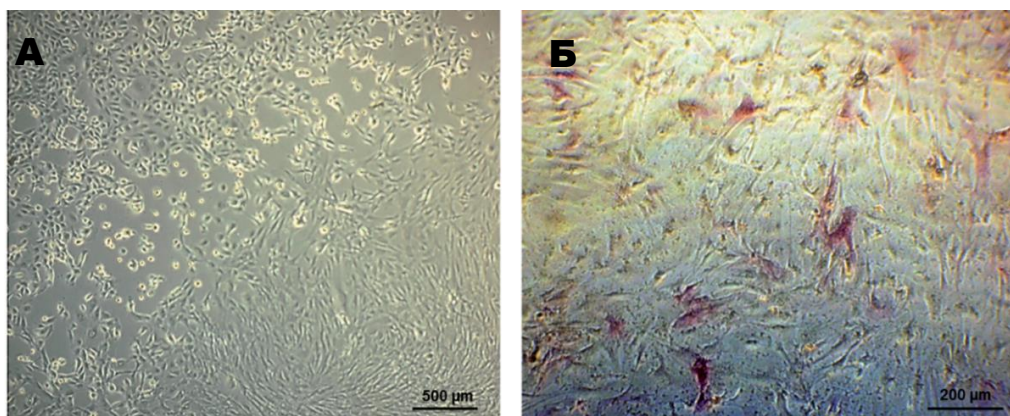


Рисунок 19 – А – Первичная культура клеток предсердия человека (0 пассаж); Б – Культура клеток предсердия человека (3 пассаж), окрашенная на щелочную фосфатазу. Фазовый контраст. Шкала – 500 мкм (А), 200 мкм (Б)

По мнению некоторых авторов, перициты, окружающие мелкие сосуды, относятся к прогениторным мезенхимальным клеткам, способным дифференцироваться в миофибробласты и гладкомышечные клетки [Brighton

and Hunt, 1997; Crisan et al., 2008]. Известно, что эндотелиальные клетки и перициты оказывают взаимное влияние друг на друга посредством производимых факторов [Hall, 2006; Павлова и др., 2015]. Эндотелиоциты производят фактор PDGF β , который воспринимается перицитами через PDGF β R и способствует их пролиферации и миграции, а в присутствии эндотелиоцитов, перициты продуцируют фактор VEGF, способствующий пролиферации эндотелиоцитов. Также перициты производят ангиопоэтины 1 и 2 (Ang1, Ang2), которые взаимодействуют с рецептором Tie2, присутствующим на поверхности эндотелиальных клеток [Hall, 2006]. Фактор Ang1 способствует стабилизации мелких сосудов, а Ang2 дестабилизирует взаимодействие эндотелиоцитов и перицитов между собой, способствуя миграции клеток и ангиогенезу. Фактор TGF β 1, производимый эндотелиоцитами, способствует дифференцировке перицитов и привлечению их для стабилизации микрососудов; также TGF β 1 ингибирует пролиферацию и миграцию эндотелиоцитов [Armulik et al., 2005; Hall, 2006; Ribatti et al., 2011]. Факторы SDF1 и Ang1 регулируют дифференцировку и миграцию клеток через соответствующие рецепторы CXCR4 и Tie2, также показано, что SDF1 может оказывать цитопротективное и иммуномодулирующее действие в ишемически пораженных тканях [Janowski, 2009].

Таким образом было показано, что клеточная культура, полученная из ушка правого предсердия человека, является гетерогенной по составу: в ней присутствуют клетки, экспрессирующие маркеры мезенхимальных клеток (CD73+, CD90+, CD105+), эндотелиальных клеток (CD31+) и перицитов (нестин+, ЩФ+). Полученная нами культура способна к формированию капилляроподобных структур в функциональном тесте на ангиогенность, кроме это в ней показана экспрессия ангиогенных ростовых факторов и их рецепторов. Можно предположить, что данная клеточная культура может оказывать регенеративный эффект при трансплантации в ишемизированный миокард за счет секреции цитокинов и ростовых факторов, а также стимуляции терапевтического ангиогенеза в зоне повреждения.

3.2. Получение и характеристика клеточных культур предсердия крысы

При получении клеточных культур из фрагментов предсердия крысы для исключения влияния состава сыворотки животного происхождения на конечный результат эксперимента использовали культивирование клеток в виде первичных кардиосфер в бессывороточной среде с добавлением заменителя сыворотки Knockout™ Serum Replacement (Knockout™ SR).

Известно, что сыворотка животного происхождения имеет сложный многокомпонентный состав: сывороточные белки (глобулины, альбумин), ферменты (лактатдегидрогеназа, щелочная фосфатаза), небелковые азотистые соединения (аминокислоты, креатинин), углеводы (глюкоза, галактоза), липиды и жирные кислоты (холестерин, инозитол, фосфолипиды), гормоны (инсулин, эстроген, кортикостероиды, тиреоидные гормоны), витамины, микроэлементы, а также факторы роста и цитокины (EGF, FGF, IGF, PDGF, TGF) [Arora, 2013; Yao and Asayama, 2017; Трухан, 2018]. К тому же состав сыворотки животных не всегда точно определен и может варьировать в зависимости от разных партий [Butler, 2015]. При использовании сред с сывороткой животного происхождения для трансплантации клеток повышается риск передачи бактериальных и вирусных агентов, а также развития иммунных и локальных воспалительных реакций, обусловленных контаминацией клеток белками крупного рогатого скота, которые могут присутствовать даже после проведения нескольких отмывок в ходе предтрансплантационной подготовки [Шаманская и др., 2009]. В настоящее время при получении материала для клеточной терапии наблюдается тенденция к замещению животной сыворотки аутологичной сывороткой или использованию низкосывороточных и бессывороточных сред, не содержащих компонентов животного происхождения [Aldahmash et al., 2011; Ng and Ikeda, 2011].

В данной работе были получены два типа культур из фрагментов предсердия крысы. При культивировании клеток в бессывороточной среде с добавлением 2% KnockOut™ Serum Replacement была получена популяция клеток, которую назвали SR2 (Serum Replacement 2%) способная пролиферировать в суспензионной культуре и обладающая клоногенностью. Клетки имели округлую или овальную форму, росли группами в виде кардиосфер во взвешенном состоянии, не прикрепляясь к поверхности культурального пластика (Рисунок 20). Для сравнения также была получена культура клеток (названная SR10) в среде с суммарным 10%-м содержанием сыворотки (FBS 5% и KnockOut™ Serum Replacement 5%). Клетки этой культуры росли адгезионно в монослое, имели вытянутую форму и отростки (Рисунок 20).

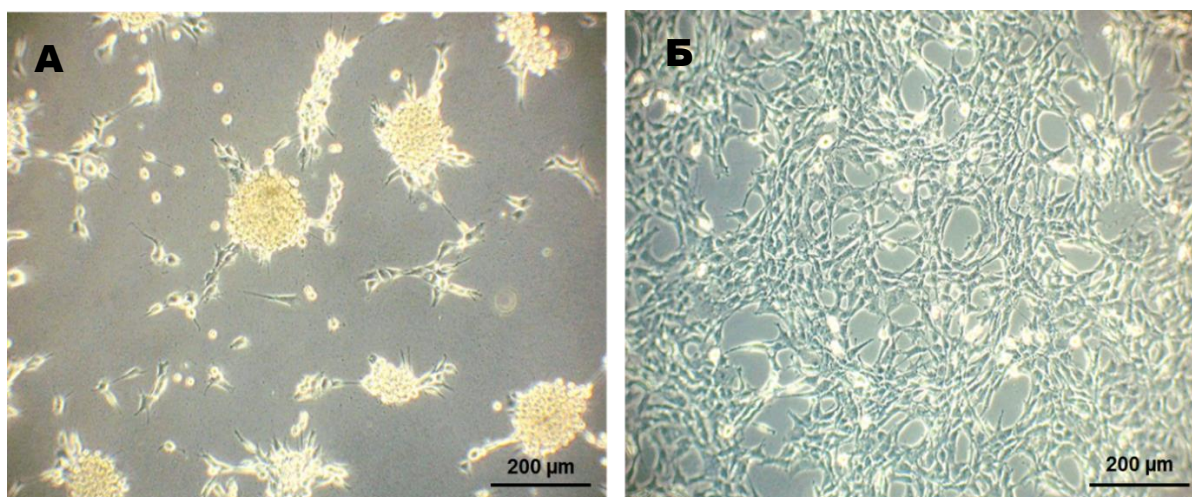


Рисунок 20 – Культивирование клеток предсердия крысы в ростовых средах с различным содержанием сыворотки:
А – культура SR2 (ростовая среда содержит 2% SR); Б – культура SR10 (ростовая среда содержит 5% FBS, 5%SR). Фазовый контраст. Шкала – 200 мкм

Через 10–12 дней культивирования из части клеток обеих полученных культур (10^6 клеток) выделяли РНК и проводили сравнительный анализ методом ОТ-ПЦР (Рисунок 21).

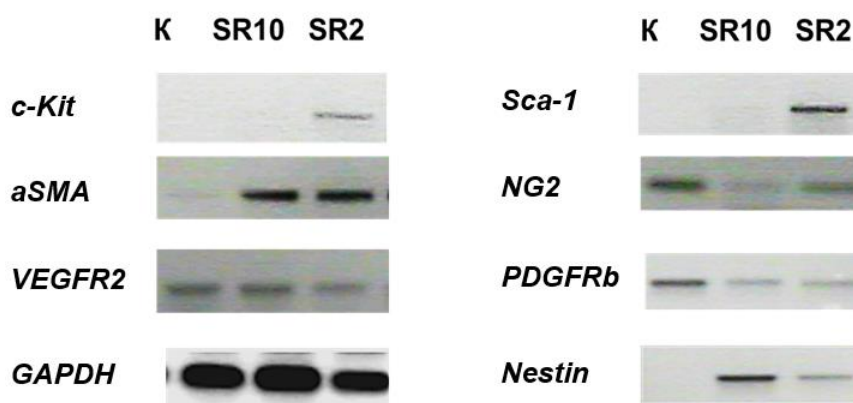


Рисунок 21 – Анализ экспрессии генов в клетках культур, полученных из предсердия крысы. (К) контроль – стенка правого предсердия крысы; (SR10) – клетки, культивируемые на среде с 10% сыворотки; (SR2) – клетки, культивируемые на среде с 2% заменителя сыворотки

Было показано, что культивирование в бессывороточной среде способствует поддержанию популяции клеток, экспрессирующих маркеры *c-Kit* и *Sca-1*, тогда как использование ростовой среды с сывороткой приводит к их потере. *Sca-1* (Stem cell antigen-1) известен как маркер кардиальных стромальных клеток у мышей и крыс, у человека этот белок отсутствует, и на данный момент неизвестно существование каких-либо его функциональных аналогов [Oh et al., 2003; Holmes and Stanford, 2007; Xu et al., 2015]. Также в клетках обеих культур была показана экспрессия гена рецептора эндотелиального фактора роста сосудов *VEGFR2* и ряда генов характерных для перицитов – *aSMA*, *NG2*, *Nestin*, *PDGFRb*.

Наличие в культуре SR2 клеток, несущих на своей поверхности белки *c-Kit* и *Sca-1*, было также показано методом иммунофлюоресцентного окрашивания (Рисунок 22).

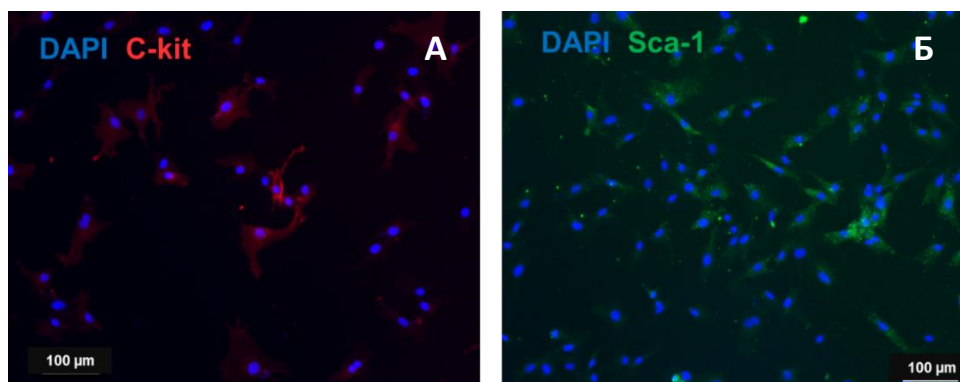


Рисунок 22 – Иммунофлюоресцентное окрашивание клеток культуры SR2 антителами к белкам: А – *c-Kit*, Б – *Sca-1*. Ядра окрашены DAPI (синий). Шкала – 100 мкм

Клетки популяции SR2 характеризовались значительной способностью к связыванию изолектина В4 (лектин, обладающий специфичностью к остаткам сахаров на поверхности эндотелиальных клеток) и формировали капилляроподобные структуры в функциональном тесте на ангиогенность *in vitro*. Клетки популяции SR10 нарабатывали белок α SMA, который выявлялся в виде характерных фибрилл, и теряли способность связывать изолектин В4. Тем не менее, в функциональном тесте при культивировании на поверхности Matrigel™ часть клеток образовывала нерегулярные структуры (Рисунок 23).

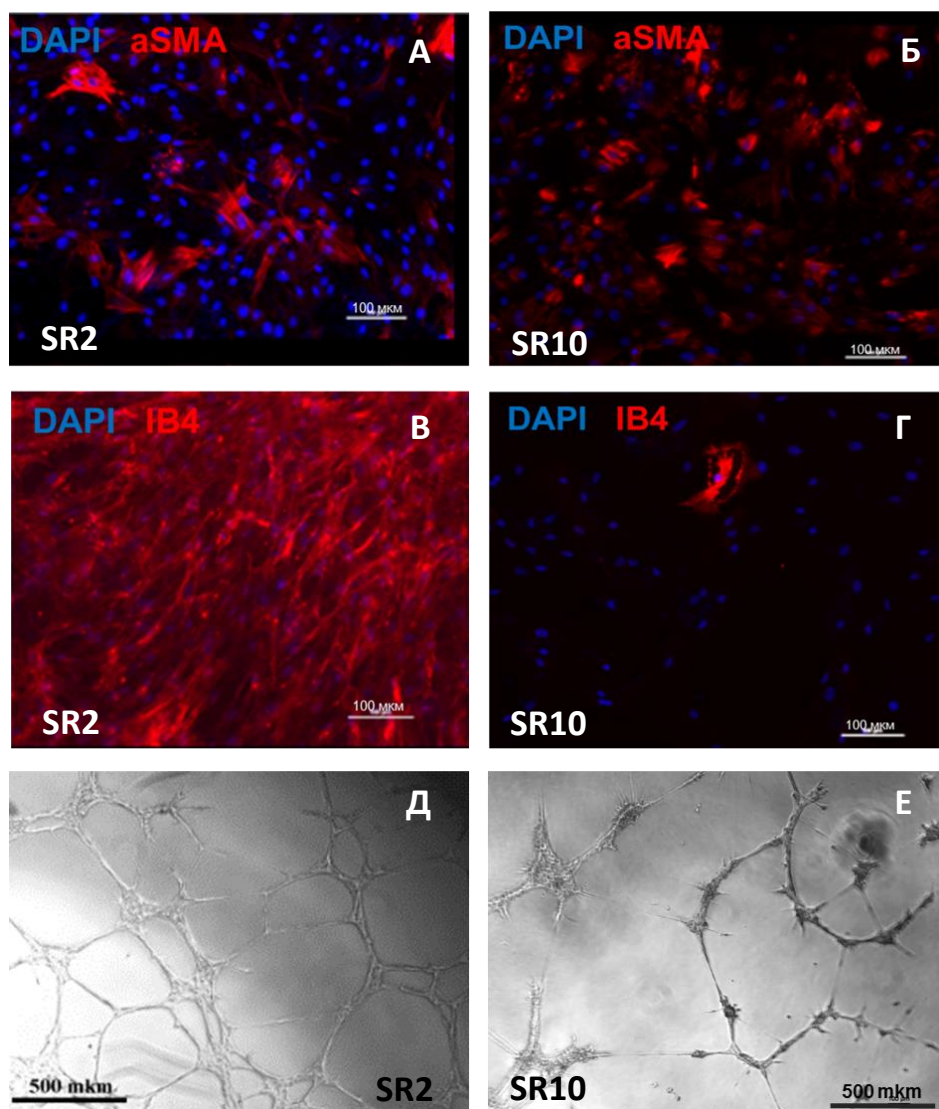


Рисунок 23 – Иммунофлюоресцентное окрашивание антителами к белку α SMA, ядра окрашены DAPI (синий): А – культура SR2; Б – культура SR10. Связывание изолектина В4, ядра окрашены DAPI (синий): В – культура SR2; Г – культура SR10. Формирование капилляроподобных структур при культивировании в течение 18 ч на Matrigel™, фазовый контраст: Д – культура SR2; Е – культура SR10. Шкала – 100 мкм (А, Б, В, Г), 500 мкм (Д, Е)

Клетки полученной культуры SR2 окрашиваются антителами к CD31 (белок межклеточных контактов эндотелиальных клеток), часть клеток окрашивается на нестин, также клетки культуры SR2 способна нарабатывать фибронектин и коллаген I типа, поглощать ацетилированный липопротеин низкой плотности и связывать изолектин B4 (Рисунок 24).

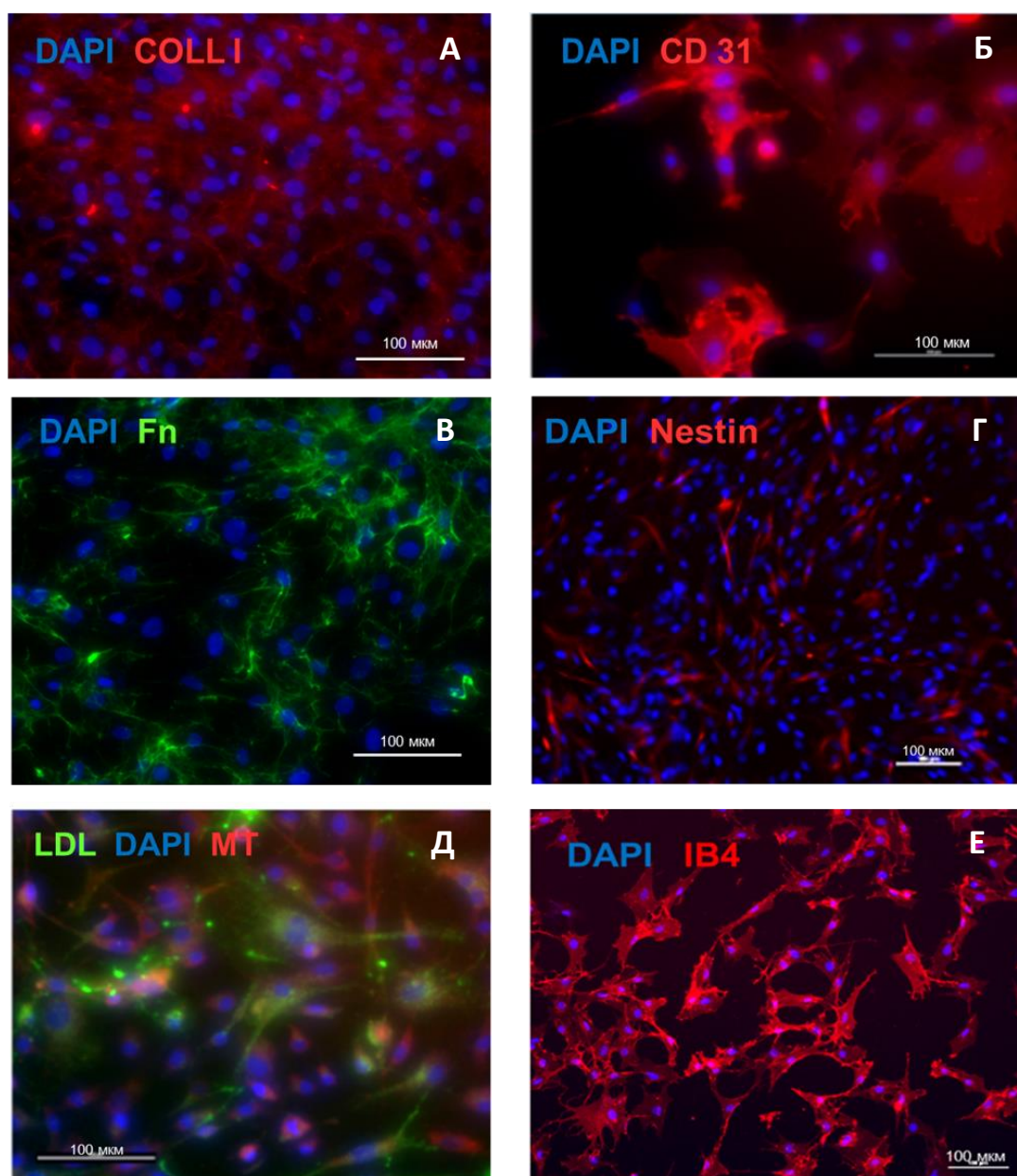


Рисунок 24 – А – Иммунофлюоресцентное окрашивание (ИФ) клеток SR2 культуры антителами к коллагену I; Б – ИФ окрашивание клеток SR2 культуры антителами к CD31; В – ИФ окрашивание клеток SR2 культуры антителами к фибронектину; Г – ИФ окрашивание клеток SR2 культуры антителами к нестину; Д – Поглощение клетками SR2 культуры ацетилированного липопротеина низкой плотности (зеленый), MitoTracker (красный); Е – связывание изолектина B4 клетками SR2 культуры. Ядра окрашены DAPI (синий). Шкала – 100 мкм

Из литературных данных известно, что способность к поглощению ацетилированного липопротеина низкой плотности и связыванию изолектина В4 являются свойствами эндотелиальных прогениторных клеток [Liew et al., 2006; Mieno et al., 2008]. Поскольку в полученной культуре была показана экспрессия гена рецептора эндотелиального фактора роста сосудов *VEGFR2* и ряда генов характерных для перицитов (клеток, регулирующих образование стенки сосудов) – *aSMA*, *NG2*, *Nestin*, *PDGFRb*, возможно, что при трансплантации в миокард полученные клетки могут принимать участие в пролиферации и миграции эндотелиоцитов, стимулируя ангиогенез в тканях сердца [Павлова и др., 2015].

Таким образом, предложенный нами способ получения клеточных культур фрагментов предсердия в бессывороточной среде, способствует поддержанию ангиогенного потенциала в условиях *in vitro*.

3.3. Моделирование инфаркта миокарда и трансплантация аутологичных клеток, полученных из предсердия, на модели постинфарктного кардиосклероза у крыс

В основе многих исследований клеточной терапии ИБС были использованы модели острой ишемии миокарда [Linke et al., 2005; Tseliou et al., 2013; Kanazawa et al., 2015]. Вместе с этим для эффективного лечения острой ишемии разработан комплекс процедур, состоящий из тромболизиса, коронаропластики и коронарного шунтирования. Однако для хронической миокардиальной ишемии выбор вариантов лечения ограничен. На момент начала диссертационной работы особое внимание исследователей уделялось модели хронических сердечно-сосудистых заболеваний при последующем проведении клеточно-опосредованного лечения [Johnston et al., 2009; Тихонов и др., 2010; Lee et al., 2011; Gallet et al., 2015]. Исходя из этих соображений, для изучения терапевтического

потенциала клеточной культуры, полученной из фрагментов предсердия, в лечении ишемических поражений миокарда, была использована модель экспериментального инфаркта у крыс линии WAG/G с последующей трансплантацией маркированных экспрессией GFP клеток культуры SR2 на стадии развития хронического кардиосклероза (Рисунок 25).

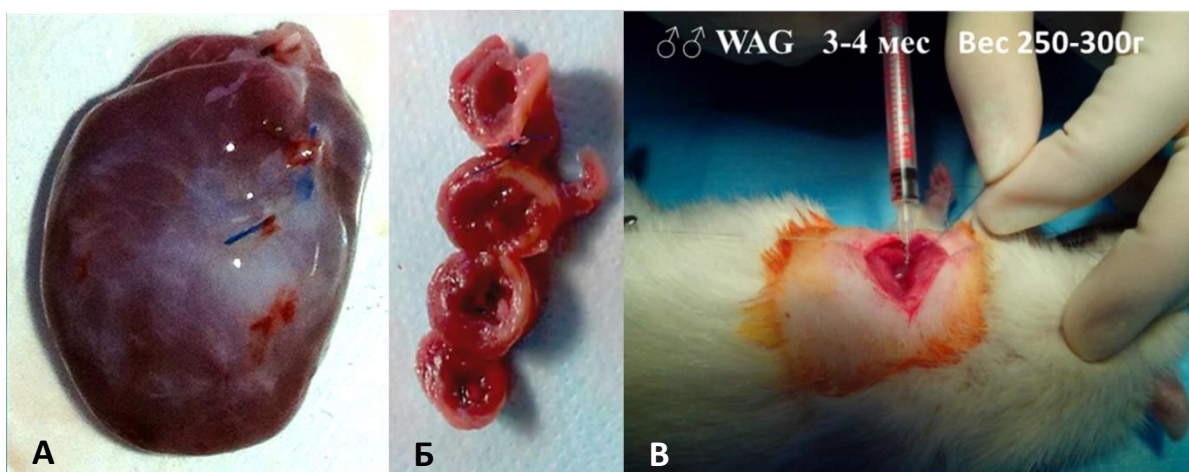


Рисунок 25 – А, Б – Эксплантированное сердце крысы с развившейся зоной инфаркта миокарда через 7 дней после наложения лигатуры; В – Интрамиокардиальная трансплантация клеток в перинфарктную зону через 6 недель после экспериментального инфаркта миокарда

Операция по окклюзии левой нисходящей коронарной артерии была проведена на 30 крысах линии WAG/G. Из них одна крыса погибла при операции, три – через 24–72 ч. Инфаркт миокарда подтверждался визуально (побледнение стенки сердца ниже места окклюзии) и с помощью электрокардиографического исследования. Наличие ишемии миокарда (поднятие зубца ST на кардиограмме) непосредственно после наложения лигатуры наблюдалось у 22 животных. Развитие кардиосклероза (патологический зубец Q на ЭКГ) на 7-й день после операции было обнаружено у 16 крыс (Рисунок 26). Животных, у которых не было отмечено на ЭКГ этих изменений, в дальнейший эксперимент не включали.

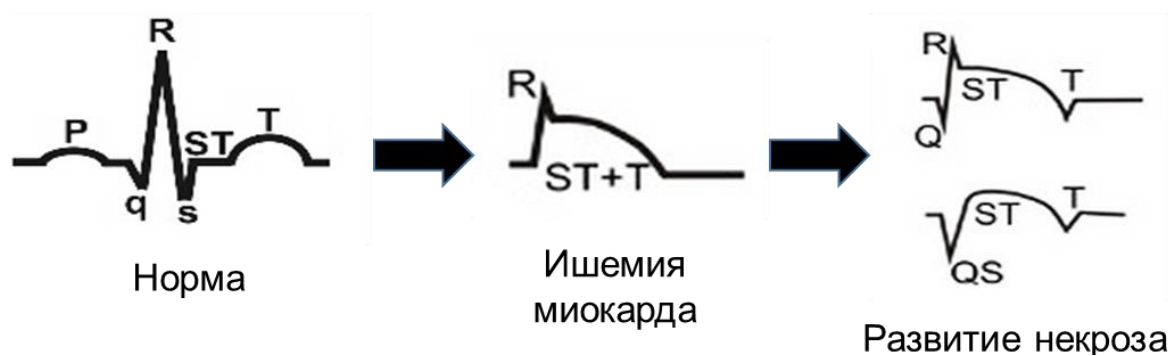
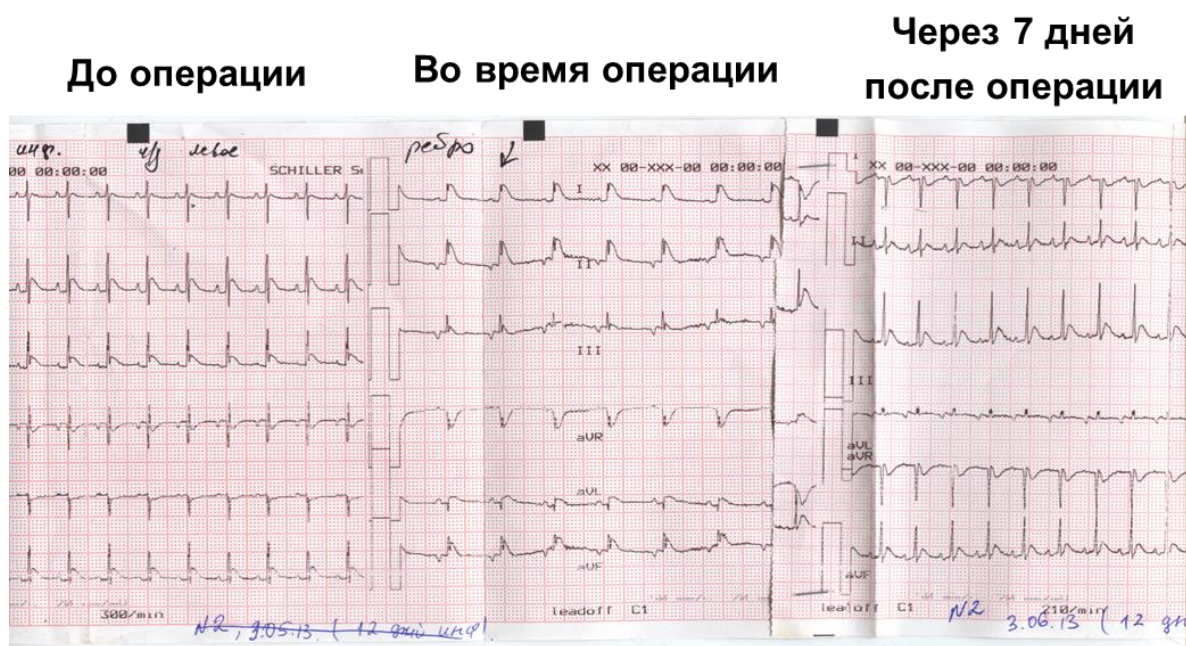


Рисунок 26 – Развитие инфаркта миокарда на ЭКГ крысы

Исследование функции сердца, проведенное методом ультразвукового сканирования, у 11 из 16 животных выявило нарушение сократительной функции левого желудочка и снижение сердечного выброса, а также развитие компенсаторной гипертрофии отделов миокарда, не пораженных инфарктом (Таблица 4). Эти крысы были отобраны для дальнейшего эксперимента по введению GFP-позитивных клеток культуры SR2 через 6 недель после экспериментально вызванного инфаркта миокарда, в качестве контроля использовалось введение PBS равного объема. Животных делили на опытную (6 крыс) и контрольную (5 крыс) группы случайным образом.

Таблица 4 – Изменение параметров функционального состояния сердца у крыс до и через 6 недель после инфаркта миокарда

| Параметр | До ИМ | После ИМ |
|--------------------------|-----------|------------|
| Фракция выброса, % | 76,3±10,4 | 51,2±10,8* |
| Функция сократимости, % | 61,3±11,4 | 30,8±8* |
| КДР левого желудочка, см | 0,66±0,11 | 0,76±0,08* |
| КСР левого желудочка, см | 0,36±0,12 | 0,47±0,1* |
| Ударный объем, мл | 0,82±0,22 | 0,69±0,18* |
| Диаметр корня аорты, см | 0,32±0,02 | 0,36±0,04* |

КДР – конечный диастолический размер; КСР – конечный систолический размер.

* – $p < 0,05$

Для оценки успешности трансплантации клеток при интрамиокардиальной инъекции, нескольким животным были введены клетки, меченные прижизненным митохондриальным красителем. Тепловые карты, сделанные через 24 и 48 ч после инъекций, показали наличие сигнала в стенке желудочка, в то время как у крыс контрольной группы, получивших инъекции PBS, сигнала не было (Рисунок 27).

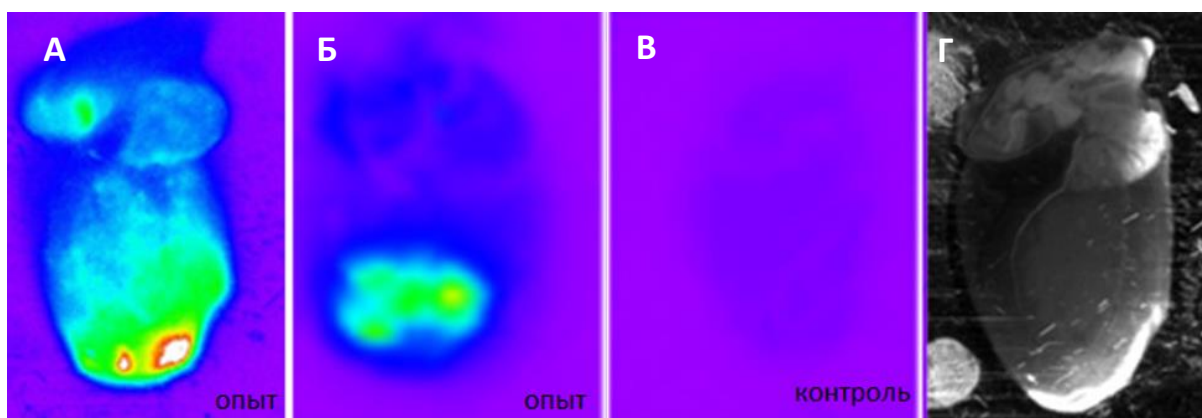


Рисунок 27 – Визуализация клеток культуры SR2, меченных MitoTracker® Red FM: А – через 24 ч после инъекции; Б – через 48 ч после инъекции; В – контроль (инъекция PBS); Г – общий вид сердца. In-vivo Multispectral Imaging System FX, тепловая карта

Через 6 недель после трансплантации клеток проводилось повторное ультразвуковое сканирование сердца, однако относительного улучшения сократительной функции левого желудочка у крыс опытной группы по сравнению с контролем обнаружено не было (Таблица 5). Однако у животных, которым делали инъекции клеток культуры SR2, увеличился ударный объем и было отмечено расширение корня аорты, вызванное, по-видимому, увеличением объема крови, проходящего через сосуд.

Таблица 5 – Результаты Эхо-КГ исследований крыс опытной и контрольной групп до и через 6 недель после трансплантации клеток

| Параметр | До инъекции PBS | После инъекции PBS | До инъекции клеток | После инъекции клеток |
|----------|-----------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
| КДР, см | 0,74±0,09 | 0,83±0,11 | 0,83±0,07 | 0,89±0,07 |
| КСР, см | 0,48±0,11 | 0,58±0,15 | 0,54±0,11 | 0,64±0,11 |
| ФВ, % | 58,59±3,30 | 59,95±4,6 | 56,7±3,70 | 57,30±5,90 |
| ФС, % | 31,86±10,30 | 30,81±8,0 | 31,01±0,02 | 29,18±8,50 |
| АО, см | 0,37±0,03 | 0,33±0,04 | 0,36±0,02 * | 0,40±0,03* |
| УО, мл | 0,64±0,18 | 0,75±0,12 | 0,83±0,01* | 0,89±0,30* |

КДР – конечный диастолический размер левого желудочка, КСР – конечный систолический размер левого желудочка, ФВ – фракция выброса, ФС – функция сократимости, АО – диаметр корня аорты, УО – ударный объем.

* - $p < 0,05$

При морфометрическом анализе криосрезов сердца, окрашенных по методу пикро-Маллори, было показано, что у крыс, получивших инъекции клеточной культуры SR2, относительный периметр и относительная площадь зоны кардиосклероза были меньше, чем у получивших инъекции PBS (Рисунок 28).

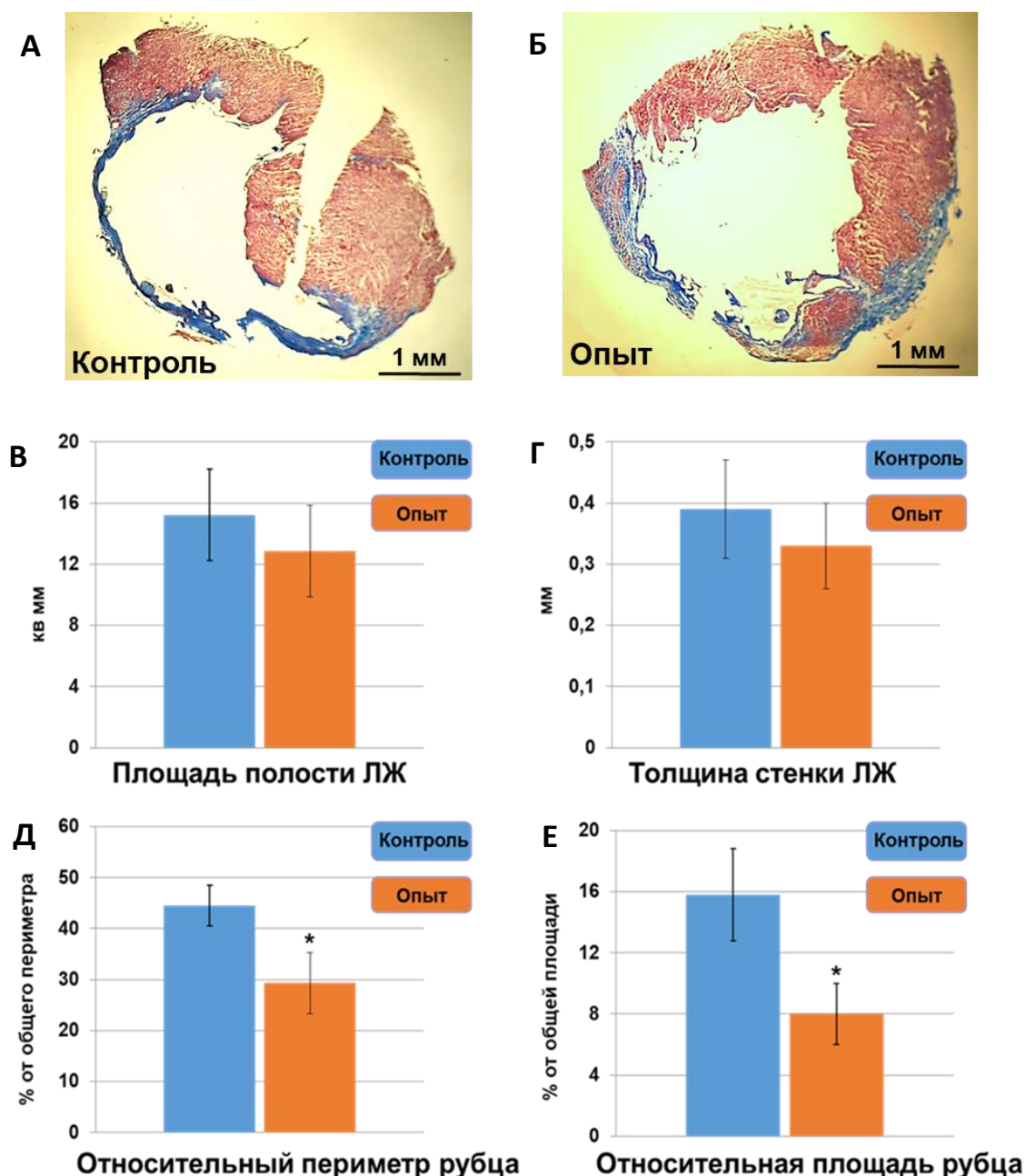


Рисунок 28 – Криосрезы сердца крысы: А – через 6 недель после инъекции PBS (контроль); Б – через 6 недель после инъекции аутологических кардиальных стромальных клеток (опыт). Окрашивание пикро-Маллори. Шкала – 1 мм. Сравнение основных морфометрических параметров левого желудочка (ЛЖ) у опытной и контрольной группы: В – площадь полости ЛЖ; Г – толщина стенки ЛЖ; Д – относительный периметр рубца; Е – относительная площадь рубца. * – $p < 0,05$

В других работах, посвященных трансплантации клеточных культур, содержащих кардиальные стромальные клетки, животным с экспериментальной ишемией миокарда отмечается повышение ударного объема и фракции выброса и уменьшение КДР и КСР относительно контрольной группы [Tseliou et al., 2013; Welt et al., 2013]. Известно, что

степень выраженности данных параметров влияет на продолжительность жизни больных, перенесших инфаркт миокарда. Однако, в нашей работе подобного эффекта от введения клеток обнаружено не было.

Для изучения процесса ангиогенеза в периинфарктной зоне проводили исследование криосрезов сердца после инкубации с изолектином В4 (который связывается с васкулярными клетками в том числе и с предшественниками эндотелиоцитов). Достоверных отличий в плотности сосудов получено не было. Присутствия GFP-позитивных клеток через 6 недель после интрамиокардиального введения ни на одном препарате обнаружено не было (Рисунок 29).

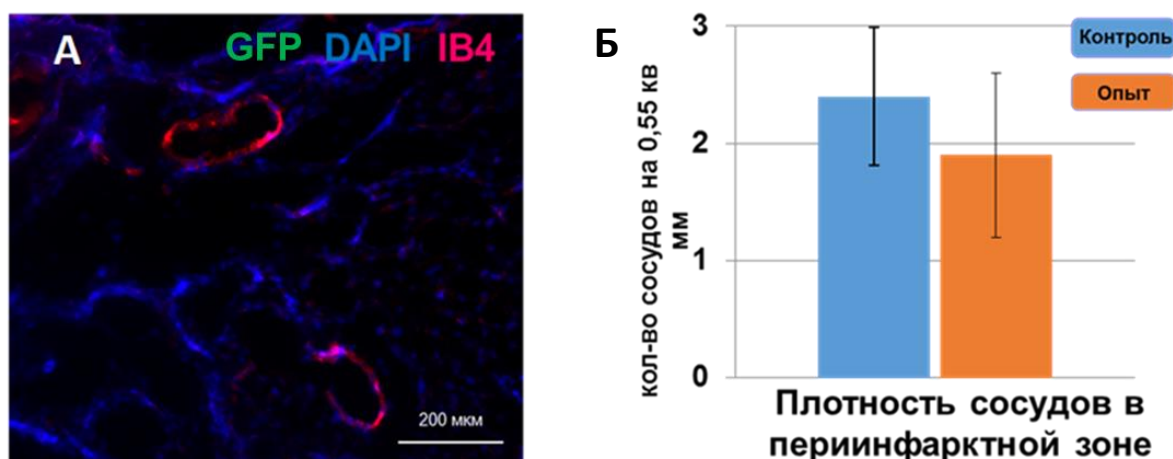


Рисунок 29 – Изучение ангиогенеза в периинфарктной зоне.

А – Связывание изолектина В4 в периинфарктной зоне у крысы, ядра окрашены DAPI (синий), шкала – 200 мкм; Б – плотность сосудов в периинфарктной зоне

Механизм, лежащий в основе регенеративного влияния трансплантации кардиальных стромальных клеток на функциональное состояние сердца после ишемического поражения миокарда, на сегодняшний день остается не понятен до конца. В проведенных клинических исследованиях CADUCEUS сообщалось о значительном терапевтическом потенциале клеток кардиосфер при лечении постинфарктного кардиосклероза [Makkar et al., 2012], однако отмечалось, что эффект достигается за счет улучшения перфузии гибернирующего миокарда и паракринного эффекта трансплантированных клеток [Malliaras et al., 2014]. Эксперименты по трансплантации аутологичных

кардиальных стромальных клеток в зону ишемии у разных видов животных также показали, что данные клетки, оказывают паракринный эффект, стимулируют ангиогенез и не дифференцируются в кардиомиоциты *in vivo* [Tang et al., 2010; Li et al., 2011; Bolli et al., 2013]. В последующих работах была показана минимальная эффективность и незначительность дифференцировки кардиальных стромальных c-Kit⁺ клеток в кардиомиоцитарном направлении [Senyo et al., 2013; van Berlo et al., 2014; Keith and Bolli, 2015]. Артефакты, которые принимались за доказательства кардиомиогенной дифференцировки, могли возникать из-за способности данных клеток сливаться с кардиомиоцитами и формировать гибридные клетки, содержащие сократительные миофибриллы [Laflamme and Murry, 2011]. Доказательства *in vivo* дифференцировки эндогенных c-Kit⁺ клеток сердца в эндотелиальном направлении и их участие в формировании микрокапилляров были опубликованы рядом исследователей, однако трансплантированные клетки в составе новых сосудов не выявлялись [Tillmanns et al., 2008; Bearzi et al., 2009; 229. Van Berlo et al., 2014; Sultana et al., 2015]. Показано, что c-Kit⁺ клетки сердца экспрессируют рецепторы эндотелиальных факторов роста VEGF, PDGF и урокиназу, играющих важную роль в формировании сосудов при ишемии и воспалении, регулируя направленную миграцию клеток сосудистой стенки, моноцитов/макрофагов и стволовых/прогениторных клеток разных типов [Дергилев и др., 2018]. Также c-Kit⁺ клетки секретируют микроРНК miR-126 и miR-146a, цитокины IL-6 и LIF, ростовые факторы VEGF165, SDF1a и HGF, которые способствуют пролиферации и выживаемости клеток [Rossini et al., 2011; Zakharova et al., 2017].

Таким образом можно сделать вывод, что в данной работе относительное восстановление морфометрических параметров сердца крыс могло происходить вследствие поддержки жизнедеятельности клеток миокарда за счет паракринного взаимодействия между клетками донора и реципиента.

3.4. Оценка эффективности интрамиокардиальной трансплантации клеток на модели острого инфаркта миокарда у крыс

Успех клеточной терапии напрямую зависит от эффективного способа доставки целевых клеток. Даже при интрамиокардиальном введении клеток происходит их диффузия в кровоток и вымывание из органа-мишени. Использование биоразлагаемых матриц для фиксации трансплантированных клеток в сердце может значительно повысить степень их приживляемости и, следовательно, терапевтический эффект [Lee et al., 2011]. Наиболее доступным матрицом является аутологичный фибриновый гель, который может быть получен из крови пациента в течение 15 мин. Кроме того, в фибриновом геле содержится большое количество противовоспалительных и ангиогенных факторов [Cheng et al., 2012].

Оценка жизнеспособности аутологичных клеток, полученных из фрагментов предсердия, после их трансплантации в миокард животного, а также разработка репортерной системы для количественной оценки выживаемости клеток проводилась в ходе эксперимента по интрамиокардиальной трансплантации клеток в фибриновом геле крысам линии WAG/G с искусственно вызванным инфарктом миокарда.

С помощью лентивирусной трансдукции плазмидой pLenti PGK V5-Luc Neo и селекции на устойчивость к генетицину (при которой клетки, не подвергшиеся трансдукции, погибали в течение 7 дней) были получены клетки, экспрессирующие люциферазу (Рисунок 30). Активность люциферазы выявляется исключительно в живых клетках, так как этот фермент взаимодействует со своим субстратом d-люциферин только в присутствии АТФ. Также в случае естественной гибели клетки фермент деградирует, поэтому использование трансгенных клеток, экспрессирующих люциферазу, позволяет провести количественную оценку жизнеспособности клеток после трансплантации.

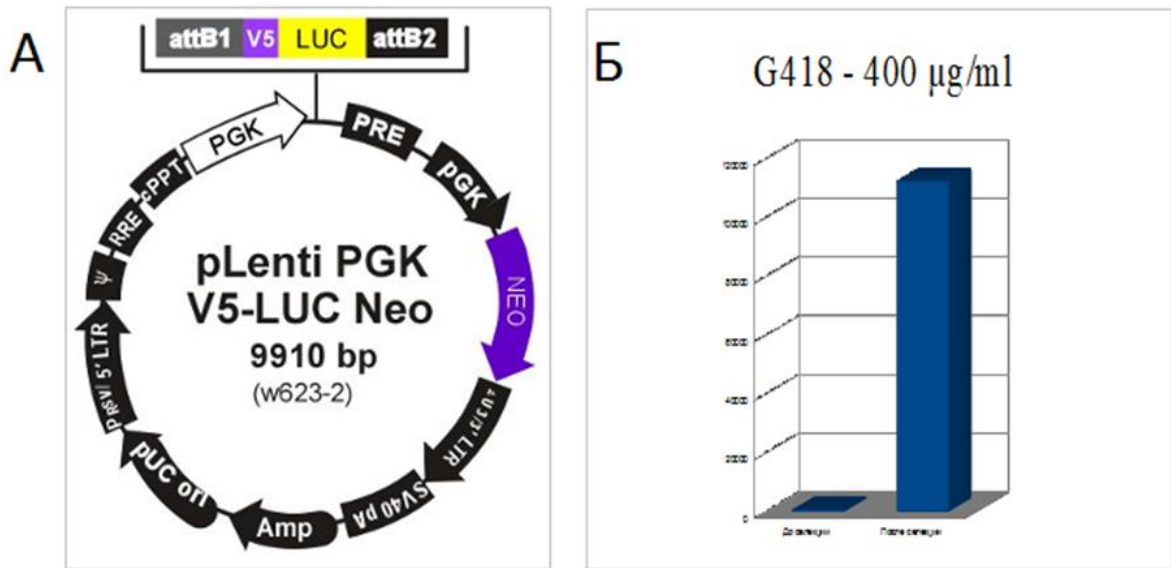


Рисунок 30 – А – схема плазмиды, несущей ген люциферазы и устойчивости к антибиотику генетицину; Б – люминесценция 10000 клеток до и после селекции антибиотиком G419

Для определения зависимости между количеством экспрессирующих люциферазу клеток (Luc⁺) в пробе и регистрируемым люминесцентным сигналом был проведен эксперимент по измерению активности люциферазы трех типов белковых экстрактов: из аликвоты культуры клеток Luc⁺ в культуральной среде DMEM; из аликвоты культуры клеток Luc⁺, смешанной с фибриновым гелем; из аликвоты культуры клеток Luc⁺, инъецированной в составе смеси с фибриновым гелем в изолированное сердце крысы. Для определения зависимости люминесценции белковых экстрактов от количества клеток в образце строили калибровочную кривую в интервале концентрации Luc⁺ клеток $1,0 \times 10^3 - 3,0 \times 10^4$. Таким образом для каждого типа белкового экстракта была показана линейная зависимость между количеством лизированных клеток и регистрируемым свечением (Рисунок 31). Нужно отметить, что значение люминесценции для одинакового количества клеток в разных белковых экстрактах различалось и, скорее всего, было связано с потерями при лизисе клеток.

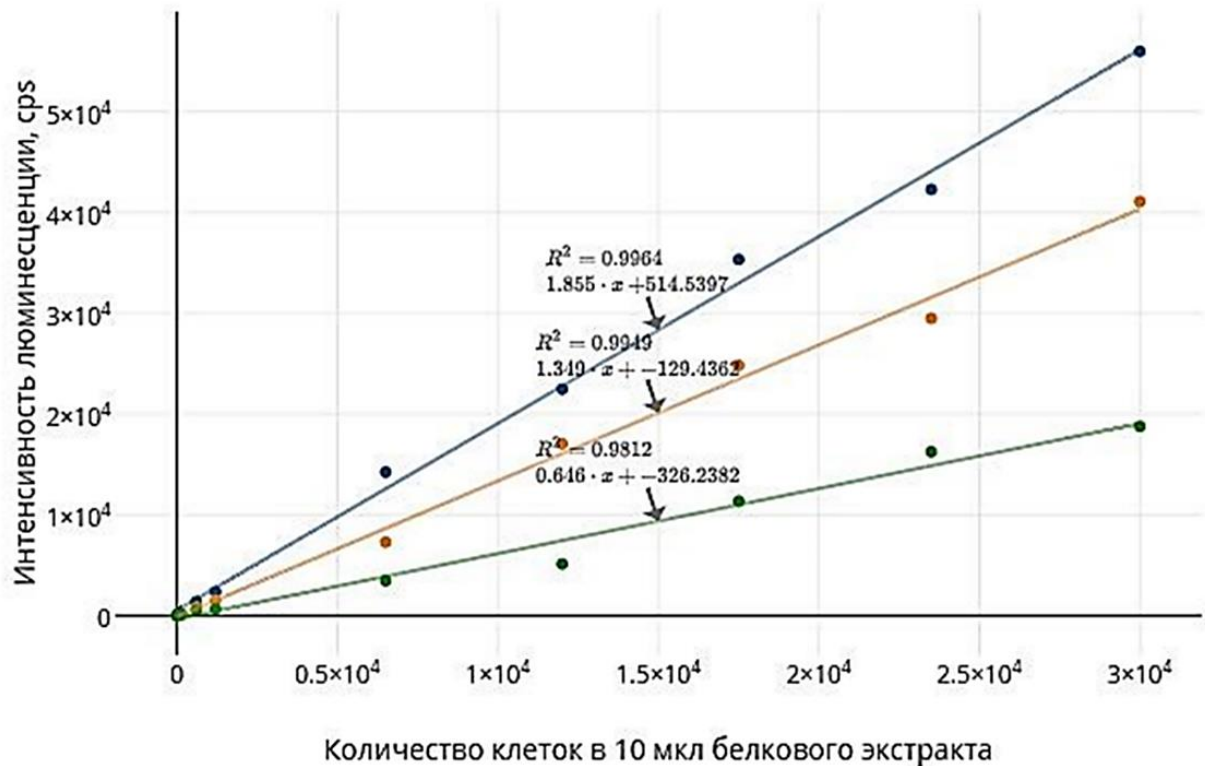


Рисунок 31 – Зависимость люминесценции белкового экстракта от количества клеток в образце: в среде DMEM (синий график), в составе фибринового геля (оранжевый график), в составе миокарда *ex vivo* (зеленый график)

Для количественной оценки эффективности трансплантации аутологичных клеток, полученных из фрагментов предсердия крысы, в периинфарктную зону была проведена серия экспериментов по интрамиокардиальной трансплантации Luc^+ клеток во время операции по моделированию инфаркта миокарда. Интенсивность люминесценции оценивали в 7 временных точках: 1 ч, 48 ч, 72 ч, 5 дней, 8 дней, 10 дней и 14 дней после инъекции. Одной группе животных клетки инъецировали в количестве 10^6 в 100 мкл среды DMEM, второй группе животных - 10^6 клеток в 100 мкл смеси DMEM/фибриновый гель в соотношении 1:1.

Через 48 ч после трансплантации в группе, где клетки вводили в смеси среды DMEM с фибриновым гелем, было зарегистрировано достоверное увеличение значения люминесценции белковых экстрактов почти в 1,5 раза от исходного значения. Наблюдаемое повышение значения люминесценции через

48 ч после трансплантации может быть связано с усилением продукции фермента люциферазы вследствие адаптации клеток в миокарде. Далее в обеих группах происходило снижение значений люминесценции, на 8-й день клетки, введенные в среде DMEM, не определялись, а количество детектируемых клеток, введенных в смеси среды DMEM с фибриновым гелем, составило $7,62 \pm 3,21\%$ от числа клеток в контрольной аликвоте, на 10-й день оно снизилось до $1,63 \pm 0,68\%$. На 14-й день люминесцентный сигнал зарегистрировать не удалось (Рисунок 32).

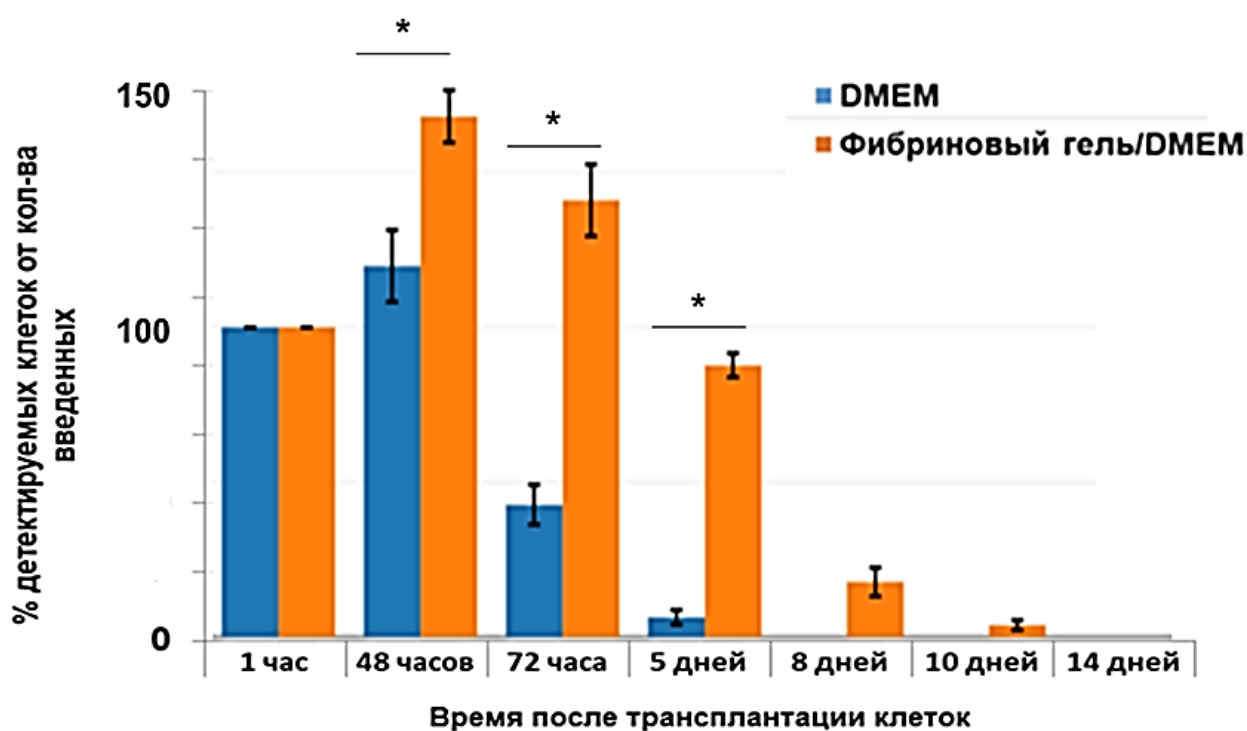


Рисунок 32 – Динамика жизнеспособности кардиальных стромальных клеток крысы в миокарде, трансплантированных в среде DMEM и в смеси DMEM/фибриновый гель (1:1). Приведен процент трансплантированных клеток, обнаруживаемых в миокарде через разные промежутки времени после инъекции, от исходного количества клеток. * – $p < 0,05$

Таким образом, с помощью, созданной люциферазной репортерной системы было показано, что аутологичные клетки предсердия, трансплантируемые интрамиокардиально с использованием фибринового геля в качестве матрикса, сохраняют жизнеспособность и могут быть обнаружены

в течение как минимум 10 дней после трансплантации в периинфарктную зону. Поскольку на 14-й день после интрамиокардиальной инъекции клеток ни в одной из групп люминесценция не определялась, можно сделать вывод, что клеточная культура, полученная из фрагментов предсердия, не обладает способностью к длительной персистенции в миокарде при данных условиях трансплантации, что соответствует наблюдениям других авторов [Terrovitis et al., 2010] и подтверждает механизм эффективности терапии данным типом клеток за счет паракринного эффекта.

3.5. Получение и характеристика кардиомиоцитов из ИПСК человека

Другой подход в восстановлении сердечной ткани при ишемическом поражении заключается в разработке протоколов трансплантации кардиомиоцитов или их предшественников, полученных при дифференцировке ИПСК или ЭСК клеток *in vitro* с целью замещения утраченных клеток миокарда [Kehat et al., 2001; Mauritz et al., 2008; Narazaki et al., 2008; Nakamura and Murry, 2019; Arjmand et al., 2021]. Несмотря на успешные протоколы получения кардиомиоцитов путем дифференцировки стволовых клеток (ИПСК/ЭСК), на сегодняшний день не существует оптимальной технологии формирования и трансплантации функциональной ткани сердца, способной к генерации ритмической активности и синхронным сокращениям, из полученных *in vitro* клеток [Menasche, 2018].

Кардиомиоциты, полученные в результате направленной дифференцировки ИПСК [Lian et al., 2013; Burridge et al., 2014], являются перспективным типом клеток для использования в терапии ИБС. Дифференцированные кардиомиоциты обладают свойствами сократимости, возбудимости, а также отвечают на сигналы симпатической и парасимпатической нервной системы [Burridge et al., 2014; Rojas et al., 2017]. Однако кардиомиоциты, дифференцируемые из ИПСК, функционально незрелые и имеют фетальный фенотип [Funakoshi et al., 2016; Павлова и др.,

2018]. Для ускорения процесса созревания кардиомиоцитов, получаемых из ИПСК, используют технологии создания клеточных пластов, культивирования при стимуляции электрическим током, а также персистенцию *in vivo* [Matsuo et al., 2015; Riegler et al., 2015; Masuda and Shimizu, 2016; Funakoshi et al., 2016; Shadrin et al., 2017; Kolanowski et al., 2017]. Одним из признаков незрелости кардиомиоцитов, полученных из ИПСК, является способность генерировать потенциал действия и спонтанно сокращаться независимо от мембранного механизма автоматии, присущего пейсмейкерным клеткам. Данная способность обусловлена стохастическими процессами кальциевого обмена в клетке, приводящими к осцилляции ионов кальция в цитоплазме [Yaniv et al., 2012; Zhang et al., 2015; Morad and Zhang, 2017].

В экспериментах использовалась линия ИПСК здорового человека iMA1L, полученная в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН после репрограммирования эмбриональных фибробластов линии MAN1 [Grigor'eva et al., 2018]. Протокол дифференцировки ИПСК в кардиальном направлении заключался в активации сигнального пути Wnt для формирования мезодермальных предшественников и терминальной дифференцировки в кардиомиоциты при последующем ингибировании пути Wnt [Lian et al., 2013; Burrige et al., 2014]. На 8–14-й дни направленной дифференцировки в клеточной культуре появлялись спонтанно сокращающиеся участки, в дальнейшем число сокращающихся участков и интенсивность сокращений увеличивались. Общий вид полученной культуры представлен на Рисунке 33.

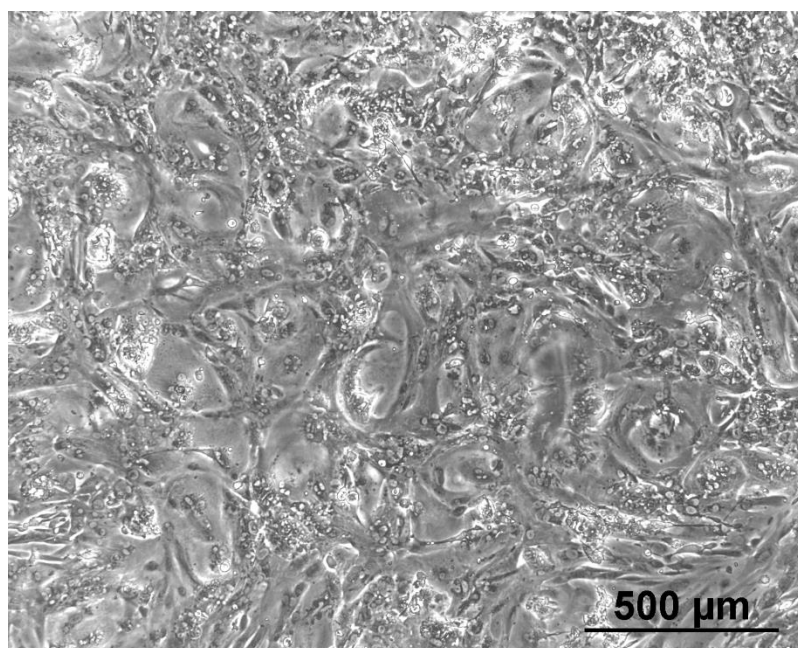


Рисунок 33 – Кардиомиоциты, полученные в результате направленной дифференцировки ИПСК человека линии iMA1L (20-й день). Фазовый контраст. Шкала – 500 мкм

После проведения метаболической селекции с использованием среды, содержащей лактат вместо глюкозы, количество кардиомиоцитов в популяции дифференцированных клеток по результатам анализа методом проточной цитофлуориметрии с помощью антител к SIRPa (CD172a - маркер дифференцированных из ИПСК кардиомиоцитов [Dubois et al., 2011]) составляло 98,6% на 21-й день дифференцировки (Рисунок 34).

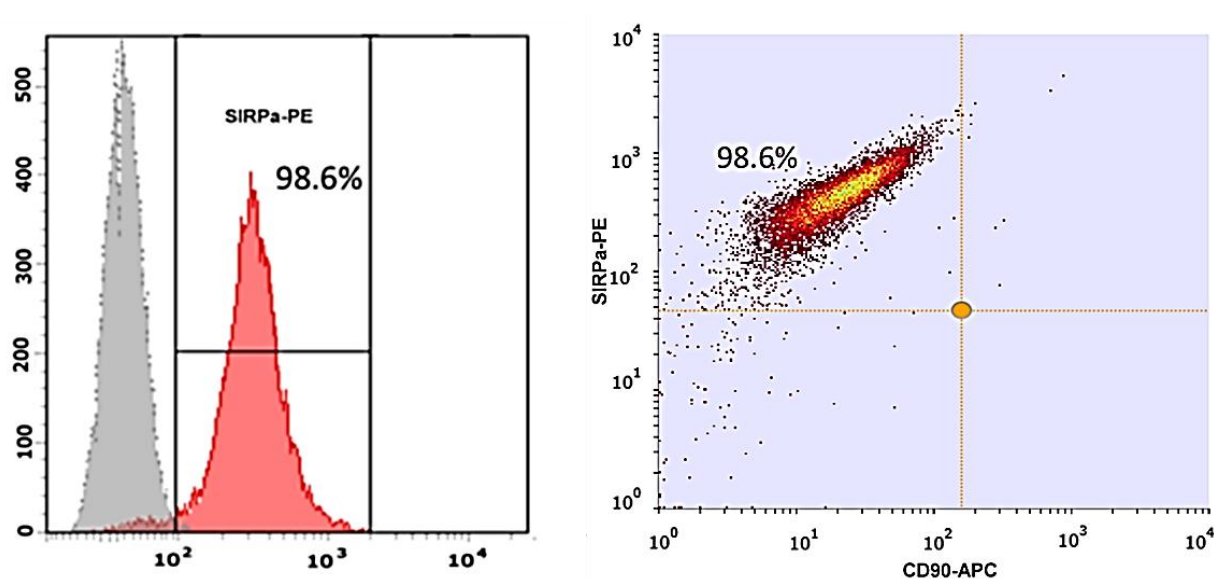


Рисунок 34 – Характеристика полученных в ходе направленной дифференцировки ИПСК человека кардиомиоцитов после метаболической селекции методом проточной цитофлуориметрии с помощью антител к белку SIRPa

Иммунофлюоресцентный анализ полученной культуры на 25-й день дифференцировки выявил присутствие клеток, экспрессирующих сократительные белки кардиомиоцитов TnT и MLC2 (маркер вентрикулярных кардиомиоцитов), а также транскрипционный фактор Nkx2.5 и субъединицу потенциал-зависимого калиевого канала HCN4 (маркер пейсмейкерных кардиомиоцитов) (Рисунок 35). Кардиомиоциты HCN4+ являются отрицательными по маркеру Nkx2.5, поскольку дифференцировка в сократительные или пейсмейкерные кардиомиоциты определяется соответственно парой антагонистичных транскрипционных факторов Nkx2.5 и Shox2, конкурирующих за связывание с общими регуляторными сайтами ДНК [Ye et al., 2015; van Weerd and Christoffels, 2016; Protze et al., 2017].

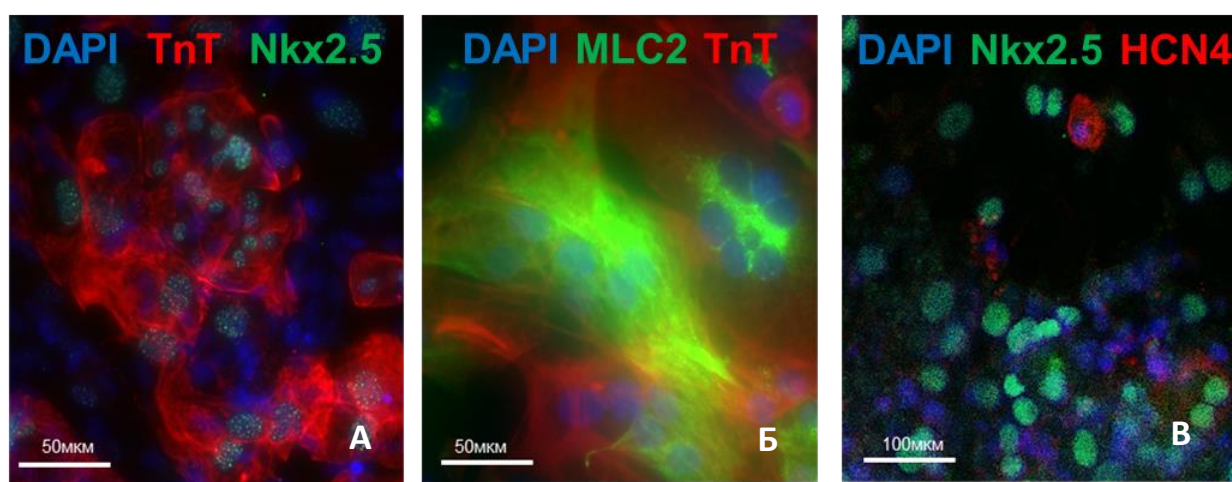


Рисунок 35 – Характеристика клеток, полученных в ходе направленной дифференцировки ИПСК человека, с помощью иммунофлюоресцентного окрашивания антителами к маркерам кардиомиоцитов: А – TnT (красный), Nkx2.5 (зеленый); Б – TnT (красный), MLC2 (зеленый); В – HCN4 (красный), Nkx2.5 (зеленый). Ядра окрашены DAPI (синий). Шкала – 50 мкм (А, Б), 100 мкм (В)

Электрофизиологические показатели кардиомиоцитов регистрировали на 60–75-й дни культивирования на отдельных спонтанно сокращающихся клетках методом локальной фиксации потенциала. В полученной культуре были выявлены клетки с электрофизиологическими фенотипами вентрикулярных, атриальных, а также пейсмейкерных кардиомиоцитов (Рисунок 36).

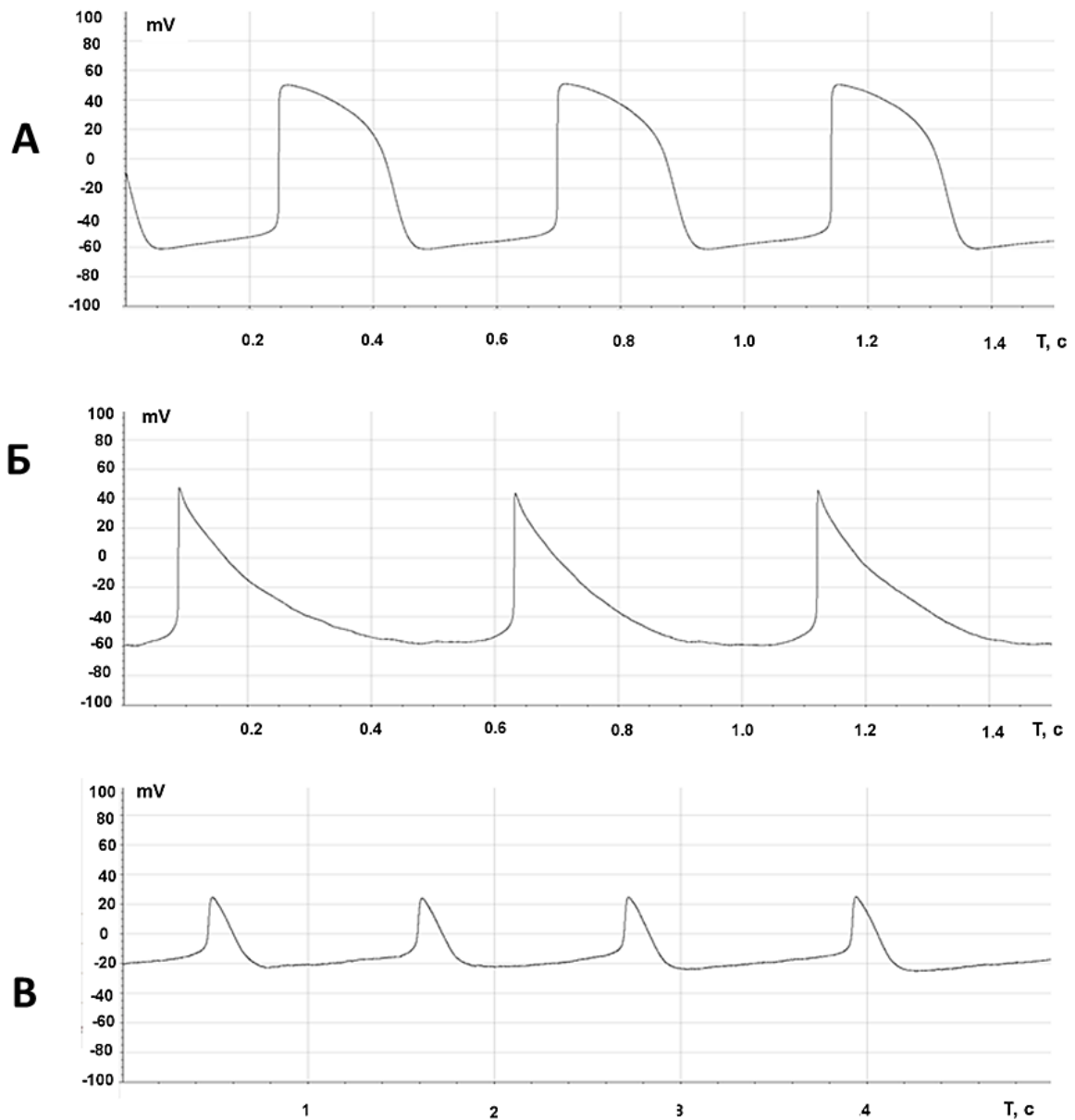


Рисунок 36 – Электрофизиологическая характеристика кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК человека: А – ventрикулярные кардиомиоциты; Б – атриальные кардиомиоциты; В – пейсмекерные кардиомиоциты

Разделение осуществлялось на основании соотношения длительности фазы реполяризации потенциала действия (APD) до 50% и до 90% восстановления диастолического потенциала. Сократительные типы клеток характеризовались большими значениями диастолического потенциала, а также более высокой протяжённостью 2-й и 3-ей фаз реполяризации соответственно, в то время как для пейсмекерных клеток была характерна выраженная фаза медленной диастолической деполяризации (Таблица 6) [Павлова и др., 2018].

Таблица 6 – Электрофизиологическая характеристика кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК человека

| Тип клеток | Число клеток | Пиковое значение овершута | Максимальный диастолический потенциал | APD90/ APD50 |
|------------|--------------|---------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| Ventr | 9 | 34 mV | -48 mV | 1,5 |
| Atr | 4 | 38 mV | -58 mV | 1,9 |
| Nod | 3 | 26 mV | -20 mV | 1,4 |

Ventr - вентрикулярные кардиомиоциты, Atr - атриальные кардиомиоциты, Nod - пейсмейкерные кардиомиоциты

Таким образом, при направленной дифференцировке ИПСК человека в кардиомиоциты были получены клетки, демонстрирующие спонтанную сократительную активность и экспрессирующие основные маркеры вентрикулярных, атриальных и пейсмейкерных кардиомиоцитов. Для того чтобы удалить из полученной культуры недифференцировавшиеся в нужном направлении клетки, проводили метаболическую селекцию в среде, содержащей лактат вместо глюкозы, который может быть метаболизирован только кардиомиоцитами – остальные клетки в отсутствие глюкозы погибали.

3.6. Трансплантация кардиомиоцитов, полученных в ходе направленной дифференцировки ИПСК человека, в организм иммунодефицитных мышей.

Полученные в ходе направленной дифференцировки ИПСК человека кардиомиоциты (иКМ) с целью изучения выживаемости и сохранения функциональной активности *in vivo* трансплантировали ортотопическим (интрамиокардиально) и гетеротопическим (под кожу и под фиброзную капсулу почки) способами в организм иммунодефицитных мышей линии

SCID. Мыши SCID имеют синдром тяжелого комбинированного иммунодефицита в результате мутации в генах RAG, ответственных за перегруппировку генов иммуноглобулинов и T-клеточного рецептора. В связи со сниженной реакцией отторжения ксеноматериала мышей SCID традиционно применяют в качестве одного из модельных объектов для трансплантации образцов тканей других биологических видов, в том числе человека [Renz et al., 1996; Okada et al., 2019].

Для экспериментов по интрамиокардиальной трансплантации использовали иКМ после метаболической селекции на 20–24-й день после начала дифференцировки. В качестве биосовместимого носителя для повышения приживаемости и сохранения электрофизиологической активности трансплантированных клеток в организме лабораторных животных использовали MatrigelTM (смесь компонентов внеклеточного матрикса). В ходе экспериментальной операции иКМ вводили в миокард мышей SCID инъекционным методом в составе смеси MatrigelTM/среда RPMI, контрольным животным вводили смесь MatrigelTM/среда RPMI без клеток. Через 5 недель после интрамиокардиальной трансплантации клеток животным проводили ЭКГ исследование, которое не выявило наличие эктопической электрической активности ни в одной из групп.

Иммунофлюоресцентный анализ криосрезов сердца экспериментальных животных с помощью антител к HNA (человеческий ядерный антиген) и SIRPa (маркер дифференцированных из ИПСК кардиомиоцитов) показал наличие иКМ человека в миокарде мыши через 5 недель после трансплантации (Рисунок 37). При окрашивании аналогичных препаратов сердца гематоксилин-эозином в параинъекционной зоне среди структур миокарда были выявлены участки развития соединительной ткани, при этом признаки активного воспалительного процесса, как и прямые признаки неоангиогенеза отсутствовали (Рисунок 37).

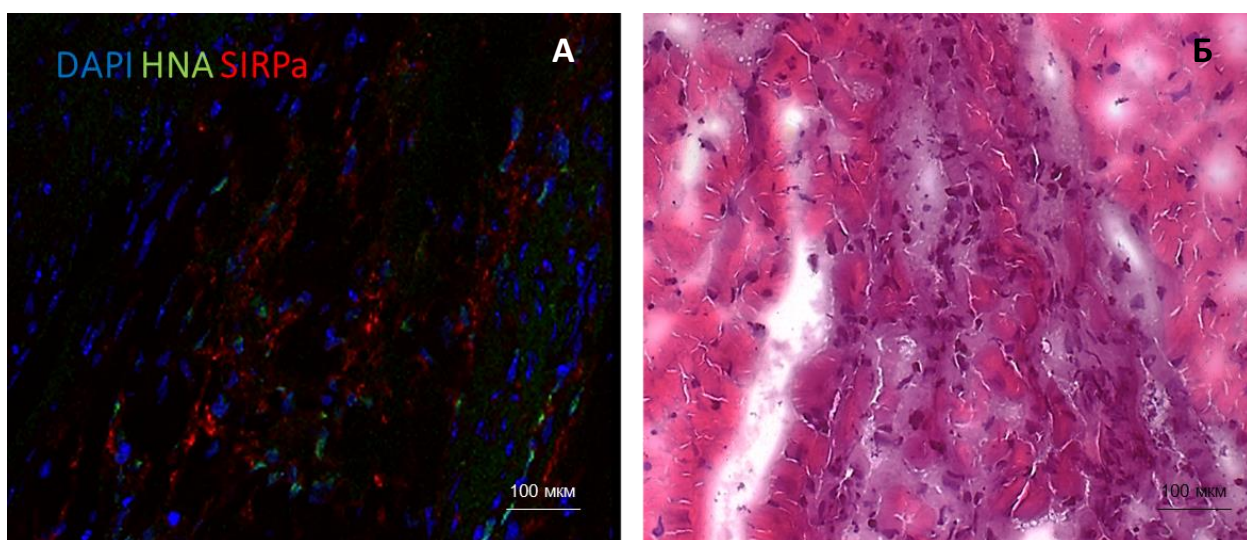


Рисунок 37 – Гистологические препараты миокарда мышей линии SCID с трансплантированными кардиомиоцитами человека: А – иммунофлюоресцентное окрашивание антителами к HNA (зеленый) и SIRPa (красный), ядра окрашены DAPI (синий); Б – окрашивание гематоксилин-эозином. Шкала – 100 мкм

Несмотря на то, что получилось показать присутствие иКМ человека в сердце иммунодефицитной мыши в течение по крайней мере 5 недель после инъекции в сердце, данный способ введения оказался неудобен для оценки функциональной активности трансплантированных клеток, поскольку введенные иКМ оказываются окружены фиброзными клетками, что препятствует развитию полноценных межклеточных контактов. В связи с этим на следующем этапе работы были выбраны подкожный и почечный субкапсулярный способы трансплантации, которые используются в экспериментальных исследованиях в связи с относительной доступностью места введения и простотой проведения хирургической процедуры [Merani et al., 2008; van der Windt et al., 2008]. К тому же с помощью этих методов в организм мыши можно ввести большее количество клеток в составе биосовместимого носителя или клеточных пластов по сравнению с интрамиокардиальной инъекцией.

Для оценки сохранения функциональной активности иКМ человека *in vivo* был использован метод введения в составе подкожного матригельного трансплантата, который в настоящее время широко используется для изучения ангиогенных свойств *in vivo* [Roedersheimer et al., 2011; Rahbarghazi et al., 2013;

Szade et al., 2016]. Кардиомиоциты инъецировали под кожу мышам линии SCID в составе матригельного трансплантата (Рисунок 38). После выведения животных из эксперимента трансплантаты вынимали, половину использовали для приготовления гистологических препаратов и проведения иммунофлуоресцентного анализа, другую половину использовали для проведения оптического картирования потоков ионов кальция в клетках. Для контроля использовали иКМ, культивировавшиеся на пластике в слое Matrigel™ при 37°C и содержании CO₂ в атмосфере 5% в течение всего эксперимента.

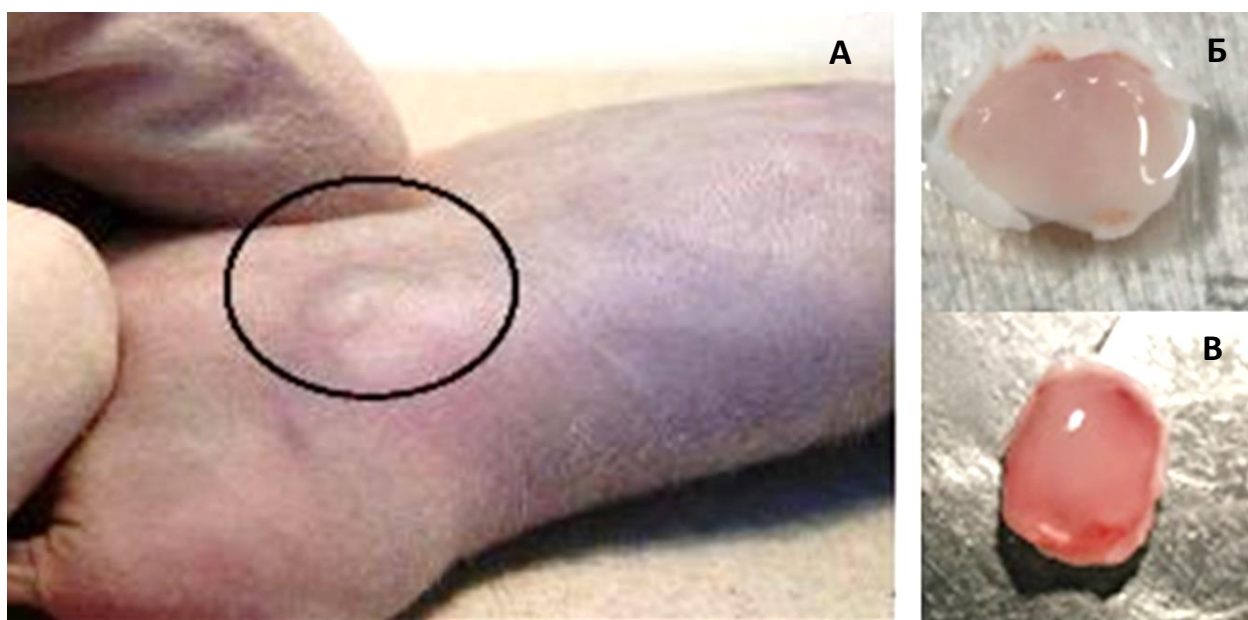


Рисунок 38 – А – мышь линии SCID с подкожным матригельным трансплантатом; Б, В – извлеченные матригельные трансплантаты после 28 дней наблюдения

Методом иммунофлуоресцентного окрашивания с помощью антител к α SA (саркомерному α -актину), SIRPa, Nkx2.5, HNA была показана сохранность иКМ человека в подкожных матригельных трансплантатах после их извлечения из организма животного (Рисунок 39). Также на препаратах были выявлены клетки, негативные по маркерам кардиомиоцитов и HNA (человеческому ядерному антигену), которые могли мигрировать из окружающих тканей мышцы.

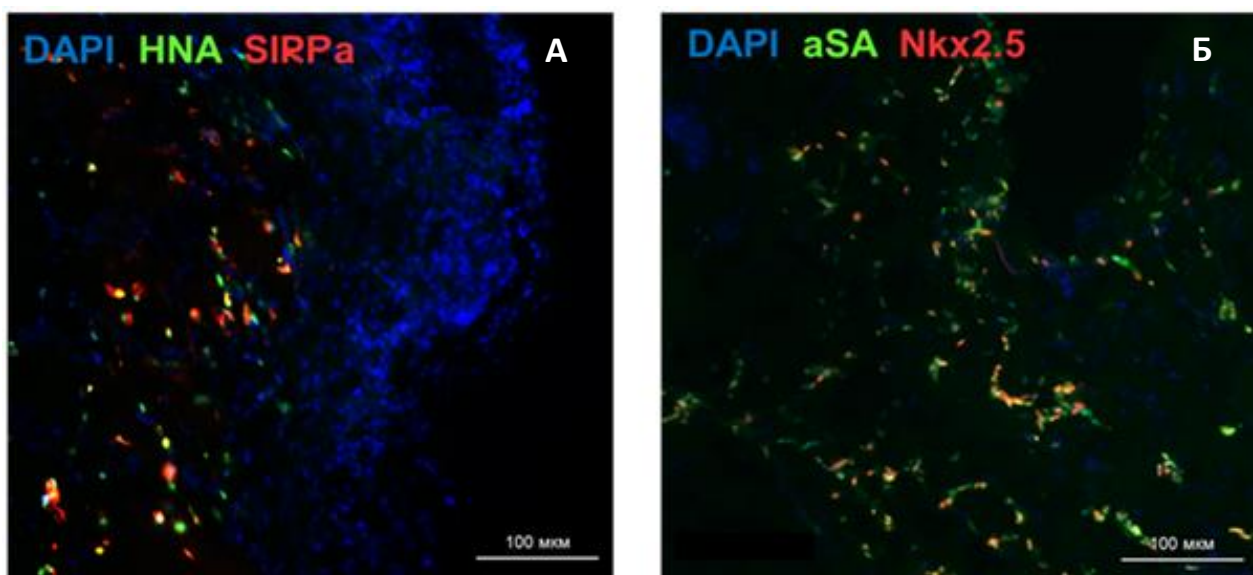


Рисунок 39 – Иммунофлюоресцентное окрашивание криосрезов подкожных матригельных трансплантатов на 28-й день после культивирования *in vivo*: А – SIRPa (красный), HNA (зеленый); Б – Nkx2.5 (красный), aSA (зеленый). Ядра окрашены DAPI (синий). Шкала – 100 мкм

Из литературы известно, что в составе матригельных трансплантатов после культивирования *in vivo* присутствуют фибробласты, эндотелиальные клетки и перициты животного-реципиента, принимающие участие в формировании микрокапилляров [Kermani et al., 2005; Zakharova et al., 2017]. Исходя из этих данных, дополнительно была проведена оценка васкуляризации подкожных матригельных трансплантатов, извлеченных из экспериментальных животных. Методом иммунофлюоресцентного окрашивания aSMA⁺ клетки были выявлены в слое стромальных клеток мышцы, сформированным вокруг трансплантата, а также в составе капилляров, которые присутствуют в этом слое начиная с 14-го дня. Методом связывания изолектина В4 были обнаружены отдельные позитивно окрашенные клетки во внутренних участках матригельного трансплантата (Рисунок 40).

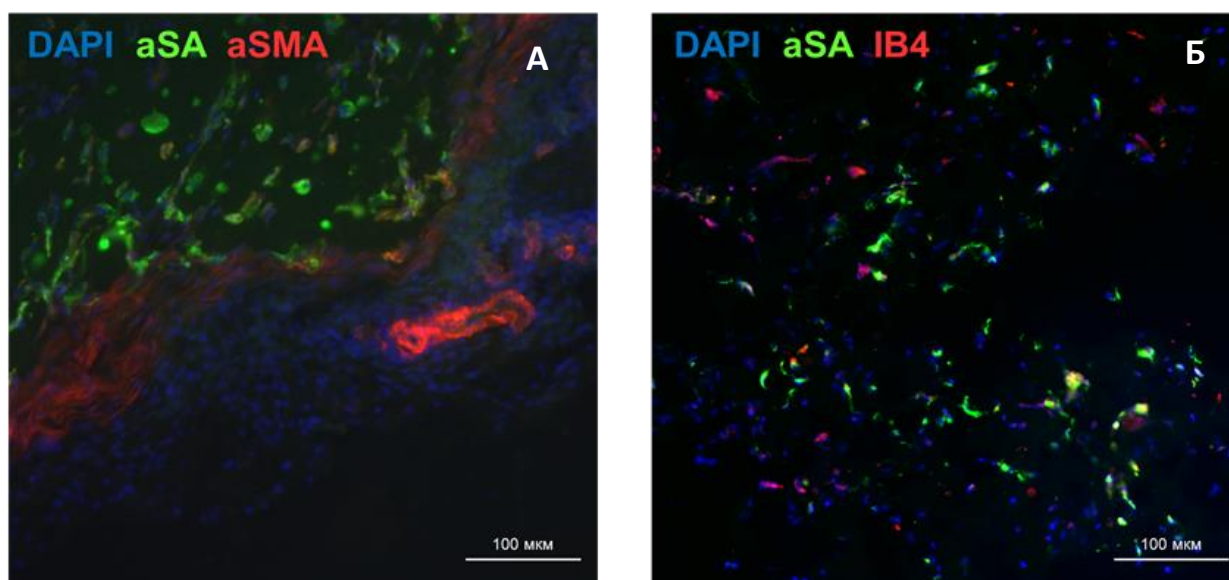


Рисунок 40 – Иммунофлюоресцентное окрашивание криосрезов подкожных матригельных трансплантатов на 28-й день после культивирования *in vivo*: А – aSMA (красный), aSA (зеленый); Б – изолектин В4 (красный), aSA (зеленый). Ядра окрашены DAPI (синий). Шкала – 100 мкм

При проведении оптического картирования потоков ионов кальция спонтанное регулярное изменение свечения Fluo8 было обнаружено в каждом образце культивировавшихся *in vivo* матригельных трансплантатов, однако количество таких областей было представлено единичными случаями. В контрольных образцах иКМ, культивировавшихся *in vitro* в слое матригеля, клетки, демонстрирующие изменение потоков кальция, выявлялись по всему образцу. После обработки результатов оптического картирования в программе ImageJ были построены графики изменения интенсивности свечения от времени для экспериментальных и контрольных образцов, которые оказались похожими по своей форме, высоте и частоте пиков, что свидетельствует о сходной динамике изменения потоков ионов кальция в иКМ при культивировании *in vitro* и *in vivo* в составе матригельных трансплантатов (Рисунок 41).

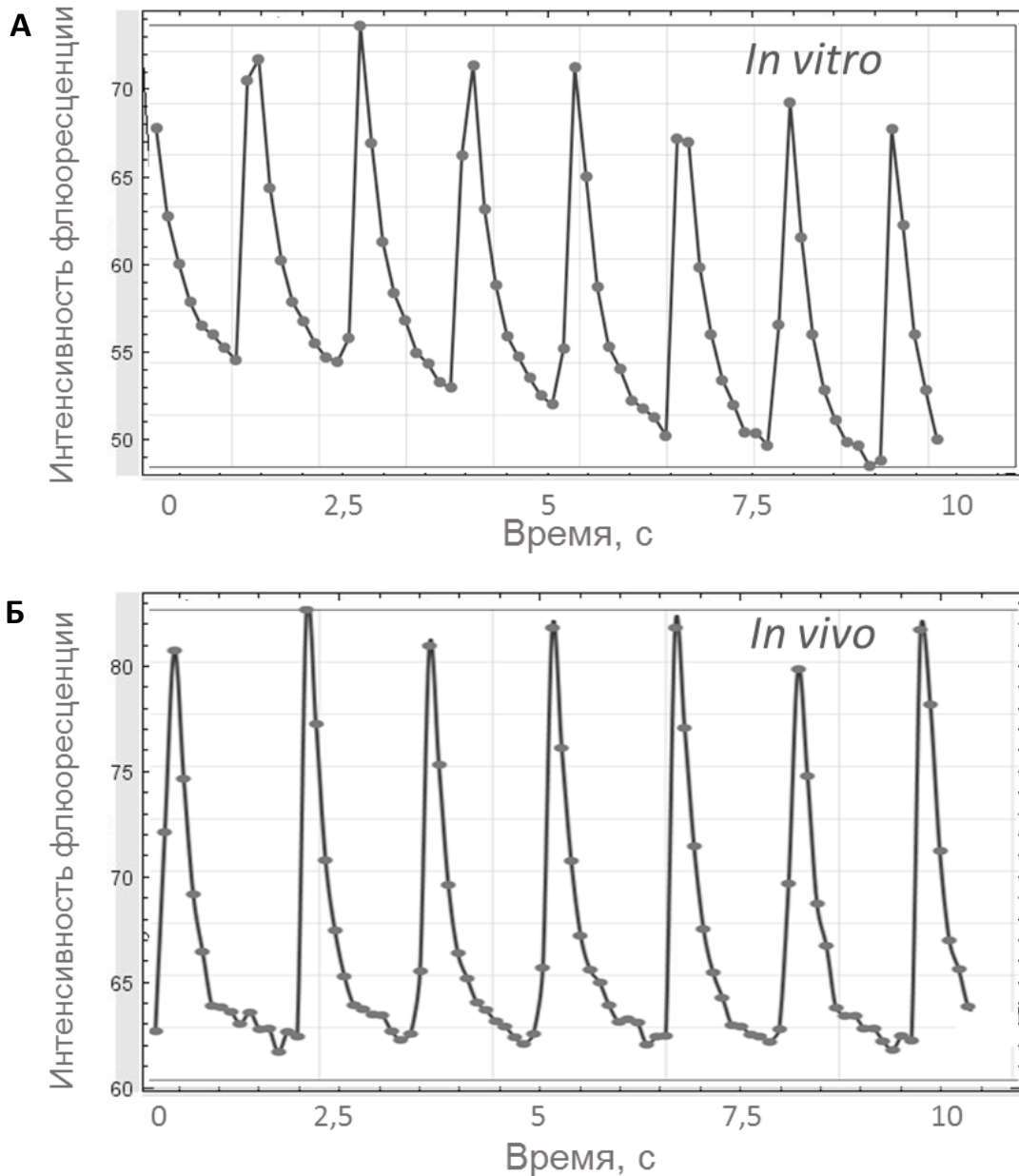


Рисунок 41 – Результаты оптического картирования потоков ионов кальция:
 А – Кардиомиоциты, культивировавшиеся 28 дней *in vitro* в слое Matrigel™;
 Б – Кардиомиоциты, культивировавшиеся 28 дней *in vivo* в составе подкожного матригельного трансплантата.
 По вертикали расположена интенсивность кальций-зависимого красителя Fluo8 в условных единицах, по горизонтали – время в секундах

Таким образом было показано, что подкожный матригельный трансплантат может быть удобной системой для исследования функциональных особенностей иКМ *in vivo*. При подкожном введении в составе матригельного трансплантата кардиомиоциты выживают как минимум 4 недели, что согласуется с литературными данными по выживаемости иКМ

после интрамиокардиальной трансплантации [Riegler et al., 2015; Eng et al., 2016; Li et al., 2017]. Несмотря на хорошую выживаемость, лишь малая часть кардиомиоцитов оказалась способной к спонтанной осцилляции кальция после культивирования *in vivo*. Возможно, это связано с техническими особенностями формирования матригельного трансплантата, плотность кардиомиоцитов в котором получается низкой и клетки представлены индивидуально или группами по несколько штук, что приводит к невозможности образовывать межклеточные контакты и формировать функциональные связи.

С целью сохранения контактов между трансплантированными клетками могут применяться различные подходы, основанные на введении клеток в составе функциональных пластов, сформированных клетками и внеклеточным или экзогенным матриксом [Chong and Murry, 2014; Matsuo et al., 2015; Riegler et al., 2015; Masuda and Shimizu, 2016; Funakoshi et al., 2016; Shadrin et al., 2017].

Для изучения структурных и функциональных особенностей пластов кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека (иКМ), после трансплантации в организм иммунодефицитных мышей был проведен эксперимент по введению клеточных пластов иКМ под фиброзную капсулу почки мыши. Спонтанно сокращающиеся кардиомиоциты человека, дифференцированные из ИПСК, рассаживали в плотности 250000 клеток на 1 см² на термочувствительный пластик. Сформированные функциональные пласты открепляли от пластика при комнатной температуре и вводили под фиброзную капсулу почки мыши линии SCID с помощью автоматической пипетки и обрезанного пластикового наконечника на 200 мкл. После выведения животных из эксперимента трансплантат препарировали от фиброзной капсулы и тела почки (Рисунок 42).

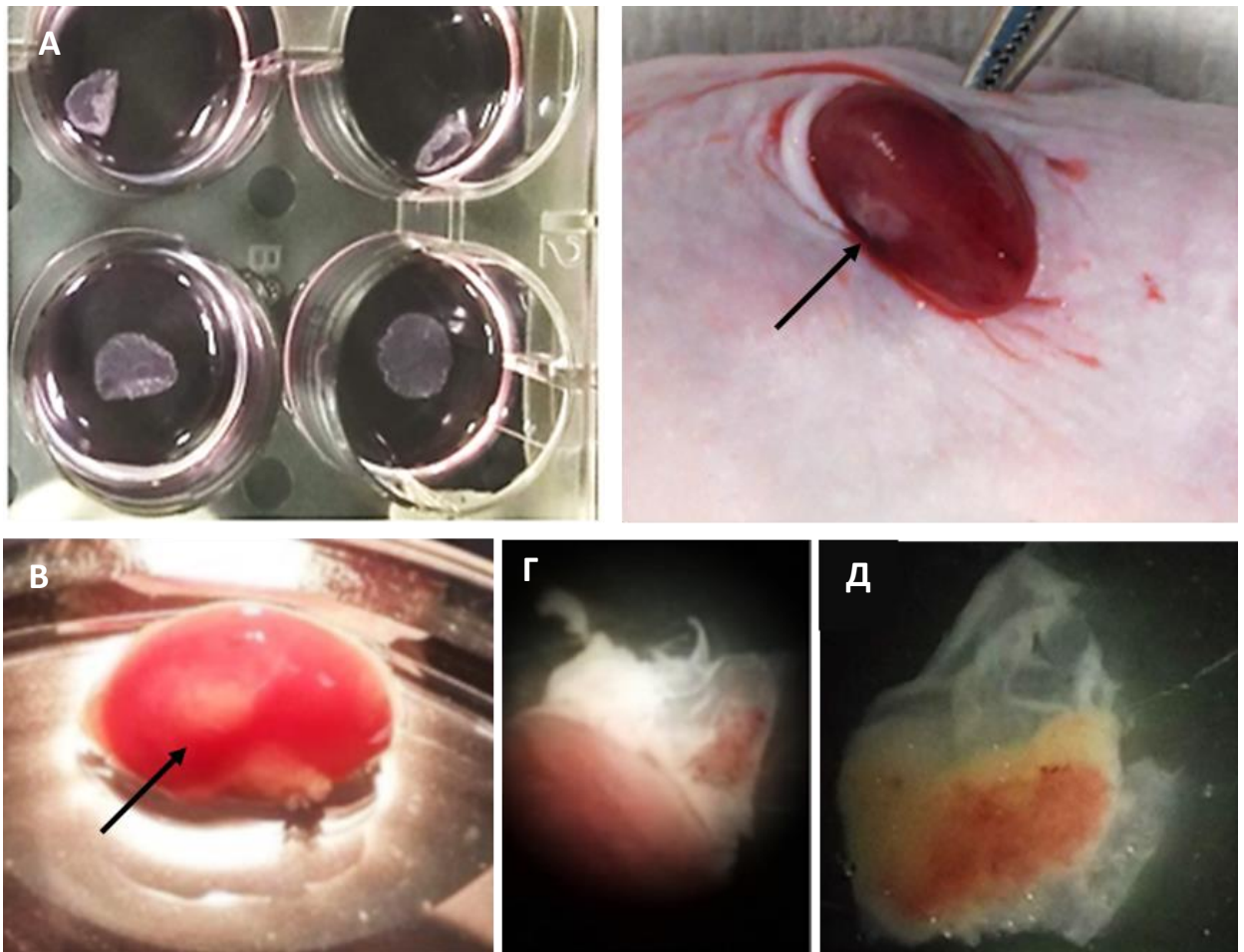


Рисунок 42 – Формирование пластов кардиомиоцитов человека и трансплантация под фиброзную капсулу почки мышей линии SCID. А – Пласты кардиомиоцитов; Б – Введение пласта кардиомиоцитов под капсулу почки; В – общий вид почки с трансплантатом через 42 дня; Г, Д – Препарирование трансплантата от фиброзной капсулы

Половину трансплантата забирали для проведения гистологических исследований, а другую половину культивировали *ex vivo* минимум 3 дня при 37°C и содержании CO₂ в атмосфере 5% для проведения оптического картирования потоков ионов кальция в образце. При проведении оптического картирования у всех образцов выявлялась осцилляция потоков ионов кальция (Рисунок 43), у части образцов наблюдались спонтанные согласованные сокращения клеточного слоя.

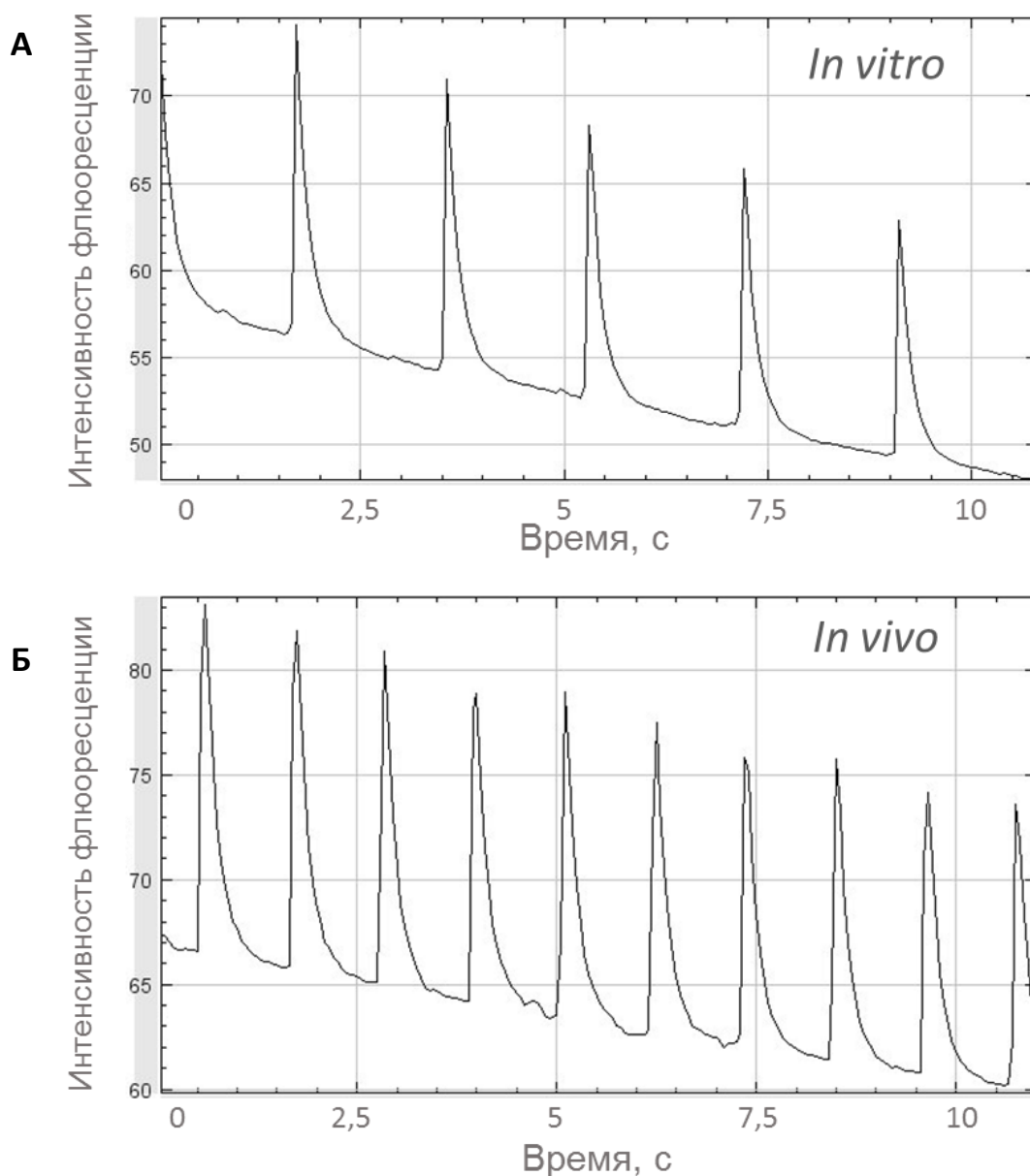


Рисунок 43 – Результаты оптического картирования потоков ионов кальция:
 А – Клеточные пласты кардиомиоцитов, культивировавшиеся 42 дня *in vitro*;
 Б – Клеточные пласты кардиомиоцитов, культивировавшиеся 42 дня *in vivo* под фиброзной капсулой почки.
 По вертикали расположена интенсивность кальций-зависимого красителя Fluo8 в условных единицах, по горизонтали – время в секундах

Окрашивание препаратов криосрезов пластов иКМ, извлеченных из-под капсулы почки, антителами к человеческому ядерному антигену HNA, саркомерному актину (α SA), транскрипционному фактору кардиомиоцитов Nkx2.5 свидетельствует, что данная ткань образована кардиомиоцитами человека, которые сохраняются в организме мышей линии SCID в течение всего срока эксперимента, также на препаратах выявлялись CD31+ капилляры

мышинного происхождения (Рисунок 44). Клетки из извлеченных из-под капсулы почки мышцы трансплантатов имеют вытянутую форму и упорядоченную саркомерную организацию, напоминающую структуру кардиомиоцита в составе миокарда, в отличие от клеток в контрольных образцах (клеточные пласты, культивированные *in vitro* при 37°C и содержании CO₂ в атмосфере 5% в течение всего эксперимента).

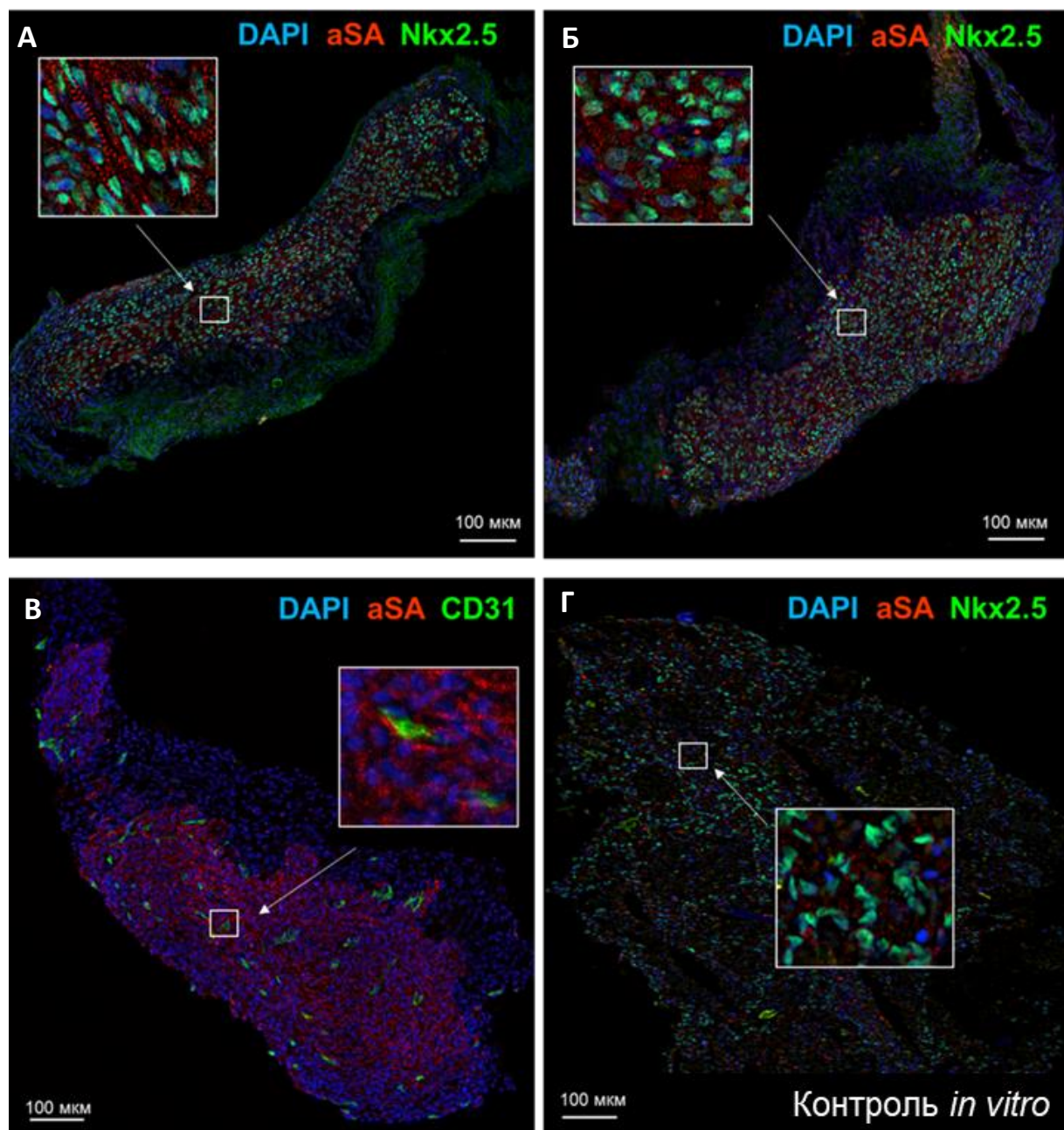


Рисунок 44 – Иммунофлюоресцентное окрашивание криосрезов клеточных пластов кардиомиоцитов, препарированных из-под капсулы почки на 42 день: А, Б – aSA (красный), Nkx2.5 (зеленый); В – aSA (красный), CD31 (зеленый); Г – контроль (клеточные пласты кардиомиоцитов, культивированные *in vitro*): aSA (красный), Nkx2.5 (зеленый). Ядра окрашены DAPI (синий). Шкала – 100 мкм

Для оценки изменений ультраструктуры иКМ после культивирования *in vivo* в организме иммунодефицитной мыши несколько экспериментальных и контрольных образцов были исследованы методом электронной микроскопии.

На Рисунке 45 представлены электронограммы контрольных образцов клеточных пластов иКМ, культивировавшихся *in vitro*.

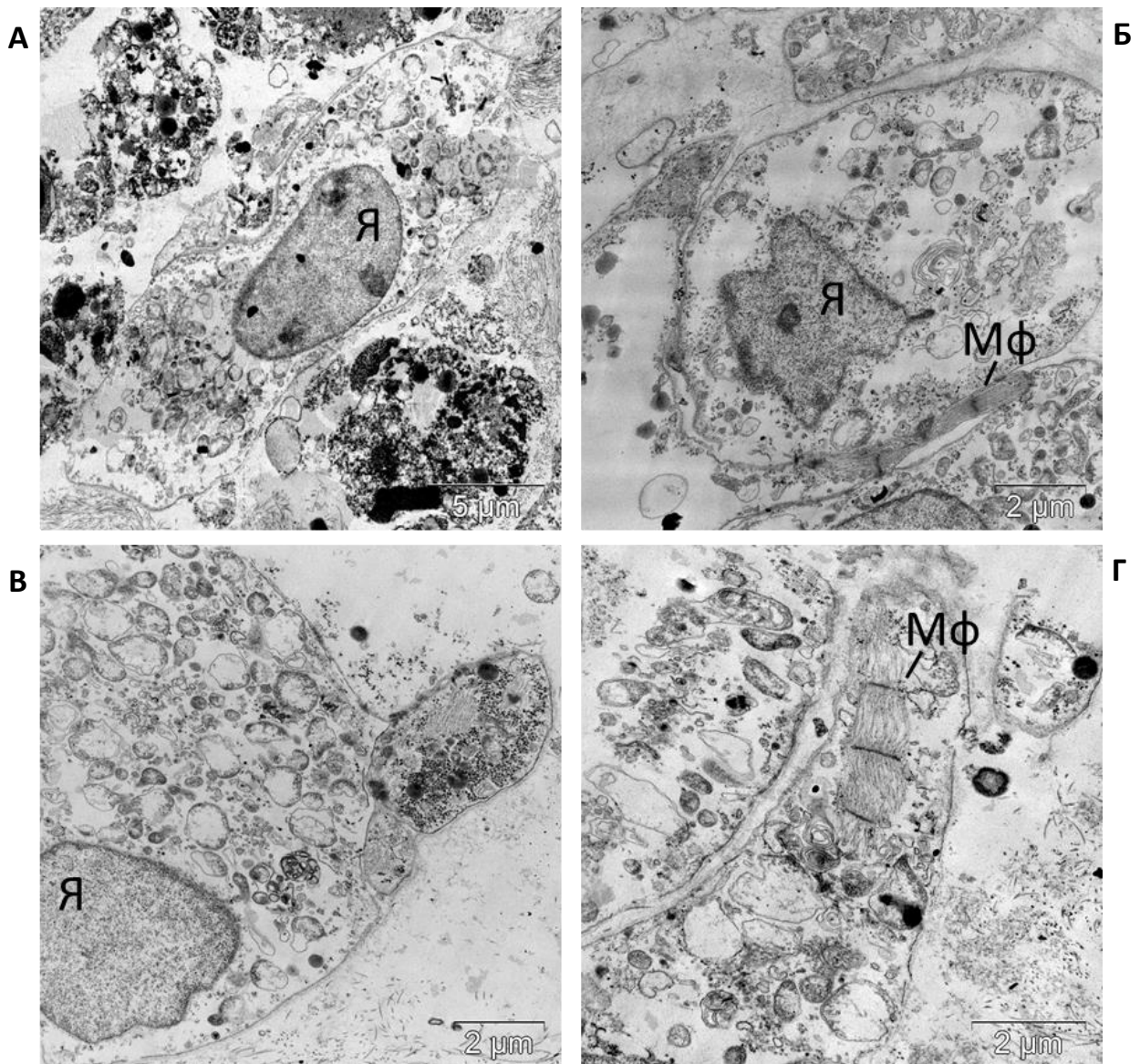


Рисунок 45 – Просвечивающая электронная микроскопия. Клеточные пласты кардиомиоцитов, культивировавшиеся 42 дня *in vitro*. Я – ядро, Мф – миофибриллы. Шкала – 5 мкм (А), 2 мкм (Б, В, Г)

На Рисунке 46 представлены электронограммы образцов клеточных пластов иКМ, культивировавшихся *in vivo* под фиброзной капсулой почки иммунодефицитной мыши.

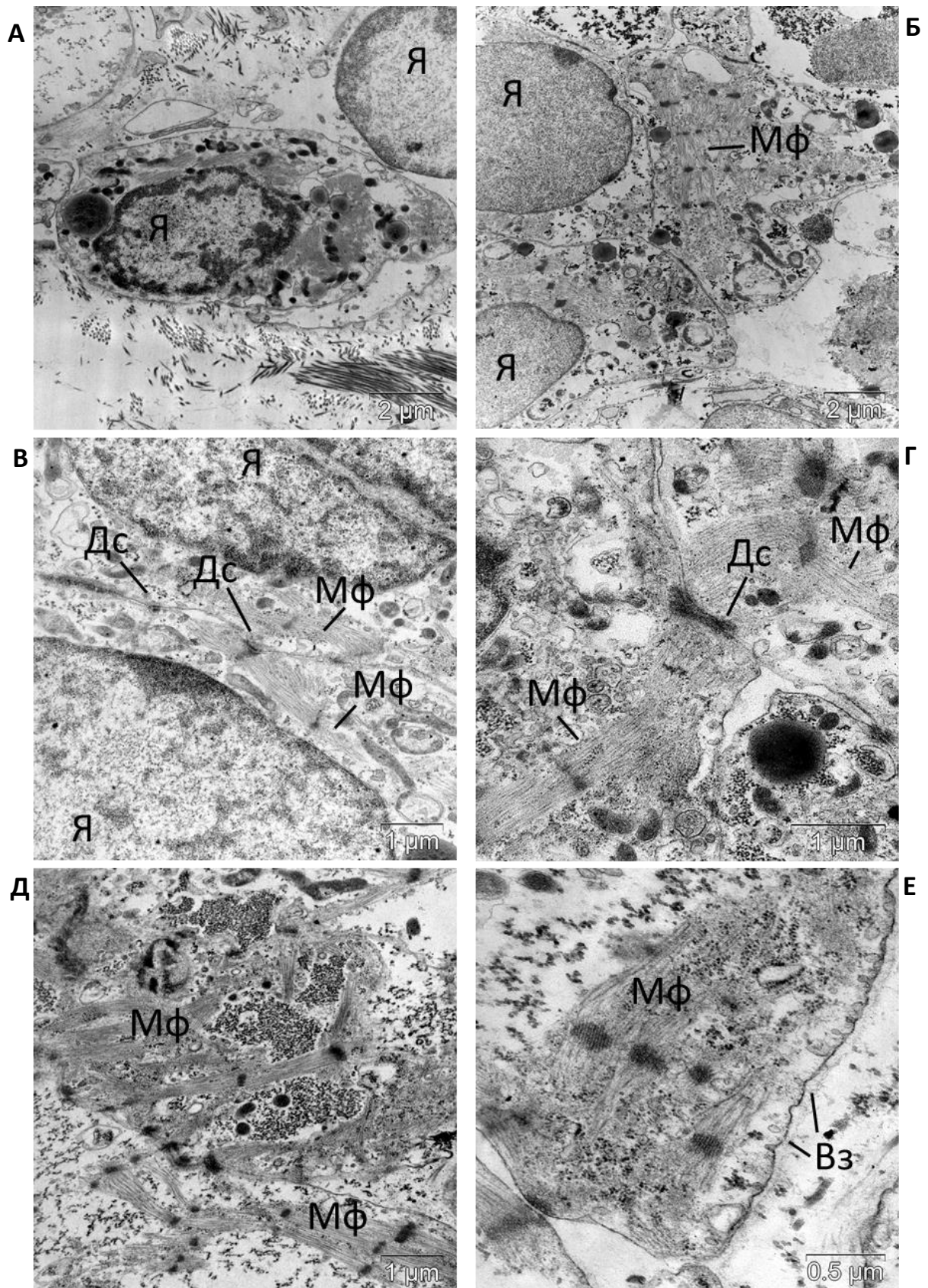


Рисунок 46 – Просвечивающая электронная микроскопия. Клеточные пласты кардиомиоцитов, культивировавшиеся 42 дня *in vivo* под фиброзной капсулой почки мыши. Я – ядро, Мф – миофибриллы, Дс – десмосомы, Вз – везикулы. Шкала – 2 мкм (А, Б), 1 мкм (В, Г, Д), 0,5 мкм (Е)

Кардиомиоциты из контрольных образцов в большинстве случаев представляли собой клетки без выраженных фенотипических признаков зрелого кардиомиоцита. Клетки имели, как правило, округлую форму и ядро с неконденсированным хроматином. В единичных случаях отмечалось формирование миофибрилл, имеющих саркомерное строение, но упаковка волокон в них оставалась неплотной. Кардиомиоциты располагались изолированно друг от друга и не образовывали функциональных контактов.

В клеточных пластах, извлеченных из-под капсулы почки, ультраструктура кардиомиоцитов заметно отличалась от контроля. Клетки располагались более плотно, кроме того, поперечные участки выступов отдельных клеток соединялись друг с другом посредством десмосом. Клеточные ядра имели более плотную конденсацию хроматина. В клетках было обнаружено значительно большее количество поперечно исчерченных миофибрилл, имеющих саркомерное строение с упорядоченными миофиламентами. На части препаратов была отмечена тенденция к параллельному выстраиванию миофибрилл в клетке. Также в клетках, культивировавшихся *in vivo*, отмечалось активное образование везикул в цитоплазме, в то время как в контрольных образцах везикул практически не было. Данные признаки свидетельствуют о процессе созревания клеток и началу перехода от фетального фенотипа к фенотипу зрелого кардиомиоцита [Funakoshi et al., 2016].

Таким образом было показано, что при трансплантации кардиомиоцитов в составе функционального клеточного пласта, способность к координированному сокращению сохраняется после персистенции в организме мыши как минимум 6 недель. Также было показано, что в процессе нахождения в условиях живого организма кардиомиоциты, полученные из ИПСК человека, приобретают более организованную саркомерную структуру сократительного аппарата (по сравнению с контрольными кардиомиоцитами, культивировавшимися *in vitro*). Однако при трансплантации кардиомиоцитов в составе различных матриц или тканеинженерных конструкций с целью

компенсации сократительных элементов может наблюдаться недостаточная васкуляризация в области введения, поэтому наиболее перспективным подходом для клеточной терапии ИБС может быть разработка протоколов совместной трансплантации кардиомиоцитов с целью замещения утраченного миокарда и клеток, оказывающих паракринный эффект, с целью стимуляции терапевтического ангиогенеза в ишемически поврежденных тканях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование посвящено разработке протоколов получения, предтрансплантационной подготовки и последующей трансплантации клеточного материала на примере кардиальных стромальных клеток, полученных из предсердий человека и крысы, и кардиальных производных ИПСК человека.

Клеточные культуры, полученные из фрагментов предсердия, являются гетерогенными по составу: в них присутствуют клетки, экспрессирующие маркеры мезенхимальных клеток, эндотелиальных клеток и перицитов. Полученные культуры способны к формированию капилляроподобных структур в функциональном тесте на ангиогенность, кроме этого в них показана экспрессия ангиогенных ростовых факторов и их рецепторов. В данной работе показано, что способ получения клеточных культур фрагментов предсердия в составе кардиосфер в бессывороточной среде способствует поддержанию ангиогенного потенциала в условиях *in vitro*. В экспериментах на крысах линии WAG было показано, что при трансплантации в ишемизированный миокард аутологичная клеточная культура, содержащая кардиальные стромальные клетки, может оказывать регенеративный эффект предположительно за счет паракринного механизма действия и не обладает способностью к длительной персистенции в миокарде.

Также в данной работе был создан методический подход для интрамиокардиальной трансплантации биоматериалов на примере кардиальных стромальных клеток крысы с применением аутологичного фибринового геля, который может быть в дальнейшем полезен для повышения эффективности методов клеточной терапии. Фибриновый гель, как было показано в данной работе, является подходящим кандидатом на эту роль, а репортерная система, экспрессирующая люциферазу, может быть эффективна для *in vitro* и *in vivo* мониторинга выживаемости клеток как на этапах культивирования, так и после трансплантации в сердце.

Для замещения утраченных сократительных элементов при лечении ишемических поражений сердца наиболее перспективными являются подходы получения кардиомиоцитов с помощью кардиальной дифференцировки плюрипотентных клеток. Дифференцированные кардиомиоциты обладают свойствами сократимости, возбудимости, а также отвечают на сигналы симпатической и парасимпатической нервной системы. Однако кардиомиоциты, дифференцируемые из ИПСК, функционально незрелые и имеют фетальный фенотип.

В данной работе при направленной кардиальной дифференцировке ИПСК человека были получены клетки, демонстрирующие спонтанную сократительную активность и экспрессирующие маркеры различных типов кардиомиоцитов (атриальных, вентрикулярных и пейсмейкерных). С целью изучения выживаемости и сохранения функциональной активности *in vivo* полученные кардиомиоциты трансплантировали в суспензии или в составе минимальных тканеинженерных конструкций (матригельные трансплантаты / клеточные пласты) в организм иммунодефицитных мышей линии SCID. Было показано, что в процессе нахождения в условиях живого организма индуцированные кардиомиоциты, трансплантированные в составе сформированного клеточного пласта, начинают формировать упорядоченный сократительный аппарат, а также сохраняют способность к спонтанному и синхронному сокращению после эксплантации.

Таким образом, данные полученные в работе, могут быть использованы для подбора условий культивирования и способа трансплантации кардиальных стромальных клеток и кардиальных производных ИПСК при использовании их в клеточной терапии, а также для более глубокого понимания процессов, происходящих с трансплантированными клетками в организме реципиента.

ВЫВОДЫ

1. Культуры стромальных клеток, полученные из фрагментов предсердия человека и крысы, гетерогенны по составу (содержат клетки, имеющие маркеры мезенхимальных клеток, эндотелиальных клеток и перицитов), способны формировать капилляроподобные структуры *in vitro* и экспрессировать ангиогенные ростовые факторы и рецепторы.
2. Аутологичная трансплантация кардиальных стромальных клеток в ишемизированный миокард области левого желудочка у крыс линии WAG снижает объем рубцовой ткани, но не способствует восстановлению сократительной функции сердца.
3. Кардиальные стромальные клетки после трансплантации в ишемизированный миокард крысы выживают непродолжительное время: в суспензии – не более 8 дней, в составе фибринового геля – не более 14 дней.
4. Кардиомиоциты, полученные из ИПСК человека, трансплантированные подкожно в организм иммунодефицитных мышей линии SCID, сохраняют жизнеспособность как минимум 28 дней.
5. Кардиомиоциты, полученные из ИПСК человека, трансплантированные в составе клеточных пластов под фиброзную капсулу почки иммунодефицитных мышей линии SCID, сохраняют жизнеспособность как минимум 42 дня и способны к спонтанному и синхронному сокращению после эксплантации из организма животного.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aldahmash A., Haack-Sørensen M., Al-Nbaheen M., Harkness L., Abdallah B.M., Kassem M. Human serum is as efficient as fetal bovine serum in supporting proliferation and differentiation of human multipotent stromal (mesenchymal) stem cells in vitro and in vivo // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2011. – Т. 7. – №. 4. – P. 860-868.
2. Alrefai M.T., Murali D., Paul A., Ridwan K.M., Connell J.M., Shum-Tim D. Cardiac tissue engineering and regeneration using cell-based therapy // *Stem cells and cloning: advances and applications*. – 2015. – Т. 8. – P. 81.
3. Aminzadeh M.A., Tseliou E., Sun B., Cheng K., Malliaras K., Makkar R.R., Marban E. Therapeutic efficacy of cardiosphere-derived cells in a transgenic mouse model of non-ischaemic dilated cardiomyopathy // *European heart journal*. – 2015. – Т. 36. – №. 12. – P. 751-762.
4. Arjmand B., Abedi M., Arabi M., Alavi-Moghadam S., Rezaei-Tavirani M., Hadavandkhani M., Tayanloo-Beik A., Kordi R., Roudsari P.P., Larijani B. Regenerative Medicine for the Treatment of Ischemic Heart Disease; Status and Future Perspectives // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – P. 2171. URL: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.704903> (accessed 30.03.2022).
5. Armulik A., Abramsson A., Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions // *Circulation research*. – 2005. – Т. 97. – №. 6. – P. 512-523.
6. Arora M. Cell culture media: a review // *Mater methods*. – 2013. – Т. 3. – №. 175. – P. 24.
7. Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis // *Science*. – 1997. – Т. 275. – №. 5302. – P. 964-966.
8. Asahara T., Kawamoto A., Masuda H. Concise review: circulating

- endothelial progenitor cells for vascular medicine // *Stem cells*. – 2011. – T. 29. – №. 11. – P. 1650-1655.
9. Asakura A. Stem cells in adult skeletal muscle // *Trends in cardiovascular medicine*. – 2003. – T. 13. – №. 3. – P. 123-128.
10. Assmus B., Alakmeh S., De Rosa S., Bönig H., Hermann E., Levy W.C., Dimmeler S., Zeiher A.M. Improved outcome with repeated intracoronary injection of bone marrow-derived cells within a registry: rationale for the randomized outcome trial REPEAT // *European heart journal*. – 2016. – T. 37. – №. 21. – P. 1659-1666.
11. Balsam L.B., Wagers A.J., Christensen J.L., Kofidis T., Weissman I.L., Robbins R.C. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium // *Nature*. – 2004. – T. 428. – №. 6983. – P. 668-673.
12. Bao L., Meng Q., Li Y., Deng S., Yu Z., Liu Z., Zhang L., Fan H. C-Kit Positive cardiac stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells synergistically enhance angiogenesis and improve cardiac function after myocardial infarction in a paracrine manner // *Journal of Cardiac Failure*. – 2017. – T. 23. – №. 5. – P. 403-415.
13. Barbash J.M., Chouraqui P., Baron J., Feinberg M.S., Etzion S., Tessone A., Miller L., Guetta E., Zipori D., Kedes L.H., Kloner R.A., Leor J. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution // *Circulation*. – 2003. – V. 108. – №. 71. – P. 863–868.
14. Bartunek J., Behfar A., Dolatabadi D., Vanderheyden M., Ostojic M., Dens J., El Nakadi B., Banovic M., Beleslin B., Vrolix M., Legrand V., Vrints C., Vanoverschelde J.L., Crespo-Diaz R., Homsy C., Tendera M., Waldman S., Wijns W., Terzic A. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2013. – T. 61. – №. 23. – P.

- 2329-2338.
15. Bayat M., Chien S. Combined adipose-derived mesenchymal stem cells and Photobiomodulation could modulate the inflammatory response and treat infected diabetic foot ulcers // *Photobiomodulation, photomedicine, and laser surgery*. – 2020. – T. 38. – №. 3. – p. 135-137.
 16. Bearzi C., Leri A., Monaco F., Rota M., Gonzalez A., Hosoda T., Pepe M., Qanud K., Ojaimi C., Bardelli S., D'Amario D., D'Alessandro D.A., Michler R.E., Dimmeler S., Zeiher A.M., Urbanek K., Hintze T.H., Kajstura J., Anversa P. Identification of a coronary vascular progenitor cell in the human heart // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – T. 106. – №. 37. – P. 15885-15890.
 17. Beltrami A.P., Barlucchi L., Torella D., Baker M., Limana F., Chimenti S., Kasahara H., Rota M., Musso E., Urbanek K., Leri A., Kajstura J., Nadal-Ginard B., Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration // *cell*. – 2003. – T. 114. – №. 6. – P. 763-776.
 18. Benjamin E.J., Virani S.S., Callaway C.W., Chamberlain A.M., Chang A.R., Cheng S., Chiuve S.E., Cushman M., Delling F.N., Deo R., de Ferranti S.D., Ferguson J.F., Fornage M., Gillespie C., Isasi C.R., Jiménez M.C., Jordan L.C., Judd S.E., Lackland D., Lichtman J.H., Lisabeth L., Liu S., Longenecker C.T., Lutsey P.L., Mackey J.S., Matchar D.B., Matsushita K., Mussolino M.E., Nasir K., O'Flaherty M., Palaniappan L.P., Pandey A., Pandey D.K., Reeves M.J., Ritchey M.D., Rodriguez C.J., Roth G.A., Rosamond W.D., Sampson U.K.A., Satou G.M., Shah S.H., Spartano N.L., Tirschwell D.L., Tsao C.W., Voeks J.H., Willey J.Z., Wilkins J.T., Wu J.H., Alger H.M., Wong S.S., Muntner P. Heart disease and stroke statistics—2018 update: a report from the American Heart Association // *Circulation*. – 2018. – T. 137. – №. 12. – P. e67-e492.
 19. Blin G., Nury D., Stefanovic S., Neri T., Guillevic O., Brinon B., Bellamy

- V., Rücker-Martin C., Barbry P., Bel A., Bruneval P., Cowan C., Pouly J., Mitalipov S., Gouadon E., Binder P., Hagège A., Desnos M., Renaud J.F., Menasché P., Pucéat M. A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates // *The Journal of clinical investigation*. – 2010. – T. 120. – №. 4. – P. 1125-1139.
20. Bolli R., Tang X.L., Sanganalath S.K., Rimoldi O., Mosna F., Abdel-Latif A., Jneid H., Rota M., Leri A., Kajstura J. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy // *Circulation*. – 2013. – T. 128. – №. 2. – P. 122-131.
21. Bolli R., Mitrani R.D., Hare J.M., Pepine C.J., Perin E.C., Willerson J.T., Traverse J.H., Henry T.D., Yang P.C., Murphy M.P., March K.L., Schulman I.H., Ikram S., Lee D.P., O'Brien C., Lima J.A., Ostovaneh M.R., Ambale-Venkatesh B., Lewis G., Khan A., Bacallao K., Valasaki K., Longsomboon B., Gee A.P., Richman S., Taylor D.A., Lai D., Sayre S.L., Bettencourt J., Vojvodic R.W., Cohen M.L., Simpson L., Aguilar D., Loghin C., Moyé L., Ebert R.F., Davis B.R., Simari R.D. A Phase II study of autologous mesenchymal stromal cells and c-kit positive cardiac cells, alone or in combination, in patients with ischaemic heart failure: the CCTRN CONCERT-HF trial // *European Journal of Heart Failure*. – 2021. – T. 23. – №. 4. – P. 661-674.
22. Bongiovanni D., Bassetti B., Gambini E., Gaipa G., Frati G., Achilli F., Scacciatella P., Carbucicchio C., Pompilio G. The CD133+ cell as advanced medicinal product for myocardial and limb ischemia // *Stem cells and development*. – 2014. – T. 23. – №. 20. – P. 2403-2421.
23. Brighton C.T., Hunt R.M. Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus // *Journal of orthopaedic trauma*. – 1997. – T. 11. – №. 4. – P. 244-253.
24. Broxmeyer H.E., Cooper S., Li Z.H., Lu L., Song H.Y., Kwon B.S.,

- Warren R.E., Donner D.B. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor // *International journal of hematology*. – 1995. – T. 62. – №. 4. – P. 203-215.
25. Burridge P.W., Keller G., Gold J.D., Wu J.C. Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming // *Cell stem cell*. – 2012. – T. 10. – №. 1. – P. 16-28.
26. Burridge P.W., Matsa E., Shukla P., Lin Z.C., Churko J.M., Ebert A.D., Lan F., Diecke S., Huber B., Mordwinkin N.M., Plews J.R., Abilez O.J., Cui B., Gold J.D., Wu J.C. Chemically defined generation of human cardiomyocytes // *Nature methods*. – 2014. – T. 11. – №. 8. – P. 855-860.
27. Butler M. Serum and protein free media // *Animal cell culture*. – Springer, Cham, 2015. – P. 223-236.
28. Cano-Martínez A., Vargas-González A., Guarner-Lans V., Prado-Zayago E., León-Olea M., Nieto-Lima B. Functional and structural regeneration in the axolotl heart (*Ambystoma mexicanum*) after partial ventricular amputation // *Archivos de cardiología de México*. – 2010. – T. 80. – №. 2. – P. 79-86.
29. Cao J., Poss K.D. The epicardium as a hub for heart regeneration // *Nature Reviews Cardiology*. – 2018. – T. 15. – №. 10. – P. 631-647.
30. Chakravarty T., Henry T.D., Kittleson M., Lima J., Siegel R.J., Slipczuk L., Pogoda J.M., Smith R.R., Malliaras K., Marban L., Ascheim D.D., Marban E., Makkar R.R. Allogeneic cardiosphere-derived cells for the treatment of heart failure with reduced ejection fraction: results of the Dilated cardiomyopathy iNtervention with Allogeneic Myocardially-regenerative Cells (DYNAMIC) trial // *EuroIntervention*. – 2019. – T. 16. – P. e293-e300.
31. Challen G.A., Boles N.C., Chambers S.M., Goodell M.A. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF- β 1 // *Cell stem cell*. – 2010. – T. 6. – №. 3. – P. 265-278.
32. Chan J.L., Miller J.G., Zhou Y., Robey P.G., Stroncek D.F., Arai A.E.,

- Sachdev V., Horvath K.A. Intramyocardial bone marrow stem cells in patients undergoing cardiac surgical revascularization // *The Annals of thoracic surgery*. – 2020. – T. 109. – №. 4. – P. 1142-1149.
- 33.Chen T.H.P., Chang T.C., Kang J.O., Choudhary B., Makita T., Tran C.M., Burch J.B., Eid H., Sucov H.M. Epicardial induction of fetal cardiomyocyte proliferation via a retinoic acid-inducible trophic factor // *Developmental biology*. – 2002. – T. 250. – №. 1. – P. 198-207.
- 34.Cheng K., Malliaras K., Shen D., Tseliou E., Ionta V., Smith J., Galang G., Sun B., Houde C., Marbán E. Intramyocardial injection of platelet gel promotes endogenous repair and augments cardiac function in rats with myocardial infarction // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2012. – T. 59. – №. 3. – P. 256-264.
- 35.Cheng K., Malliaras K., Li T.S., Sun B., Houde C., Galang G., Smith J., Matsushita N., Marban E. Magnetic enhancement of cell retention, engraftment, and functional benefit after intracoronary delivery of cardiac-derived stem cells in a rat model of ischemia/reperfusion // *Cell transplantation*. – 2012. – T. 21. – №. 6. – P. 1121-1135.
36. Cheng K., Shen D., Smith J., Galang G., Sun B., Zhang J., Marbán E. Transplantation of platelet gel spiked with cardiosphere-derived cells boosts structural and functional benefits relative to gel transplantation alone in rats with myocardial infarction // *Biomaterials*. – 2012. – T. 33. – №. 10. – P. 2872-2879.
- 37.Cheng W., Law P.K. Conceptual design and procedure for an autonomous intramyocardial injection catheter // *Cell transplantation*. – 2017. – T. 26. – №. 5. – P. 735-751.
- 38.Chimenti I., Smith R.R., Li T.S., Gerstenblith G., Messina E., Giacomello A., Marbán E. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice // *Circulation research*. – 2010. – T. 106. – №. 5. – P. 971-980.
- 39.Chong J.J.H., Murry C.E. Cardiac regeneration using pluripotent stem

- cells—progression to large animal models // *Stem cell research.* – 2014. – T. 13. – №. 3. – P. 654-665.
40. Chullikana A., Majumdar A.S., Gottipamula S., Krishnamurthy S., Kumar A.S., Prakash V.S., Gupta P.K. Randomized, double-blind, phase I/II study of intravenous allogeneic mesenchymal stromal cells in acute myocardial infarction // *Cytotherapy.* – 2015. – T. 17. – №. 3. – P. 250-261.
41. Clifford D.M., Fisher S.A., Brunskill S.J., Doree C., Mathur A., Clarke M.J., Watt S.M., Martin-Rendon E. Long-term effects of autologous bone marrow stem cell treatment in acute myocardial infarction: factors that may influence outcomes // *PloS one.* – 2012. – T. 7. – №. 5. – P. e37373.
42. Crisan M., Yap S., Casteilla L., Chen C.W., Corselli M., Park T.S., Andriolo G., Sun B., Zheng B., Zhang L., Norotte C., Teng P.N., Traas J., Schugar R., Deasy B.M., Badylak S., Buhring H.J., Giacobino J.P., Lazzari L., Huard J., Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs // *Cell stem cell.* – 2008. – T. 3. – №. 3. – P. 301-313.
43. Darehzereshki A., Rubin N., Gamba L., Kim J., Fraser J., Huang Y., Billings J., Mohammadzadeh R., Wood J., Warburton D., Kaartinen V., Lien C.L. Differential regenerative capacity of neonatal mouse hearts after cryoinjury // *Developmental biology.* – 2015. – T. 399. – №. 1. – P. 91-99.
44. Darland D.C., D'amore P.A. TGF β is required for the formation of capillary-like structures in three-dimensional cocultures of 10T1/2 and endothelial cells // *Angiogenesis.* – 2001. – T. 4. – №. 1. – P. 11-20.
45. Davis D. R. Cardiac stem cells in the post-Anversa era // *European Heart Journal.* – 2019. – T. 40. – №. 13. – P. 1039-1041.
46. Dawn B., Stein A.B., Urbanek K., Rota M., Whang B., Rastaldo R., Torella D., Tang X.L., Rezazadeh A., Kajstura J., Leri A., Hunt G., Varma J., Prabhu S.D., Anversa P., Bolli R. Cardiac stem cells delivered

- intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function // *Proceedings of the national academy of sciences*. – 2005. – T. 102. – №. 10. – P. 3766-3771.
47. Di Meglio F., Castaldo C., Nurzynska D., Romano V., Miraglia R., Bancone C., Langella G., Vosa C., Montagnani S. Epithelial–mesenchymal transition of epicardial mesothelium is a source of cardiac CD117-positive stem cells in adult human heart // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 2010. – T. 49. – №. 5. – P. 719-727.
48. Dubois N.C., Craft A.M., Sharma P., Elliott D.A., Stanley E.G., Elefanty A.G., Gramolini A., Keller G. SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells // *Nature biotechnology*. – 2011. – T. 29. – №. 11. – P. 1011-1018.
49. Eckfeldt C.E., Mendenhall E.M., Verfaillie C.M. The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell // *Nature Reviews molecular cell biology*. – 2005. – T. 6. – №. 9. – P. 726-737.
50. Elgendy I.Y., Mahtta D., Pepine C.J. Medical therapy for heart failure caused by ischemic heart disease // *Circulation research*. – 2019. – T. 124. – №. 11. – P. 1520-1535.
51. Ellison G.M., Torella D., Dellegrottaglie S., Perez-Martinez C., Perez de Prado A., Vicinanza C., Purushothaman S., Galuppo V., Iaconetti C., Waring C.D., Smith A., Torella M., Cuellas Ramon C., Gonzalo-Orden J.M., Agosti V., Indolfi C., Galiñanes M., Fernandez-Vazquez F., Nadal-Ginard B. Endogenous cardiac stem cell activation by insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor intracoronary injection fosters survival and regeneration of the infarcted pig heart // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2011. – T. 58. – №. 9. – P. 977-986.
52. Eng G., Lee B.W., Protas L., Gagliardi M., Brown K., Kass R.S., Keller G., Robinson R.B., Vunjak-Novakovic G. Autonomous beating rate adaptation in human stem cell-derived cardiomyocytes // *Nature communications*. – 2016. – T. 7. – №. 1. – P. 1-10.

53. Eschenhagen T., Bolli R., Braun T., Field L.J., Fleischmann B.K., Frisén J., Giacca M., Hare J.M., Houser S., Lee R.T., Marbán E., Martin J.F., Molkentin J.D., Murry C.E., Riley P.R., Ruiz-Lozano P., Sadek H.A., Sussman M.A., Hill J.A. Cardiomyocyte regeneration: a consensus statement // *Circulation*. – 2017. – T. 136. – №. 7. – P. 680-686.
54. Fathi E., Valipour B., Vietor I., Farahzadi R. An overview of the myocardial regeneration potential of cardiac c-Kit⁺ progenitor cells via PI3K and MAPK signaling pathways // *Future cardiology*. – 2020. – T. 16. – №. 3. – P. 199-209.
55. Fernandes S., Naumova A.V., Zhu W.Z., Laflamme M.A., Gold J., Murry C.E. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes engraft but do not alter cardiac remodeling after chronic infarction in rats // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 2010. – T. 49. – №. 6. – P. 941-949.
56. Fernández-Avilés F., Sanz-Ruiz R., Climent A.M., Badimon L., Bolli R., Charron D., Fuster V., Janssens S., Kastrup J., Kim H.S., Lüscher T.F., Martin J.F., Menasché P., Simari R.D., Stone G.W., Terzic A., Willerson J.T., Wu J.C., TACTICS Writing Group. Global position paper on cardiovascular regenerative medicine // *European Heart Journal*. – 2017. – T. 38. – №. 33. – P. 2532-2546.
57. Foglia M.J., Poss K.D. Building and re-building the heart by cardiomyocyte proliferation // *Development*. – 2016. – T. 143. – №. 5. – P. 729-740.
58. Friis T., Haack-Sørensen M., Mathiasen A.B., Ripa R.S., Kristoffersen U.S., Jørgensen E., Hansen L., Bindslev L., Kjær A., Hesse B., Dickmeiss E., Kastrup J. Mesenchymal stromal cell derived endothelial progenitor treatment in patients with refractory angina // *Scandinavian Cardiovascular Journal*. – 2011. – T. 45. – №. 3. – P. 161-168.
59. Funakoshi S., Miki K., Takaki T., Okubo C., Hatani T., Chonabayashi K., Nishikawa M., Takei I., Oishi A., Narita M., Hoshijima M., Kimura T., Yamanaka S., Yoshida Y. Enhanced engraftment, proliferation and

- therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes // *Scientific reports*. – 2016. – T. 6. – №. 1. – P. 1-14.
60. Gallet R., Tseliou E., Dawkins J., Middleton R., Valle J., Angert D., Reich H., Luthringer D., Kreke M., Smith R., Marbán L., Marbán E. Intracoronary delivery of self-assembling heart-derived microtissues (cardiospheres) for prevention of adverse remodeling in a pig model of convalescent myocardial infarction // *Circulation: Cardiovascular Interventions*. – 2015. – T. 8. – №. 5. – P. e002391.
61. Gallina C., Turinetti V., Giachino C. A new paradigm in cardiac regeneration: the mesenchymal stem cell secretome // *Stem cells international*. – 2015. – T. 2015. – P. 765846.
62. Gao E., Lei Y.H., Shang X., Huang Z.M., Zuo L, Boucher M., Fan Q., Chuprun J.K., Ma X.L., Koch W.J. A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse // *Circulation research*. – 2010. – T. 107. – №. 12. – P. 1445-1453.
63. Gao L., Gregorich Z.R., Zhu W., Mattapally S., Oduk Y., Lou X., Kannappan R., Borovjagin A.V., Walcott G.P., Pollard A.E., Fast V.G., Hu X., Lloyd S.G., Ge Y., Zhang J. Large cardiac muscle patches engineered from human induced-pluripotent stem cell-derived cardiac cells improve recovery from myocardial infarction in swine // *Circulation*. – 2018. – T. 137. – №. 16. – P. 1712-1730.
64. Gnecci M., Zhang Z., Ni A., Dzau V.J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy // *Circulation research*. – 2008. – T. 103. – №. 11. – P. 1204-1219.
65. Grigor'eva E.V., Malankhanova T.B., Surumbayeva A., Minina J.M., Kizilova E.A., Lebedev I.N., Malakhova A.A., Zakian S.M. Generation and characterization of iPSCs from human embryonic dermal fibroblasts of a healthy donor from Siberian population // *BioRxiv*. – 2018. – P. 455535.
66. Hall A.P. Review of the pericyte during angiogenesis and its role in

- cancer and diabetic retinopathy // *Toxicologic pathology*. – 2006. – T. 34. – №. 6. – P. 763-775.
67. Hare J.M., Traverse J.H., Henry T.D., Dib N., Strumpf R.K., Schulman S.P., Gerstenblith G., DeMaria A.N., Denktas A.E., Gammon R.S., Hermiller J.B. Jr., Reisman M.A., Schaer G.L., Sherman W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2009. – T. 54. – №. 24. – P. 2277-2286.
68. Hare J.M., Fishman J.E., Gerstenblith G., DiFede Velazquez D.L., Zambrano J.P., Suncion V.Y., Tracy M., Ghersin E., Johnston P.V., Brinker J.A., Breton E., Davis-Sproul J., Schulman I.H., Byrnes J., Mendizabal A.M., Lowery M.H., Rouy D., Altman P., Wong Po Foo C., Ruiz P., Amador A., Da Silva J., McNiece I.K., Heldman A.W., George R., Lardo A. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial // *Jama*. – 2012. – T. 308. – №. 22. – P. 2369-2379.
69. Hatzistergos K.E., Takeuchi L.M., Saur D., Seidler B., Dymecki S.M., Mai J.J., White I.A., Balkan W., Kanashiro-Takeuchi R.M., Schally A.V., Hare J.M. cKit⁺ cardiac progenitors of neural crest origin // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – T. 112. – №. 42. – P. 13051-13056.
70. Heldman A.W., DiFede D.L., Fishman J.E., Zambrano J.P., Trachtenberg B.H., Karantalis V., Mushtaq M., Williams A.R., Suncion V.Y., McNiece I.K., Ghersin E., Soto V., Lopera G., Miki R., Willens H., Hendel R., Mitrani R., Pattany P., Feigenbaum G., Oskouei B., Byrnes J., Lowery M.H., Sierra J., Pujol M.V., Delgado C., Gonzalez P.J., Rodriguez J.E., Bagnó L.L., Rouy D., Altman P., Foo C.W., da Silva J., Anderson E., Schwarz R., Mendizabal A., Hare J.M. Transendocardial mesenchymal

- stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial // *Jama*. – 2014. – T. 311. – №. 1. – P. 62-73.
71. Hendriks T., Schurer R.A.J., Al Ali L., van den Heuvel A.F.M., van der Harst P. Left ventricular restoration devices post myocardial infarction // *Heart failure reviews*. – 2018. – T. 23. – №. 6. – P. 871-883.
72. Hirai H., Verma M., Watanabe S., Tastad C., Asakura Y., Asakura, A. MyoD regulates apoptosis of myoblasts through microRNA-mediated down-regulation of Pax3 // *Journal of Cell Biology*. – 2010. – T. 191. – №. 2. – P. 347-365.
73. Hodgkinson C.P., Bareja A., Gomez J.A., Dzau V.J. Emerging concepts in paracrine mechanisms in regenerative cardiovascular medicine and biology // *Circulation research*. – 2016. – T. 118. – №. 1. – P. 95-107.
74. Holmes C., Stanford W.L. Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma // *Stem cells*. – 2007. – T. 25. – №. 6. – P. 1339-1347.
75. Hombach-Klonisch S., Panigrahi S., Rashedi I., Seifert A., Alberti E., Pocar P., Kurpisz M., Schulze-Osthoff K., Mackiewicz A., Los M. Adult stem cells and their trans-differentiation potential—perspectives and therapeutic applications // *Journal of Molecular Medicine*. – 2008. – T. 86. – №. 12. – P. 1301-1314.
76. Ieda M., Fu J.D., Delgado-Olguin P., Vedantham V., Hayashi Y., Bruneau B.G., Srivastava D. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors // *Cell*. – 2010. – T. 142. – №. 3. – P. 375-386.
77. Ilic D., Ogilvie C. Concise review: Human embryonic stem cells—what have we done? What are we doing? Where are we going? // *Stem cells*. – 2017. – T. 35. – №. 1. – P. 17-25.
78. Isner J.M., Pieczek A., Schainfeld R., Blair R., Haley L., Asahara T., Rosenfield K., Razvi S., Walsh K., Symes J.F. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with

- ischaemic limb // *The Lancet*. – 1996. – T. 348. – №. 9024. – P. 370-374.
79. Itzhaki-Alfia A., Leor J., Raanani E., Sternik L., Spiegelstein D., Netser S., Holbova R., Pevsner-Fischer M., Lavee J., Barbash I.M. Patient characteristics and cell source determine the number of isolated human cardiac progenitor cells // *Circulation*. – 2009. – T. 120. – №. 25. – P. 2559-2566.
80. Iwasaki H., Kawamoto A., Ishikawa M., Oyamada A., Nakamori S., Nishimura H., Sadamoto K., Horii M., Matsumoto T., Murasawa S., Shibata T., Suehiro S., Asahara T. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction // *Circulation*. – 2006. – T. 113. – №. 10. – P. 1311-1325.
81. Jahn T., Seipel P., Coutinho S., Urschel S., Schwarz K., Miething C., Serve H., Peschel C., Duyster J. Analysing c-kit internalization using a functional c-kit-EGFP chimera containing the fluorochrome within the extracellular domain // *Oncogene*. – 2002. – T. 21. – №. 29. – P. 4508-4520.
82. Janowski M. Functional diversity of SDF-1 splicing variants // *Cell adhesion & migration*. – 2009. – T. 3. – №. 3. – P. 243-249.
83. Johnston P.V., Sasano T., Mills K., Evers R., Lee S.T., Smith R.R., Lardo A.C., Lai S., Steenbergen C., Gerstenblith G., Lange R., Marbán E. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy // *Circulation*. – 2009. – T. 120. – №. 12. – P. 1075-1083.
84. Kanazawa H., Tseliou E., Malliaras K., Yee K., Dawkins J.F., De Couto G., Smith R.R., Kreke M., Seinfeld J., Middleton R.C., Gallet R., Cheng K., Luthringer D., Valle I., Chowdhury S., Fukuda K., Makkar R.R., Marbán L., Marbán E. Cellular postconditioning: allogeneic cardiosphere-derived cells reduce infarct size and attenuate microvascular obstruction when administered after reperfusion in pigs with acute myocardial infarction // *Circulation: Heart Failure*. – 2015. – T. 8. – №. 2. – P. 322-332.

85. Kanelidis A.J., Premer C., Lopez J., Balkan W., Hare J.M. Route of delivery modulates the efficacy of mesenchymal stem cell therapy for myocardial infarction: a meta-analysis of preclinical studies and clinical trials // *Circulation research*. – 2017. – T. 120. – №. 7. – P. 1139-1150.
86. Kang I.S., Suh J., Lee M.N., Lee C., Jin J., Lee C., Yang Y.I., Jang Y., Oh G.T. Characterization of human cardiac mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles comparing with human bone marrow derived mesenchymal stem cells // *BMB reports*. – 2020. – T. 53. – №. 2. – P. 118.
87. Karantalis V., DiFede D.L., Gerstenblith G., Pham S., Symes J., Zambrano J.P., Fishman J., Pattany P., McNiece I., Conte J., Schulman S., Wu K., Shah A., Breton E., Davis-Sproul J., Schwarz R., Feigenbaum G., Mushtaq M., Suncion V.Y., Lardo A.C., Borrello I., Mendizabal A., Karas T.Z., Byrnes J., Lowery M., Heldman A.W., Hare J.M. Autologous mesenchymal stem cells produce concordant improvements in regional function, tissue perfusion, and fibrotic burden when administered to patients undergoing coronary artery bypass grafting: the Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery (PROMETHEUS) trial // *Circulation research*. – 2014. – T. 114. – №. 8. – P. 1302-1310.
88. Karantalis V., Schulman I.H., Balkan W., Hare J.M. Allogeneic cell therapy: a new paradigm in therapeutics // *Circulation research*. – 2015. – T. 116. – №. 1. – P. 12-15.
89. Karra R., Poss K.D. Redirecting cardiac growth mechanisms for therapeutic regeneration // *The Journal of clinical investigation*. – 2017. – T. 127. – №. 2. – P. 427-436.
90. Kasai-Brunswick T.H., Costa A.R., Barbosa R.A., Farjun B., Mesquita F.C., Silva Dos Santos D., Ramos I.P., Suhett G., Brasil G.V., Cunha S.T., Brito J.O., Passipieri J.D., Carvalho A.B., Campos de Carvalho A.C. Cardiosphere-derived cells do not improve cardiac function in rats with cardiac failure // *Stem cell research & therapy*. – 2017. – T. 8. – №. 1. –

- P. 1-9.
91. Katz M.G., Fargnoli A.S., Pritchette L.A., Bridges C.R. Gene delivery technologies for cardiac applications // *Gene therapy*. – 2012. – T. 19. – №. 6. – P. 659-669.
92. Kawamoto A., Gwon H.C., Iwaguro H., Yamaguchi J.I., Uchida S., Masuda H., Silver M., Ma H., Kearney M., Isner J.M., Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia // *Circulation*. – 2001. – T. 103. – №. 5. – P. 634-637.
93. Kawamoto A., Iwasaki H., Kusano K., Murayama T., Oyamada A., Silver M., Hulbert C., Gavin M., Hanley A., Ma H., Kearney M., Zak V., Asahara T., Losordo D.W. CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells // *Circulation*. – 2006. – T. 114. – №. 20. – P. 2163-2169.
94. Kawamura M., Miyagawa S., Fukushima S., Saito A., Miki K., Funakoshi S., Yoshida Y., Yamanaka S., Shimizu T., Okano T., Daimon T., Toda K., Sawa Y. Enhanced therapeutic effects of human iPS cell derived-cardiomyocyte by combined cell-sheets with omental flap technique in porcine ischemic cardiomyopathy model // *Scientific reports*. – 2017. – T. 7. – №. 1. – P. 1-11.
95. Kehat I., Kenyagin-Karsenti D., Snir M., Segev H., Amit M., Gepstein A., Livne E., Binah O., Itskovitz-Eldor J., Gepstein L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes // *The Journal of clinical investigation*. – 2001. – T. 108. – №. 3. – P. 407-414.
96. Keith M.C.L., Bolli R. “String theory” of c-kitpos cardiac cells: A new paradigm regarding the nature of these cells that may reconcile apparently discrepant results // *Circulation research*. – 2015. – T. 116. – №. 7. – P. 1216-1230.

97. Kermani P., Rafii D., Jin D.K., Whitlock P., Schaffer W., Chiang A., Vincent L., Friedrich M., Shido K., Hackett N.R., Crystal R.G., Rafii S., Hempstead B.L. Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB⁺ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors // *The Journal of clinical investigation*. – 2005. – T. 115. – №. 3. – P. 653-663.
98. Kim M.C., Kim Y.S., Kang W.S., Lee K.H., Cho M., Hong M.H., Lim K.S., Jeong M.H., Ahn Y. Intramyocardial injection of stem cells in pig myocardial infarction model: the first trial in Korea // *Journal of Korean medical science*. – 2017. – T. 32. – №. 10. – P. 1708-1712.
99. Kim S.H., Cho J.H., Lee Y.H., Lee J.H., Kim S.S., Kim M.Y., Lee M.G., Kang W.Y., Lee K.S., Ahn Y.K., Jeong M.H., Kim H.S. Improvement in left ventricular function with intracoronary mesenchymal stem cell therapy in a patient with anterior wall ST-segment elevation myocardial infarction // *Cardiovascular drugs and therapy*. – 2018. – T. 32. – №. 4. – P. 329-338.
100. Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., Shou M., Lee C.W., Barr S., Fuchs S., Epstein S.E. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms // *Circulation*. – 2004. – T. 109. – №. 12. – P. 1543-1549.
101. Kolanowski T. J., Antos C. L., Guan K. Making human cardiomyocytes up to date: Derivation, maturation state and perspectives // *International journal of cardiology*. – 2017. – T. 241. – P. 379-386.
102. Koninckx R., Daniëls A., Windmolders S., Carlotti F., Mees U., Steels P., Rummens J.L., Hendrikx M., Hensen K. Mesenchymal stem cells or cardiac progenitors for cardiac repair? A comparative study // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2011. – T. 68. – №. 12. – P. 2141-2156.
103. Laflamme M.A., Chen K.Y., Naumova A.V., Muskheli V., Fugate J.A., Dupras S.K., Reinecke H., Xu C., Hassanipour M., Police S., O'Sullivan C., Collins L., Chen Y., Minami E., Gill E.A., Ueno S., Yuan C., Gold J.,

- Murry C.E. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts // *Nature biotechnology*. – 2007. – T. 25. – №. 9. – P. 1015-1024.
104. Laflamme M.A., Murry C.E. Heart regeneration // *Nature*. – 2011. – T. 473. – №. 7347. – P. 326-335.
105. Larose E., Proulx G., Voisine P., Rodés-Cabau J., De Larochelière R., Rossignol G., Bertrand O.F., Tremblay J.P. Percutaneous versus surgical delivery of autologous myoblasts after chronic myocardial infarction: an in vivo cardiovascular magnetic resonance study // *Catheterization and Cardiovascular Interventions*. – 2010. – T. 75. – №. 1. – P. 120-127.
106. Lee S.T., White A.J., Matsushita S., Malliaras K., Steenbergen C., Zhang Y., Li T.S., Terrovitis J., Yee K., Simsir S., Makkar R., Marbán E. Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2011. – T. 57. – №. 4. – P. 455-465.
107. Leri A., Kajstura J. A. N., Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration // *Physiological reviews*. – 2005. – T. 85. – №. 4. – P. 1373-1416.
108. Leri A., Kajstura J., Anversa P. Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: a paradigm shift in human myocardial biology // *Circulation research*. – 2011. – T. 109. – №. 8. – P. 941-961.
109. Li H.Y., Hu D., Chen G., Zheng D., Li S., Lin Y., Hong H., Luo Y., Ke Y., Huang Y., Wu L., Lan T., Wang W., Fang J. Adropin-based dual treatment enhances the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in rat myocardial infarction // *Cell death & disease*. – 2021. – T. 12. – №. 6. – P. 1-11.
110. Li J., Minami I., Shiozaki M., Yu L., Yajima S., Miyagawa S., Shiba Y., Morone N., Fukushima S., Yoshioka M., Li S., Qiao J., Li X., Wang L.,

- Kotera H., Nakatsuji N., Sawa Y., Chen Y., Liu L. Human pluripotent stem cell-derived cardiac tissue-like constructs for repairing the infarcted myocardium // *Stem Cell Reports*. – 2017. – T. 9. – №. 5. – P. 1546-1559.
111. Li R.K., Jia Z.Q., Weisel R.D., Mickle D.A., Zhang J., Mohabeer M.K., Rao V., Ivanov J. Cardiomyocyte transplantation improves heart function // *The Annals of thoracic surgery*. – 1996. – T. 62. – №. 3. – P. 654-661.
112. Li T.S., Cheng K., Lee S.T., Matsushita S., Davis D., Malliaras K., Zhang Y., Matsushita N., Smith R.R., Marbán E. Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair // *Stem cells*. – 2010. – T. 28. – №. 11. – P. 2088-2098.
113. Li T.S., Cheng K., Malliaras K., Matsushita N., Sun B., Marban L., Zhang Y., Marban E. Expansion of human cardiac stem cells in physiological oxygen improves cell production efficiency and potency for myocardial repair // *Cardiovascular research*. – 2011. – T. 89. – №. 1. – P. 157-165.
114. Li T.S., Cheng K., Malliaras K., Smith R.R., Zhang Y., Sun B., Matsushita N., Blusztajn A., Terrovitis J., Kusuoka H., Marbán L., Marbán E. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2012. – T. 59. – №. 10. – P. 942-953.
115. Li Q., Guo Y., Ou Q., Chen N., Wu W.J., Yuan F., O'Brien E., Wang T., Luo L., Hunt G.N., Zhu X., Bolli R. Intracoronary administration of cardiac stem cells in mice: a new, improved technique for cell therapy in murine models // *Basic research in cardiology*. – 2011. – T. 106. – №. 5. – P. 849-864.
116. Lian X., Zhang J., Azarin S.M., Zhu K., Hazeltine L.B., Bao X., Hsiao C., Kamp T.J., Palecek S.P. Directed cardiomyocyte differentiation from

- human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions // *Nature protocols*. – 2013. – T. 8. – №. 1. – P. 162-175.
117. Liang X., Ding Y., Zhang Y., Tse H.F., Lian Q. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives // *Cell transplantation*. – 2014. – T. 23. – №. 9. – P. 1045-1059.
118. Liew A., Barry F., O'Brien T. Endothelial progenitor cells: diagnostic and therapeutic considerations // *Bioessays*. – 2006. – T. 28. – №. 3. – P. 261-270.
119. Linke A., Müller P., Nurzynska D., Casarsa C., Torella D., Nascimbene A., Castaldo C., Cascapera S., Böhm M., Quaini F., Urbanek K., Leri A., Hintze T.H., Kajstura J., Anversa P. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function // *Proceedings of the national academy of sciences*. – 2005. – T. 102. – №. 25. – P. 8966-8971.
120. Liu Q., Yang R., Huang X., Zhang H., He L., Zhang L., Tian X., Nie Y., Hu S., Yan Y., Zhang L., Qiao Z., Wang Q.D., Lui K.O., Zhou B. Genetic lineage tracing identifies in situ Kit-expressing cardiomyocytes // *Cell research*. – 2016. – T. 26. – №. 1. – P. 119-130.
121. Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method // *methods*. – 2001. – T. 25. – №. 4. – P. 402-408.
122. Lorenzen U.S., Buggeskov K.B., Nielsen E.E., Sethi N.J., Carranza C.L., Gluud C., Jakobsen J.C. Coronary artery bypass surgery plus medical therapy versus medical therapy alone for ischaemic heart disease: a protocol for a systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis // *Systematic reviews*. – 2019. – T. 8. – №. 1. – P. 1-14.
123. Madonna R., Van Laake L.W., Davidson S.M., Engel F.B., Hausenloy D.J., Lecour S., Leor J., Perrino C., Schulz R., Ytrehus K., Landmesser

- U., Mummery C.L., Janssens S., Willerson J., Eschenhagen T., Ferdinandy P., Sluijter J.P. Cell-based therapies for myocardial repair and regeneration in ischemic heart disease and heart failure // *Eur Heart J.* – 2016. – T. 37. – P. 1789-1798.
124. Madonna R., Van Laake L.W., Botker H.E., Davidson S.M., De Caterina R., Engel F.B., Eschenhagen T., Fernandez-Aviles F., Hausenloy D.J., Hulot J.S., Lecour S., Leor J., Menasché P., Pesce M., Perrino C., Prunier F., Van Linthout S., Ytrehus K., Zimmermann W.H., Ferdinandy P., Sluijter J.P.G. ESC Working Group on Cellular Biology of the Heart: position paper for Cardiovascular Research: tissue engineering strategies combined with cell therapies for cardiac repair in ischaemic heart disease and heart failure // *Cardiovascular research.* – 2019. – T. 115. – №. 3. – P. 488-500.
125. Makkar R.R., Smith R.R., Cheng K., Malliaras K., Thomson L.E., Berman D., Czer L.S., Marbán L., Mendizabal A., Johnston P.V., Russell S.D., Schuleri K.H., Lardo A.C., Gerstenblith G., Marbán E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial // *The Lancet.* – 2012. – T. 379. – №. 9819. – P. 895-904.
126. Makkar R.R., Kereiakes D.J., Aguirre F., Kowalchuk G., Chakravarty T., Malliaras K., Francis G.S., Povsic T.J., Schatz R., Traverse J.H., Pogoda J.M., Smith R.R., Marban L., Ascheim D.D., Ostovaneh M.R., Lima J.A.C., DeMaria A., Marban E., Henry T.D. Intracoronary ALLogeneic heart STem cells to Achieve myocardial Regeneration (ALLSTAR): a randomized, placebo-controlled, double-blinded trial // *European heart journal.* – 2020. – T. 41. – №. 36. – P. 3451-3458.
127. Malliaras K., Zhang Y., Seinfeld J., Galang G., Tseliou E., Cheng K., Sun B., Aminzadeh M., Marban E. Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart // *EMBO molecular*

- medicine. – 2013. – T. 5. – №. 2. – P. 191-209.
128. Malliaras K., Makkar R.R., Smith R.R., Cheng K., Wu E., Bonow R.O., Marbán L., Mendizabal A., Cingolani E., Johnston P.V., Gerstenblith G., Schuleri K.H., Lardo A.C., Marbán E. Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CARDiosphere-Derived aUtologous stem CELls to reverse ventricUlar dySfunction) // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2014. – T. 63. – №. 2. – P. 110-122.
129. Manthorpe M., Cornefert-Jensen F., Hartikka J., Felgner J., Rundell A., Margalith M., Dwarki V. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice // *Human gene therapy*. – 1993. – T. 4. – №. 4. – P. 419-431.
130. Marban E. A mechanistic roadmap for the clinical application of cardiac cell therapies // *Nature biomedical engineering*. – 2018. – T. 2. – №. 6. – P. 353-361.
131. Marban E., Liao K. On the cellular origin of cardiosphere-derived cells (CDCs) // *Basic Research in Cardiology*. – 2022. – T. 117. – №. 1. – P. 1-4.
132. Maron D.J., Hochman J.S., O'Brien S.M., Reynolds H.R., Boden W.E., Stone G.W., Bangalore S., Spertus J.A., Mark D.B., Alexander K.P., Shaw L., Berger J.S., Ferguson T.B. Jr, Williams D.O., Harrington R.A., Rosenberg Y. International study of comparative health effectiveness with medical and invasive approaches (ISCHEMIA) trial: rationale and design // *American heart journal*. – 2018. – T. 201. – P. 124-135.
133. Marin-Garcia J., Goldenthal M.J. Application of stem cells in cardiology: where we are and where we are going // *Current stem cell research & therapy*. – 2006. – T. 1. – №. 1. – P. 1-11.
134. Masuda S., Shimizu T. Three-dimensional cardiac tissue fabrication based on cell sheet technology // *Advanced drug delivery reviews*. –

2016. – T. 96. – P. 103-109.
135. Matar A. A., Chong J. J. H. Stem cell therapy for cardiac dysfunction // Springerplus. – 2014. – T. 3. – №. 1. – P. 1-14.
136. Matsuo T., Masumoto H., Tajima S., Ikuno T., Katayama S., Minakata K., Ikeda T., Yamamizu K., Tabata Y., Sakata R., Yamashita J.K. Efficient long-term survival of cell grafts after myocardial infarction with thick viable cardiac tissue entirely from pluripotent stem cells // Scientific reports. – 2015. – T. 5. – №. 1. – P. 1-14.
137. Matuszczak S., Czaplą J., Jarosz-Biej M., Wiśniewska E., Cichoń T., Smolarczyk R., Kobusińska M., Gajda K., Wilczek P., Sliwka J., Zembala M., Zembala M., Szala S. Characteristic of c-Kit⁺ progenitor cells in explanted human hearts // Clinical Research in Cardiology. – 2014. – T. 103. – №. 9. – P. 711-718.
138. Mauritz C., Schwanke K., Reppel M., Neef S., Katsirntaki K., Maier L.S., Nguemo F., Menke S., Haustein M., Hescheler J., Hasenfuss G., Martin U. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells // Circulation. – 2008. – T. 118. – №. 5. – P. 507-517.
139. McDonald C.M., Marbán E., Hendrix S., Hogan N., Smith R.R., Eagle M., Finkel R.S., Tian C., Janas J., Harmelink M.M., Varadhachary A.S., Taylor M.D., Hor K.N., Mayer O.H., Henricson E.K., Furlong P., Ascheim D.A., Rogy S., Williams P., Marbán L., HOPE-2 Study Group. Repeated intravenous cardiosphere-derived cell therapy in late-stage Duchenne muscular dystrophy (HOPE-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial // The Lancet. – 2022. – T. 399. – №. 10329. – P. 1049-1058.
140. Meilhac S.M., Lescroart F., Blanpain C., Buckingham M.E. Cardiac cell lineages that form the heart // Cold Spring Harb Perspect Med. – 2015. – T. 5. – №. 2. – P. a026344.
141. Meirelles L.S., Chagastelles P.C., Nardi N.B. Mesenchymal stem cells

- reside in virtually all post-natal organs and tissues // *Journal of cell science*. – 2006. – T. 119. – №. 11. – P. 2204-2213.
142. Menasche P., Hagège A.A., Scorsin M., Pouzet B., Desnos M., Duboc D., Schwartz K., Vilquin J.T., Marolleau J.P. Myoblast transplantation for heart failure // *The Lancet*. – 2001. – T. 357. – №. 9252. – P. 279-280.
143. Menasche P., Hagège A.A., Vilquin J.T., Desnos M., Abergel E., Pouzet B., Bel A., Sarateanu S., Scorsin M., Schwartz K., Bruneval P., Benbunan M., Marolleau J.P., Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2003. – T. 41. – №. 7. – P. 1078-1083.
144. Menasche P. Skeletal myoblasts and cardiac repair // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 2008. – T. 45. – №. 4. – P. 545-553.
145. Menasche P., Alfieri O., Janssens S., McKenna W., Reichenspurner H., Trinquart L., Vilquin J.T., Marolleau J.P., Seymour B., Larghero J., Lake S., Chatellier G., Solomon S., Desnos M., Hagège A.A. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation // *Circulation*. – 2008. – T. 117. – №. 9. – P. 1189-1200.
146. Menasche P., Vanneaux V. Stem cells for the treatment of heart failure // *Current Research in Translational Medicine*. – 2016. – T. 64. – №. 2. – P. 97-106.
147. Menasche P. Cell therapy trials for heart regeneration—lessons learned and future directions // *Nature Reviews Cardiology*. – 2018. – T. 15. – №. 11. – P. 659-671.
148. Menasche P., Vanneaux V., Hagège A., Bel A., Cholley B., Parouchev A., Cacciapuoti I., Al-Daccak R., Benhamouda N., Blons H., Agbulut O., Tosca L., Trouvin J.H., Fabreguettes J.R., Bellamy V., Charron D., Tartour E., Tachdjian G., Desnos M., Larghero J. Transplantation of

- human embryonic stem cell–derived cardiovascular progenitors for severe ischemic left ventricular dysfunction // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2018. – T. 71. – №. 4. – P. 429-438.
149. Menichella G., Lai M., Serafini R., Pierelli L., Vittori M., Ciarli M., Rumi C., Puggioni P., Scambia G., Sica S., Leone G. Large volume leukapheresis for collecting hemopoietic progenitors: role of CD 34+ precourt in predicting successful collection // *The International Journal of Artificial Organs*. – 1999. – T. 22. – №. 5. – P. 334-341.
150. Merani S., Toso C., Emamaullee J., Shapiro A.M.J. Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation // *Journal of British Surgery*. – 2008. – T. 95. – №. 12. – P. 1449-1461.
151. Messina E., De Angelis L., Frati G., Morrone S., Chimenti S., Fiordaliso F., Salio M., Battaglia M., Latronico M.V., Coletta M., Vivarelli E., Frati L., Cossu G., Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart // *Circulation research*. – 2004. – T. 95. – №. 9. – P. 911-921.
152. Michler R.E. The current status of stem cell therapy in ischemic heart disease // *Journal of cardiac surgery*. – 2018. – T. 33. – №. 9. – P. 520-531.
153. Mieno S., Clements R.T., Boodhwani M., Sodha N.R., Ramlawi B., Bianchi C., Sellke F.W. Characteristics and Function of Cryopreserved Bone Marrow–Derived Endothelial Progenitor Cells // *The Annals of thoracic surgery*. – 2008. – T. 85. – №. 4. – P. 1361-1366.
154. Min J.Y., Yang Y., Converso K.L., Liu L., Huang Q., Morgan J.P., Xiao Y.F. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats // *Journal of Applied Physiology*. – 2002. – T. 92. – №. 1. – P. 288-296.
155. Mirotsov M., Jayawardena T.M., Schmeckpeper J., Gnecci M., Dzau V.J. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart // *Journal of molecular and cellular cardiology*. –

2011. – T. 50. – №. 2. – P. 280-289.
156. Mishra R., Vijayan K., Colletti E.J., Harrington D.A., Matthiesen T.S., Simpson D., Goh S.K., Walker B.L., Almeida-Porada G., Wang D., Backer C.L., Dudley S.C. Jr., Wold L.E., Kaushal S. Characterization and functionality of cardiac progenitor cells in congenital heart patients // *Circulation*. – 2011. – T. 123. – №. 4. – P. 364-373.
157. Morad M., Zhang X. Mechanisms of spontaneous pacing: sinoatrial nodal cells, neonatal cardiomyocytes, and human stem cell derived cardiomyocytes // *Canadian journal of physiology and pharmacology*. – 2017. – T. 95. – №. 10. – P. 1100-1107.
158. Morisaki N., Moriwaki S., Sugiyama-Nakagiri Y., Haketa K., Takema Y., Imokawa G. Neprilysin is identical to skin fibroblast elastase: its role in skin aging and UV responses // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – T. 285. – №. 51. – P. 39819-39827.
159. Motohashi N., Asakura Y., Asakura A. Isolation, culture, and transplantation of muscle satellite cells // *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. – 2014. – №. 86. – P. e50846.
160. Muller P., Lemcke H., David R. Stem cell therapy in heart diseases—cell types, mechanisms and improvement strategies // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2018. – T. 48. – №. 6. – P. 2607-2655.
161. Mummery C.L., Zhang J., Ng E.S., Elliott D.A., Elefanty A.G., Kamp T.J. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview // *Circulation research*. – 2012. – T. 111. – №. 3. – P. 344-358.
162. Murohara T., Ikeda H., Duan J., Shintani S., Sasaki Ki., Eguchi H., Onitsuka I., Matsui K., Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization // *The Journal of clinical investigation*. – 2000. – T. 105. – №. 11. – P. 1527-1536.
163. Murry C.E., Wiseman R.W., Schwartz S.M., Hauschka S.D. Skeletal

- myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis // *The Journal of clinical investigation*. – 1996. – T. 98. – №. 11. – P. 2512-2523.
164. Murry C.E., Soonpaa M.H., Reinecke H., Nakajima H., Nakajima H.O., Rubart M., Pasumarthi K.B., Virag J.I., Bartelmez S.H., Poppa V., Bradford G., Dowell J.D., Williams D.A., Field L.J. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts // *Nature*. – 2004. – T. 428. – №. 6983. – P. 664-668.
165. Nakamura K., Murry C. E. Function Follows Form—A Review of Cardiac Cell Therapy // *Circulation Journal*. – 2019. – T. 83. – №. 12. – P. 2399-2412.
166. Narazaki G., Uosaki H., Teranishi M., Okita K., Kim B., Matsuoka S., Yamanaka S., Yamashita J.K. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells // *Circulation*. – 2008. – T. 118. – №. 5. – P. 498-506.
167. Nees S., Weiss D.R., Senftl A., Knott M., Förch S., Schnurr M., Weyrich P., Juchem G. Isolation, bulk cultivation, and characterization of coronary microvascular pericytes: the second most frequent myocardial cell type in vitro // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2012. – T. 302. – №. 1. – P. H69-H84.
168. Nelson T.J., Martinez-Fernandez A., Yamada S., Perez-Terzic C., Ikeda Y., Terzic A. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells // *Circulation*. – 2009. – T. 120. – №. 5. – P. 408-416.
169. Ng W., Ikeda S. Standardized, defined serum-free culture of a human skin equivalent on fibroblast-populated collagen scaffold // *Acta dermato-venereologica*. – 2011. – T. 91. – №. 4. – P. 387-391.
170. Nguyen P.K., Neofytou E., Rhee J.W., Wu J.C. Potential strategies to address the major clinical barriers facing stem cell regenerative therapy for cardiovascular disease: a review // *JAMA cardiology*. – 2016. – T. 1. – №. 8. – P. 953-962.

171. Oh H., Bradfute S.B., Gallardo T.D., Nakamura T., Gaussin V., Mishina Y., Pocius J., Michael L.H., Behringer R.R., Garry D.J., Entman M.L., Schneider M.D. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – T. 100. – №. 21. – P. 12313-12318.
172. Okada S., Vaeteewoottacharn K., Kariya R. Application of highly immunocompromised mice for the establishment of patient-derived xenograft (PDX) models // *Cells*. – 2019. – T. 8. – №. 8. – P. 889.
173. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium // *Nature*. – 2001. – T. 410. – №. 6829. – P. 701-705.
174. Pearl J.I., Lee A.S., Leveson-Gower D.B., Sun N., Ghosh Z., Lan F., Ransohoff J., Negrin R.S., Davis M.M., Wu J.C. Short-term immunosuppression promotes engraftment of embryonic and induced pluripotent stem cells // *Cell stem cell*. – 2011. – T. 8. – №. 3. – P. 309-317.
175. Pei Z., Lan X., Cheng Z., Qin C., Xia X., Yuan H., Ding Z., Zhang Y. Multimodality molecular imaging to monitor transplanted stem cells for the treatment of ischemic heart disease // *PloS one*. – 2014. – T. 9. – №. 3. – P. e90543.
176. Perin E.C., Willerson J.T., Pepine C.J., Henry T.D., Ellis S.G., Zhao D.X., Silva G.V., Lai D., Thomas J.D., Kronenberg M.W., Martin A.D., Anderson R.D., Traverse J.H., Penn M.S., Anwaruddin S., Hatzopoulos A.K., Gee A.P., Taylor D.A., Cogle C.R., Smith D., Westbrook L., Chen J., Handberg E., Olson R.E., Geither C., Bowman S., Francescon J., Baraniuk S., Piller L.B., Simpson L.M., Loghin C., Aguilar D., Richman S., Zierold C., Bettencourt J., Sayre S.L., Vojvodic R.W., Skarlatos S.I., Gordon D.J., Ebert R.F., Kwak M., Moyé L.A., Simari R.D. Effect of

- transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial // *Jama*. – 2012. – T. 307. – №. 16. – P. 1717-1726.
177. Perin E.C., Borow K.M., Silva G.V., DeMaria A.N., Marroquin O.C., Huang P.P., Traverse J.H., Krum H., Skerrett D., Zheng Y., Willerson J.T., Itescu S., Henry T.D. A phase II dose-escalation study of allogeneic mesenchymal precursor cells in patients with ischemic or nonischemic heart failure // *Circulation research*. – 2015. – T. 117. – №. 6. – P. 576-584.
178. Pfannkuche K., Liang H., Hannes T., Xi J., Fatima A., Nguemo F., Matzkies M., Wernig M., Jaenisch R., Pillekamp F., Halbach M., Schunkert H., Sarić T., Hescheler J., Reppel M. Cardiac myocytes derived from murine reprogrammed fibroblasts: intact hormonal regulation, cardiac ion channel expression and development of contractility // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2009. – T. 24. – №. 1-2. – P. 73-86.
179. Plotnikov E.Y., Silachev D.N., Popkov V.A., Zorova L.D., Pevzner I.B., Zorov S.D., Jankauskas S.S., Babenko V.A., Sukhikh G.T., Zorov D.B. Intercellular signalling cross-talk: to kill, to heal and to rejuvenate // *Heart, Lung and Circulation*. – 2017. – T. 26. – №. 7. – P. 648-659.
180. Protze S.I., Liu J., Nussinovitch U., Ohana L., Backx P.H., Gepstein L., Keller G.M. Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker // *Nature biotechnology*. – 2017. – T. 35. – №. 1. – P. 56-68.
181. Quijada P., Trembley M.A., Small E.M. The role of the epicardium during heart development and repair // *Circulation research*. – 2020. – T. 126. – №. 3. – P. 377-394.
182. Rabbani S., Soleimani M., Sahebjam M., Imani M., Nassiri S.M., Atashi A., Daliri Joupari M., Ghiaseddin A., Latifpour M., Ahmadi Tafti

- S.H. Effects of endothelial and mesenchymal stem cells on improving myocardial function in a sheep animal model // *The Journal of Tehran University Heart Center*. – 2017. – T. 12. – №. 2. – P. 65.
183. Rahbarghazi R., Nassiri S.M., Khazrainia P., Kajbafzadeh A.M., Ahmadi S.H., Mohammadi E., Molazem M., Zamani-Ahmadm Mahmudi M. Juxtacrine and paracrine interactions of rat marrow-derived mesenchymal stem cells, muscle-derived satellite cells, and neonatal cardiomyocytes with endothelial cells in angiogenesis dynamics // *Stem cells and development*. – 2013. – T. 22. – №. 6. – P. 855-865.
184. Rao K. S., Spees J. L. Harnessing Epicardial Progenitor Cells and Their Derivatives for Rescue and Repair of Cardiac Tissue After Myocardial Infarction // *Current molecular biology reports*. – 2017. – T. 3. – №. 3. – P. 149-158.
185. Rashedi I., Panigrahi S., Ezzati P., Ghavami S., Los M. Autoimmunity and apoptosis-therapeutic implications // *Current medicinal chemistry*. – 2007. – T. 14. – №. 29. – P. 3139-3151.
186. Redgrave R.E., Tual-Chalot S., Davison B.J., Singh E., Hall D., Amirrasouli M.M., Gilchrist D., Medvinsky A., Arthur H.M. Cardiosphere-derived cells require endoglin for paracrine-mediated angiogenesis // *Stem cell reports*. – 2017. – T. 8. – №. 5. – P. 1287-1298.
187. Renz J.F., Lin Z., de Roos M., Dalal A.A., Ascher N.L. SCID mouse as a model for transplantation studies // *Journal of Surgical Research*. – 1996. – T. 65. – №. 1. – P. 34-41.
188. Ribatti D., Nico B., Crivellato E. The role of pericytes in angiogenesis // *International Journal of Developmental Biology*. – 2011. – T. 55. – №. 3. – P. 261-268.
189. Riegler J., Tiburcy M., Ebert A., Tzatzalos E., Raaz U., Abilez O.J., Shen Q., Kooreman N.G., Neofytou E., Chen V.C., Wang M., Meyer T., Tsao P.S., Connolly A.J., Couture L.A., Gold J.D., Zimmermann W.H., Wu J.C. Human engineered heart muscles engraft and survive long term

- in a rodent myocardial infarction model // *Circulation research*. – 2015. – T. 117. – №. 8. – P. 720-730.
190. Rikhtegar R., Pezeshkian M., Dolati S., Safaie N., Afrasiabi Rad A., Mahdipour M., Nouri M., Jodati A.R., Yousefi M. Stem cells as therapy for heart disease: iPSCs, ESCs, CSCs, and skeletal myoblasts // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2019. – T. 109. – P. 304-313.
191. Risebro C.A., Vieira J.M., Klotz L., Riley P.R. Characterisation of the human embryonic and foetal epicardium during heart development // *Development*. – 2015. – T. 142. – №. 21. – P. 3630-3636.
192. Roedersheimer M., Nijmeh H., Burns N., Sidiakova A.A., Stenmark K.R., Gerasimovskaya E.V. Complementary effects of extracellular nucleotides and platelet-derived extracts on angiogenesis of vasa vasorum endothelial cells in vitro and subcutaneous Matrigel plugs in vivo // *Vascular cell*. – 2011. – T. 3. – №. 1. – P. 1-15.
193. Rojas S.V., Kensah G., Rotaermel A., Baraki H., Kutschka I., Zweigerdt R., Martin U., Haverich A., Gruh I., Martens A. Transplantation of purified iPSC-derived cardiomyocytes in myocardial infarction // *PloS one*. – 2017. – T. 12. – №. 5. – P. e0173222.
194. Rosamond W.D., Chambless L.E., Heiss G., Mosley T.H., Coresh J., Whitsel E., Wagenknecht L., Ni H., Folsom A.R. Twenty-two-year trends in incidence of myocardial infarction, coronary heart disease mortality, and case fatality in 4 US communities, 1987–2008 // *Circulation*. – 2012. – T. 125. – №. 15. – P. 1848-1857.
195. Rossini A., Frati C., Lagrasta C., Graiani G., Scopece A., Cavalli S., Musso E., Baccarin M., Di Segni M., Fagnoni F., Germani A., Quaini E., Mayr M., Xu Q., Barbuti A., DiFrancesco D., Pompilio G., Quaini F., Gaetano C., Capogrossi M.C. Human cardiac and bone marrow stromal cells exhibit distinctive properties related to their origin // *Cardiovascular research*. – 2011. – T. 89. – №. 3. – P. 650-660.
196. Rota M., Padin-Iruegas M.E., Misao Y., De Angelis A., Maestroni S.,

- Ferreira-Martins J., Fiumana E., Rastaldo R., Arcarese M.L., Mitchell T.S., Boni A., Bolli R., Urbanek K., Hosoda T., Anversa P., Leri A., Kajstura J. Local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescues scarred infarcted myocardium improving cardiac function // *Circulation research*. – 2008. – T. 103. – №. 1. – P. 107-116.
197. Roth G.A., Mensah G.A., Johnson C.O., Addolorato G., Ammirati E., Baddour L.M., Barengo N.C., Beaton A.Z., Benjamin E.J., Benziger .CP., Bonny A., Brauer M., Brodmann M., Cahill .TJ., Carapetis J., Catapano A.L., Chugh S.S., Cooper L.T., Coresh J., Criqui M., DeCleene N., Eagle K.A., Emmons-Bell S., Feigin V.L., Fernández-Solà J., Fowkes G., Gakidou E., Grundy S.M., He F.J., Howard G., Hu F., Inker L., Karthikeyan G., Kassebaum N., Koroshetz W., Lavie C., Lloyd-Jones D., Lu H.S., Mirijello A., Temesgen A.M., Mokdad A., Moran A.E., Muntner P., Narula J., Neal B., Ntsekhe M., Moraes de Oliveira G., Otto C., Owolabi M., Pratt M., Rajagopalan S., Reitsma M., Ribeiro A.L.P., Rigotti N., Rodgers A., Sable C., Shakil S., Sliwa-Hahnle K., Stark B., Sundström J., Timpel P., Tleyjeh I.M., Valgimigli M., Vos T., Whelton P.K., Yacoub M., Zuhlke L., Murray C., Fuster V. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 study // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2020. – T. 76. – №. 25. – P. 2982-3021.
198. Sacco A., Doyonnas R., Kraft P., Vitorovic S., Blau, H.M. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells // *Nature*. – 2008. – T. 456. – №. 7221. – P. 502-506.
199. Sanada F., Kim J., Czarna A., Chan N.Y., Signore S., Ogórek B., Isobe K., Wybieralska E., Borghetti G., Pesapane A., Sorrentino A., Mangano E., Cappetta D., Mangiaracina C., Ricciardi M., Cimini M., Ifedigbo E., Perrella M.A., Goichberg P., Choi A.M., Kajstura J., Hosoda T., Rota M., Anversa P., Leri A. c-Kit-positive cardiac stem cells nested in hypoxic niches are activated by stem cell factor reversing the aging myopathy

- //vCirculation research. – 2014. – T. 114. – №. 1. – P. 41-55.
200. Senyo S.E., Steinhauser M.L., Pizzimenti C.L., Yang V.K., Cai L., Wang M., Wu T.D., Guerquin-Kern J.L., Lechene C.P., Lee R.T. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes // Nature. – 2013. – T. 493. – №. 7432. – P. 433-436.
201. Severino P., D'Amato A., Pucci M., Infusino F., Adamo F., Birtolo L.I., Netti L., Montefusco G., Chimenti C., Lavalle C., Maestrini V., Mancone M., Chilian W.M., Fedele F. Ischemic heart disease pathophysiology paradigms overview: from plaque activation to microvascular dysfunction // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – T. 21. – №. 21. – P. 8118.
202. Shadrin I.Y., Allen B.W., Qian Y., Jackman C.P., Carlson A.L., Juhas M.E., Bursac N. Cardiopatch platform enables maturation and scale-up of human pluripotent stem cell-derived engineered heart tissues // Nature communications. – 2017. – T. 8. – №. 1. – P. 1-15.
203. Sheng C.C., Zhou L., Hao J. Current stem cell delivery methods for myocardial repair // BioMed research international. – 2013. – T. 2013.
204. Skorska A., Müller P., Gaebel R., Große J., Lemcke H., Lux C.A., Bastian M., Hausburg F., Zarniko N., Bubritzki S., Ruch U., Tiedemann G., David R., Steinhoff G. GMP-conformant on-site manufacturing of a CD133+ stem cell product for cardiovascular regeneration // Stem cell research & therapy. – 2017. – T. 8. – №. 1. – P. 1-15.
205. Sluijter J.P.G., Davidson S.M., Boulanger C.M., Buzás E.I., de Kleijn D.P.V, Engel F.B., Gircz Z., Hausenloy D.J., Kishore R., Lecour S., Leor J., Madonna R., Perrino C., Prunier F., Sahoo S., Schiffelers R.M., Schulz R., Van Laake L.W., Ytrehus K., Ferdinandy P. Extracellular vesicles in diagnostics and therapy of the ischaemic heart: Position Paper from the Working Group on Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology // Cardiovascular research. – 2018. – T. 114. – №. 1. – P. 19-34.

206. Smart N., Risebro C.A., Melville A.A., Moses K., Schwartz R.J., Chien K.R., Riley P.R. Thymosin β 4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization // *Nature*. – 2007. – T. 445. – №. 7124. – P. 177-182.
207. Smart N., Bollini S., Dubé K.N., Vieira J.M., Zhou B., Davidson S., Yellon D., Riegler J., Price A.N., Lythgoe M.F., Pu W.T., Riley P.R. De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury // *Nature*. – 2011. – T. 474. – №. 7353. – P. 640-644.
208. Smith R.R., Barile L., Cho H.C., Leppo M.K., Hare J.M., Messina E., Giacomello A., Abraham M.R., Marbán E. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens // *Circulation*. – 2007. – T. 115. – №. 7. – P. 896-908.
209. Spees J.L., Lee R.H., Gregory C.A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function // *Stem cell research & therapy*. – 2016. – T. 7. – №. 1. – P. 1-13.
210. Staton C.A., Reed M.W.R., Brown N.J. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays // *International journal of experimental pathology*. – 2009. – T. 90. – №. 3. – P. 195-221.
211. Steinhoff G., Nesteruk J., Wolfien M., Kundt G.; PERFECT Trial Investigators Group, Börgermann J., David R., Garbade J., Große J., Haverich A., Hennig H., Kaminski A., Lotz J., Mohr F.W., Müller P., Oostendorp R., Ruch U., Sarikouch S., Skorska A., Stamm C., Tiedemann G., Wagner F.M., Wolkenhauer O. Cardiac function improvement and bone marrow response—: Outcome analysis of the randomized perfect phase iii clinical trial of intramyocardial cd133+ application after myocardial infarction // *EBioMedicine*. – 2017. – T. 22. – P. 208-224.
212. Sultana N., Zhang L., Yan J., Chen J., Cai W., Razzaque S., Jeong D., Sheng W., Bu L., Xu M., Huang G.Y., Hajjar R.J., Zhou B., Moon A., Cai C.L. Resident c-kit+ cells in the heart are not cardiac stem cells //

- Nature communications. – 2015. – T. 6. – №. 1. – P. 1-10.
213. Suncion V.Y., Ghersin E., Fishman J.E., Zambrano J.P., Karantalis V., Mandel N., Nelson K.H., Gerstenblith G., DiFede Velazquez D.L., Breton E., Sitammagari K., Schulman I.H., Taldone S.N., Williams A.R., Sanina C., Johnston P.V., Brinker J., Altman P., Mushtaq M., Trachtenberg B., Mendizabal A.M., Tracy M., Da Silva J., McNiece I.K., Lardo A.C., George R.T., Hare J.M., Heldman A.W. Does transendocardial injection of mesenchymal stem cells improve myocardial function locally or globally? An analysis from the Percutaneous Stem Cell Injection Delivery Effects on Neomyogenesis (POSEIDON) randomized trial // *Circulation research*. – 2014. – T. 114. – №. 8. – P. 1292-1301.
214. Szade K., Zukowska M., Szade A., Collet G., Kloska D., Kieda C., Jozkowicz A., Dulak J. Spheroid-plug model as a tool to study tumor development, angiogenesis, and heterogeneity in vivo // *Tumor Biology*. – 2016. – T. 37. – №. 2. – P. 2481-2496.
215. Szydlak R. Mesenchymal stem cells' homing and cardiac tissue repair // *Acta Biochimica Polonica*. – 2019. – T. 66. – №. 4. – P. 483-489.
216. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *cell*. – 2006. – T. 126. – №. 4. – P. 663-676.
217. Tang X.L., Rokosh G., Sanganalmath S.K., Yuan F., Sato H., Mu J., Dai S., Li C., Chen N., Peng Y., Dawn B., Hunt G., Leri A., Kajstura J., Tiwari S., Shirk G., Anversa P., Bolli R. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction // *Circulation*. – 2010. – T. 121. – №. 2. – P. 293-305.
218. Taylor M., Jefferies J., Byrne B., Lima J., Ambale-Venkatesh B., Ostovaneh M.R., Makkar R., Goldstein B., Smith R.R., Fudge J., Malliaras K., Fedor B., Rudy J., Pogoda J.M., Marban L., Ascheim D.D.,

- Marban E., Victor R.G. Cardiac and skeletal muscle effects in the randomized HOPE-Duchenne trial // *Neurology*. – 2019. – T. 92. – №. 8. – P. e866-e878.
219. Teerlink J.R., Metra M., Filippatos G.S., Davison B.A., Bartunek J., Terzic A., Gersh B.J., Povsic T.J., Henry T.D., Alexandre B., Homsy C., Edwards C., Seron A., Wijns W., Cotter G. Benefit of cardiopoietic mesenchymal stem cell therapy on left ventricular remodelling: results from the Congestive Heart Failure Cardiopoietic Regenerative Therapy (CHART-1) study // *European journal of heart failure*. – 2017. – T. 19. – №. 11. – P. 1520-1529.
220. Terrovitis J.V., Smith R.R., Marbán E. Assessment and optimization of cell engraftment after transplantation into the heart // *Circulation research*. – 2010. – T. 106. – №. 3. – P. 479-494.
221. Thygesen K., Alpert J.S., Jaffe A.S., Simoons M.L., Chaitman B.R., White H.D. Third universal definition of myocardial infarction // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2012. – T. 60. – №. 16. – P. 1581-1598.
222. Tillmanns J., Rota M., Hosoda T., Misao Y., Esposito G., Gonzalez A., Vitale S., Parolin C., Yasuzawa-Amano S., Muraski J., De Angelis A., Lecapitaine N., Siggins R.W., Loredi M., Bearzi C., Bolli R., Urbanek K., Leri A., Kajstura J., Anversa P. Formation of large coronary arteries by cardiac progenitor cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – T. 105. – №. 5. – P. 1668-1673.
223. Timmers L., Lim S.K., Hoefler I.E., Arslan F., Lai R.C., van Oorschot A.A., Goumans M.J., Strijder C., Sze S.K., Choo A., Piek J.J., Doevendans P.A., Pasterkamp G., de Kleijn D.P. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction // *Stem cell research*. – 2011. – T. 6. – №. 3. – P. 206-214.
224. Tseliou E., Pollan S., Malliaras K., Terrovitis J., Sun B., Galang G.,

- Marbán L., Luthringer D., Marbán E. Allogeneic cardiospheres safely boost cardiac function and attenuate adverse remodeling after myocardial infarction in immunologically mismatched rat strains // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2013. – T. 61. – №. 10. – P. 1108-1119.
225. Tseliou E., Tseliou E., de Couto G., Terrovitis J., Sun B., Weixin L., Marban L., Marban E. Angiogenesis, cardiomyocyte proliferation and anti-fibrotic effects underlie structural preservation post-infarction by intramyocardially-injected cardiospheres // *PloS one*. – 2014. – T. 9. – №. 2. – P. e88590.
226. Tseliou E., Fouad J., Reich H., Slipczuk L., de Couto G., Aminzadeh M., Middleton R., Valle J., Weixin L., Marban E. Fibroblasts rendered antifibrotic, antiapoptotic, and angiogenic by priming with cardiosphere-derived extracellular membrane vesicles // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2015. – T. 66. – №. 6. – P. 599-611.
227. Urayama K., Guilini C., Turkeri G., Takir S., Kurose H., Messaddeq N., Dierich A., Nebigil C.G. Prokineticin receptor-1 induces neovascularization and epicardial-derived progenitor cell differentiation // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2008. – T. 28. – №. 5. – P. 841-849.
228. Urbanek K., Rota M., Cascapera S., Bearzi C., Nascimbene A., De Angelis A., Hosoda T., Chimenti S., Baker M., Limana F., Nurzynska D., Torella D., Rotatori F., Rastaldo R., Musso E., Quaini F., Leri A., Kajstura J., Anversa P. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival // *Circulation research*. – 2005. – T. 97. – №. 7. – P. 663-673.
229. Van Berlo J.H., Kanisicak O., Maillet M., Vagnozzi R.J., Karch J., Lin S.C., Middleton R.C., Marbán E., Molkenkin J.D. C-kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart // *Nature*. – 2014. – T. 509. – №.

7500. – P. 337-341.
230. Van der Windt D.J., Echeverri G.J., Ijzermans J.N., Cooper D.K. The choice of anatomical site for islet transplantation // *Cell transplantation*. – 2008. – T. 17. – №. 9. – P. 1005-1014.
231. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes // *Genome biology*. – 2002. – T. 3. – №. 7. – P. 1-12.
232. Van Weerd J.H., Christoffels V.M. The formation and function of the cardiac conduction system // *Development*. – 2016. – T. 143. – №. 2. – P. 197-210.
233. Veltman C.E., Soliman O.I., Geleijnse M.L., Vletter W.B., Smits P.C., ten Cate F.J., Jordaens L.J., Balk A.H., Serruys P.W., Boersma E., van Domburg R.T., van der Giessen W.J. Four-year follow-up of treatment with intramyocardial skeletal myoblasts injection in patients with ischaemic cardiomyopathy // *European heart journal*. – 2008. – T. 29. – №. 11. – P. 1386-1396.
234. Vrtovec B., Poglajen G., Lezaic L., Sever M., Socan A., Domanovic D., Cernele P., Torre-Amione G., Haddad F., Wu J.C. Comparison of transendocardial and intracoronary CD34+ cell transplantation in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy // *Circulation*. – 2013. – T. 128. – №. 11_suppl_1. – P. S42-S49.
235. Wang L., Deng J., Tian W., Xiang B., Yang T., Li G., Wang J., Gruwel M., Kashour T., Rendell J., Glogowski M., Tomanek B., Freed D., Deslauriers R., Arora R.C., Tian G. Adipose-derived stem cells are an effective cell candidate for treatment of heart failure: an MR imaging study of rat hearts // *American journal of physiology-heart and circulatory physiology*. – 2009. – T. 297. – №. 3. – P. H1020-H1031.
236. Wei K., Serpooshan V., Hurtado C., Diez-Cuñado M., Zhao M., Maruyama S., Zhu W., Fajardo G., Nosedá M., Nakamura K., Tian X.,

- Liu Q., Wang A., Matsuura Y., Bushway P., Cai W., Savchenko A., Mahmoudi M., Schneider M.D., van den Hoff M.J., Butte M.J., Yang P.C., Walsh K., Zhou B., Bernstein D., Mercola M., Ruiz-Lozano P. Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart // *Nature*. – 2015. – T. 525. – №. 7570. – P. 479-485.
237. Welt F.G.P., Gallegos R., Connell J., Kajstura J., D'Amario D., Kwong R.Y., Coelho-Filho O., Shah R., Mitchell R., Leri A., Foley L., Anversa P., Pfeffer M.A. Effect of cardiac stem cells on left-ventricular remodeling in a canine model of chronic myocardial infarction // *Circulation: Heart Failure*. – 2013. – T. 6. – №. 1. – P. 99-106.
238. Witt R., Weigand A., Boos A.M., Cai A., Dippold D., Boccaccini A.R., Schubert D.W., Hardt M., Lange C., Arkudas A., Horch R.E., Beier J.P. Mesenchymal stem cells and myoblast differentiation under HGF and IGF-1 stimulation for 3D skeletal muscle tissue engineering // *BMC cell biology*. – 2017. – T. 18. – №. 1. – P. 1-16.
239. Wolfien M., Klatt D., Salybekov A.A., Ii M., Komatsu-Horii M., Gaebel R., Philippou-Massier J., Schrunner E., Akimaru H., Akimaru E., David R., Garbade J., Gummert J., Haverich A., Hennig H., Iwasaki H., Kaminski A., Kawamoto A., Klopsch C., Kowallick J.T., Krebs S., Nesteruk J., Reichenspurner H., Ritter C., Stamm C., Tani-Yokoyama A., Blum H., Wolkenhauer O., Schambach A., Asahara T., Steinhoff G. Hematopoietic stem-cell senescence and myocardial repair-Coronary artery disease genotype/phenotype analysis of post-MI myocardial regeneration response induced by CABG/CD133+ bone marrow hematopoietic stem cell treatment in RCT PERFECT Phase 3 // *EBioMedicine*. – 2020. – T. 57. – P. 102862.
240. Xu D., Alipio Z., Fink L.M., Adcock D.M., Yang J., Ward D.C., Ma Y. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – T. 106. – №. 3. – P. 808-813.

241. Xu L.J., Xue B., Shan Y., Chen D., Gao J., Yang D., Sun C., Cui Y. In vivo determination of muscle-derived stem cells in rat corpus cavernosum // *Genet Mol Res.* – 2015. – T. 14. – №. 3. – P. 9951-62.
242. Yaniv Y., Spurgeon H.A., Lyashkov A.E., Yang D., Ziman B.D., Maltsev V.A., Lakatta E.G. Crosstalk between mitochondrial and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling modulates cardiac pacemaker cell automaticity // *PloS one.* – 2012. – T. 7. – №. 5. – P. e37582.
243. Yao T., Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues // *Reproductive medicine and biology.* – 2017. – T. 16. – №. 2. – P. 99-117.
244. Ye W., Wang J., Song Y., Yu D., Sun C., Liu C., Chen F., Zhang Y., Wang F., Harvey R.P., Schrader L., Martin J.F., Chen Y. A common Shox2–Nkx2-5 antagonistic mechanism primes the pacemaker cell fate in the pulmonary vein myocardium and sinoatrial node // *Development.* – 2015. – T. 142. – №. 14. – P. 2521-2532.
245. Yoo K.J., Li R.K., Weisel R.D., Mickle D.A., Li G., Yau T.M. Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy // *The Annals of thoracic surgery.* – 2000. – T. 70. – №. 3. – P. 859-865.
246. Yu H., Lu K., Zhu J., Wang J.A. Stem cell therapy for ischemic heart diseases // *British medical bulletin.* – 2017. – T. 121. – №. 1. – P. 135-154.
247. Yue Y., Wang C., Benedict C., Huang G., Truongcao M., Roy R., Cimini M., Garikipati V.N.S., Cheng Z., Koch W.J., Kishore R. Interleukin-10 deficiency alters endothelial progenitor cell-derived exosome reparative effect on myocardial repair via integrin-linked kinase enrichment // *Circulation research.* – 2020. – T. 126. – №. 3. – P. 315-329.
248. Zakharova I.S., Zhiven' M.K., Saaya S.B., Shevchenko A.I., Smirnova A.M., Strunov A., Karpenko A.A., Pokushalov E.A., Ivanova L.N.,

- Makarevich P.I., Parfyonova Y.V., Aboian E., Zakian S.M. Endothelial and smooth muscle cells derived from human cardiac explants demonstrate angiogenic potential and suitable for design of cell-containing vascular grafts // *Journal of translational medicine*. – 2017. – T. 15. – №. 1. – P. 1-18.
249. Zangi L., Lui K.O., von Gise A., Ma Q., Ebina W., Ptaszek L.M., Später D., Xu H., Tabebordbar M., Gorbатов R., Sena B., Nahrendorf M., Briscoe D.M., Li R.A., Wagers A.J., Rossi D.J., Pu W.T., Chien K.R. Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction // *Nature biotechnology*. – 2013. – T. 31. – №. 10. – P. 898-907.
250. Zarniko N., Skorska A., Steinhoff G., David R., Gaebel R. Dose-independent therapeutic benefit of bone marrow stem cell transplantation after MI in mice // *Biomedicines*. – 2020. – T. 8. – №. 6. – P. 157.
251. Zaruba M.M., Soonpaa M., Reuter S., Field L.J. Cardiomyogenic potential of C-Kit⁺-expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts // *Circulation*. – 2010. – T. 121. – №. 18. – P. 1992-2000.
252. Zhang J., Wilson G.F., Soerens A.G., Koonce C.H., Yu J., Palecek S.P., Thomson J.A., Kamp T.J. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells // *Circulation research*. – 2009. – T. 104. – №. 4. – P. e30-e41.
253. Zhang X.H., Wei H., Šarić T., Hescheler J., Cleemann L., Morad M. Regionally diverse mitochondrial calcium signaling regulates spontaneous pacing in developing cardiomyocytes // *Cell calcium*. – 2015. – T. 57. – №. 5-6. – P. 321-336.
254. Zhang Z., Tan Y., Zhu L., Zhang B., Feng P., Gao E., Xu C., Wang X., Yi W., Sun Y. Asprosin improves the survival of mesenchymal stromal cells in myocardial infarction by inhibiting apoptosis via the activated ERK1/2-SOD2 pathway // *Life sciences*. – 2019. – T. 231. – P. 116554.
255. Zhao L., Johnson T., Liu D. Therapeutic angiogenesis of adipose-

- derived stem cells for ischemic diseases // *Stem cell research & therapy*. – 2017. – Т. 8. – №. 1. – P. 1-9.
256. Zhao Z.A., Han X., Lei W., Li J., Yang Z., Wu J., Yao M., Lu X.A., He L., Chen Y., Zhou B., Hu S. Lack of cardiac improvement after cardiosphere-derived cell transplantation in aging mouse hearts // *Circulation research*. – 2018. – Т. 123. – №. 10. – P. e21-e31.
257. Zhou B., Honor L.B., He H., Ma Q., Oh J.H., Butterfield C., Lin R.Z., Melero-Martin J.M., Dolmatova E., Duffy H.S., Gise Av., Zhou P., Hu Y.W., Wang G., Zhang B., Wang L., Hall J.L., Moses M.A., McGowan F.X., Pu W.T. Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors // *The Journal of clinical investigation*. – 2011. – Т. 121. – №. 5. – P. 1894-1904.
258. Zhou B., Honor L.B., Ma Q., Oh J.H., Lin R.Z., Melero-Martin J.M., von Gise A., Zhou P., Hu T., He L., Wu K.H., Zhang H., Zhang Y., Pu W.T. Thymosin beta 4 treatment after myocardial infarction does not reprogram epicardial cells into cardiomyocytes // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 2012. – Т. 52. – №. 1. – P. 43-47.
259. Zudaire E., Gambardella L., Kurcz C., Vermeren S. A computational tool for quantitative analysis of vascular networks // *PloS one*. – 2011. – Т. 6. – №. 11. – P. e27385.
260. Zwetsloot P.P., Végh A.M., Jansen of Lorkeers S.J., van Hout G.P., Currie G.L., Sena E.S., Gremmels H., Buikema J.W., Goumans M.J., Macleod M.R., Doevendans P.A., Chamuleau S.A., Sluijter J.P. Cardiac stem cell treatment in myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies // *Circulation research*. – 2016. – Т. 118. – №. 8. – P. 1223-1232.
261. Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б., Ратнер Е.И., Молокотина Ю.Д., Парфенова, Е.В. Характеристика ангиогенных свойств c-kit⁺-клеток миокарда // *Гены и клетки*. – 2018. – Т. 13. – №. 3. – С. 82-88.

262. Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б., Ратнер Е.И., Парфенова Е.В. Сравнительная эффективность эпикардиальной трансплантации прогениторных клеток сердца в виде клеточных пластов и интрамиокардиальных инъекций при стимуляции регенеративных процессов в постинфарктном сердце // Кардиология. – 2019. – Т. 59. – №. 5. – С. 53-60.
263. Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Василец Ю.Д., Белоглазова И.Б., Кульбицкий Б.Н., Парфенова Е.В. Гипоксия как возможный регулятор активности эпикардиальных клеток мезотелия после инфаркта миокарда // Кардиология. – 2021. – Т. 61. – №. 6. – С. 59-68.
264. Захарова И.С., Живень М.К., Саая Ш.Б., Шевченко А.И., Струнов А.А., Иванова Л.Н., Карпенко А.А., Покушалов Е.А., Закиян С. М. Разработка клеточных технологий для создания клеточно-наполненных сосудистых трансплантатов // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19. – №. S4-2. – С. 43-54.
265. Карпов Ю.А., Кухарчук В.В., Лякишев А.А., Лупанов В.П., Панченко Е.П., Комаров А.Л., Ширяев А.А., Самко А.Н., Соболева Г.Н., Сорокин Е.В. Диагностика и лечение хронической ишемической болезни сердца // Кардиологический вестник. – 2015. – Т. 10. – №. 3. – С. 3-33.
266. Коваль С.Н., Милославский Д.К., Снегурская И.А., Божко В.В., Мысниченко О.В., Щенявская Е.Н. Терапевтический ангиогенез при заболеваниях внутренних органов возможности и перспективы // Вестник проблем биологии и медицины. – 2013. – Т. 1. – №. 4. – С. 20-27.
267. Милевская Е.А. Немудрый А.А., Чепелева Е.В., Малахова А.А., Павлова С.В., Докучаева А.А., Сергеевичев Д.С., Закиян С.М. Оптимизация протокола интрамиокардиальной трансплантации с

- использованием люминесценции кардиальных мезенхимальных клеток, маркированных экспрессией люциферазы // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19. – №. S4-2. – С. 69-76.
268. Павлова С.В., Перовский П.П., Чепелева Е.В., Малахова А.А., Дементьева Е.В., Покушалов Е.А., Сухих Г.Т., Закиян С.М. Характеристика кардиальных культур клеток, полученных из экспланта сердечной мышцы человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2013. – №. 3. – С. 132-140.
269. Павлова С.В., Розанова И.А., Чепелева Е.В., Малахова А.А., Лыков А.П., Покушалов Е.А., Закиян С.М. Ангиогенный потенциал кардиальных стволовых и мезенхимальных стромальных клеток костного мозга крысы // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19. – № 4-2. – С. 77-84.
270. Павлова С.В., Сергеевичев Д.С., Чепелева Е.В., Козырева В.С., Малахова А.А., Захарова И.С., Григорьева Е.В., Покушалов Е.А., Закиян С.М. Сравнение мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и региональных стволовых клеток сердца и фибробластов кожи человека // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19. – №. S4-2. – С. 12-19.
271. Павлова С.В., Леонова Е.А., Чепелева Е.В., Докучаева А.А., Сергеевичев Д.С., Покушалов Е.А. Мониторинг трансплантации кардиальных клеток в зону ишемического поражения миокарда с использованием люциферазной репортерной системы // Гены и клетки. – 2017. – Т. 12. – №. 4. – С. 69-75.
272. Павлова С.В., Чепелева Е.В., Дементьева Е.В., Григорьева Е.В., Сорокоумов Е.Д., Слотвицкий М.М., Пономаренко А.В., Малахова А.А., Докучаева А.А., Сергеевичев Д.С., Покушалов Е.А., Закиян С.М. Исследование выживаемости и функциональной активности кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК человека, при

- трансплантации в мышей линии SCID // Гены и клетки. – 2018. – Т. 13. – №. 4. – С. 51-60.
273. Парфенова Е.В. Стволовые клетки сердца: факт или фантазия? // Российский кардиологический журнал. – 2019. – №. 11. – С. 84-90.
274. Савченко С.В., Гребенщикова А.С., Бгатова Н.П., Таскаева Ю.С., Летягин А.Ю., Новоселов В.П. Патоморфология миокарда и ультраструктура эндотелиоцитов кровеносных капилляров мышцы сердца при ожоговой септикотоксемии // Современные проблемы науки и образования. – 2021. – № 1. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=30497> (дата обращения: 30.03.2022).
275. Тихонов В.Н., Ларионов П.М., Тихонов А.В. Использование мини-свиней в качестве модели для разработки новых методов лечения ишемической болезни сердца // Атеросклероз. – 2010. – Т. 6. – №. 2. – С. 28-39.
276. Трухан И.С. Питательная среда как ключевой фактор культивирования клеток млекопитающих // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2018. – №. 12-1. – С. 165-172.
277. Чепелева Е.В., Павлова С.В., Малахова А.А., Милевская Е.А., Русакова Я.Л., Подхватилина Н.А., Сергеевичев Д.С., Покушалов Е.А., Караськов А.М., Сухих Г.Т., Закиян.С.М. Терапия хронического кардиосклероза у крыс линии WAG культурами кардиоваскулярных клеток, обогащенными стволовыми клетками сердца // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2015. – №3. – С.191-201.
278. Шаманская Т. В., Осипова Е. Ю., Румянцев С. А. Технологии культивирования мезенхимальных стволовых клеток *ex vivo* для клинического использования // Онкогематология. – 2009. – №. 3. – С. 69-76.