УДК 551.2.05+577.32:57.089.64+602.9+612.419+616.12-089(008.46)+616-092.4(9)+616-005.4(8)

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ФАКТОРОВ РОСТА НА АНГИОГЕНЕЗ И НАСОСНУЮ ФУНКЦИЮ СЕРДЦА ПОСЛЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА У КРЫС

© Вячеслав Юрьевич Михайличенко[1], Сергей Александрович Самарин[1], Александр Иванович Тюкавин[2], Евгений Александрович Захаров[2]

[1] Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского, Медицинская академия им. С. И. Георгиевского 295006, Российская Федерация, Республика Крым, г.Симферополь, бульвар Ленина, 5/7.

[2] Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Минздрава России 197376, Санкт-Петербург, Профессора Попова ул., д. 14, лит. А

Контактная информация: Александр Иванович Тюкавин — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой физиологии и патологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. E-mail: atuykavin@mail.ru

Резюме. В последнее десятилетие внимание ученых различных стран мира обращено на возможность использования эндо- или экзогенного пула мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК). В работе на инбредной линии крыс Вистар-Кайота изучена эффективность использования мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток, коммитированых в кардиомиоцитарном направлении мультипотентныхмезенхимальных стволовых клеток и гранулоцитарного стимулирующего фактора роста при инфаркте миокарда. Доказано с помощью реакции гибридизациии с Y-хромосомой, что клеточный трансплантат обнаруживается в зоне ишемии, т.е. «хоуминг» эффект. Установлено, что главный эффект трансплантации ММСК проявляется в неоваскулогенезе и паракринном влиянии на поврежденный миокард, что приводит к значительному уменьшению зоны ИМ и восстановлению элементов гибернирующего миокарда. Эффективность ангиогенеза подтверждена увеличением количества сосудов в зоне ишемии, возрастанием концентрации оксида азота и VEGF, FGF, а также снижением содержания эндотелина-1. Вышеописанные эффекты клеточной кардиомиопластики приводят к функциональному восстановлению сердечной мышцы и улучшению морфологической картины сердца.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, клеточная кардиомиопластика, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, ангиогенез.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF THE EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELLS AND GROWTH FACTORS ON ANGIOGENESIS AND THE PUMPING FUNCTION OF THE HEART IN RATS AFTER A MYOCARDIAL INFARCTION

© Vyacheslav Yu. Mykhaylichenko[1], Sergey A. Samarin[1], Alexander I. Tyukavin[2], Evgeny A. Zaharov[2]

[1] Krymsk Federal University V.I. Vernadsky, Medical Academy. S. I. Georgievsky 1295006, Russian Federation, Republic of Crimea, Simferopol, Lenin Boulevard, 5/7.

[2] St. Petersburg State University of Chemistry and Pharmacy of the Russian Ministry of Health 197376, St. Petersburg, Professor Popov St., d. 14, lit. A

Contact Information: Alexander I. Tyukavin — PhD, Professor, Head of the Department of physiology and pathologySt. Petersburg State University of Chemistry and Pharmacy of the Russian Ministry of Health. E-mail: atuykavin@mail.ru

Abstract. In the last decade, the attention of different scientists across the globe was drawn to the possibility of using endogenous or exogenous pools of multipotent mesenchymal stem cells (MMSC). The use of Wistar-Coyote rats (inbred strains) to demonstrate the efficiency of multipotent mesenchymal stem cells that are able to differentiate into cardiomyo-

cytes has been well established. Additionally, the role of granulocyte colony stimulating factor during myocardial infraction has been well documented in the scientific literature. A hybridization reaction with the Y-chromosome proved that the cell transplant is found in zones of ischemia, i.e. the “homing” effect. It has been demonstrated that the main effect of MMSC transplantation is neovascularization, which leads to a significant reduction to the area of myocardium damage following a myocardial infraction restoring areas of hibernated myocardium. The efficiency of angiogenesis is confirmed by the increase in the number of vessels in the ischemic zone, a rise in the concentration of nitric oxide, vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor and decreased levels of endothelin 1. The mechanisms described above of ‘cellular cardiomyoplasty’ results in the reestablishment of cardiomyocyte functionality and an improved cardiac morphology.

Keywords: myocardial infarction, cellular cardiomyoplasty, multipotent mesenchymal stem cells, angiogenesis.

Эффективность фармакологической терапии и хирургических методов лечения постинфарктной сердечной недостаточности достигает своего апогея. Дальнейший прогресс в этой области, особенно у пациентов подвергнутых хирургическим вмешательствам на сосудах сердца и страдающих сахарным диабетом, связывают с разработкой альтернативных технологий реваскуляризации и регенерации поврежденной сердечной мышцы [1–4].

На протяжении многих лет в кардиологии главенствовала парадигма, согласно которой сердце рассматривали как окончательно дифференцированный орган, не способный к самообновлению [3, 5–7]. Выявление в миокарде кардиосфер, резидентных кардиальных стволовых клеток (КСК) и способности мезенхимальных стволовых клеток дифференцироваться в кардиомиоциты [3, 8, 9] привело к пересмотру традиционных представлений. В настоящее время не вызывает сомнений гетерогенность популяции миоцитов в сердце, которые постоянно гибнут и обновляются, поддерживая стационарное состояние миокарда. Установлено, что CD34- и CB133-позитивные клетки, эндотелиальные прогенеторы, мезенхимные стромальные клетки костного мозга и кортикальные СК костного мозга могут участвовать в кардиомиогенезе [10]. Показано, что скорость регенерации миокарда млекопитающих, включая человека, в норме и при патологии может составлять от 0,05 % до 40 % в год [11].

Вместе с тем, функциональная роль отдельных популяций стволовых клеток в восстановлении целостности сердечной мышцы после ишемического повреждения остается во многом неясной. Не вызывает сомнений вероятность участия в этом процессе мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Они способны (*in vitro*) под влиянием ростовых факторов трансформироваться в кардиомиоциты [4,12]. Вместе с тем трансформация мезенхимальных стволовых клеток в типичные кардиомиоциты после трансплантации в миокард *in vivo* не доказана. В сердце после клеточной терапии выявляют немногочисленные МСК, экспрессирующие миокардиальные маркеры (альфа-актин гладкомышечных клеток, десмин, тяжелые цепи β-миозина, сердечный тропонин Т и др.) [4,10,13,14]. Вместе с тем, это не является очевидным аргументом в пользу наличия у этих клеток сократительной функции. Показано, что лечебный эффект МСК проявляется уже через несколько дней после их введения. Однако, этого времени явно недостаточно для полноценной трансдифференцировки МСК в кардиомиоциты [15–18].

В настоящее время исследователи все больше склоняются к представлению, согласно которому МСК влияют на кардиомиогенез опосредованно. Они восстанавливают кровоснабжение сердечной мышцы за счет стимуляции роста сосудов многочисленными цитокинами, а также факторами роста, носителями которых МСК являются [9,11].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительная оценка эффектов мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на ангиогенез и насосную функцию сердца после инфаркта миокарда.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на шестимесячных особях инбредной линии Вистар-Киото средней массой 300 ± 10 г. Животные этой линнии обладают высокой степенью гомозиготности по большинству генов, что максимально приближало аллогенную трансплантацию клеток к условиям аутотрансплантации. Моделирование инфаркта миокарда (ИМ) выполнялось на крысах самках, в то время как для забора и дальнейшей трансплантации использовали клетки, полученные из костного мозга доноров самцов. Это позволяло идентифицировать трансплантируемые клетки в организме реципиента с помощью Y-хромосомы.

Для проведения исследования было сформировано 6 групп животных:

- 1 группа (n=15) контрольная — интактные животные, результаты которых использовались для дальнейшей стандартизации проводимых инструментальных и лабораторных методов исследования.
- 2 группа (n=30) — крысы, оперативное вмешательство которым ограничивалось исключительно выполнением торакотомии.
- 3 группа (n=30) — крысы, которым помимо торакотомии выполнялось моделирование ИМ.
- 4 группа (n=30) — крысы, которым после ИМ выполняли трансплантацию ММСК.
- 5 группа (n=30) — крысы, которым после ИМ выполняли трансплантацию коммитированных стволовых клеток (кММСК).

- 6 группа (n=30) — крысы, которым после ИМ в течении 5 сут. подкожно вводили Г-КСФ (Граноцит, SanofiAventis) в дозе 200мкг/кг.

ИМ моделировали под наркозом (калипсол, ксилазин) в дозе 60 мг/кг и 7,5 мг/кг на фоне искусственной вентиляции легких через трахеостому. Передняя левожелудочковая артерия перевязывалась на уровне левого ушка после ее первого деления. Наличие ишемии и ИМ после перевязки коронарной артерии определяли визуально, а также по ЭКГ и УЗИ обследованию сердца. Зона ИМ определялась патоморфологически после выведения животного из опыта.

Для получения культуры мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) использовали костный мозг здоровых животных крыс-самцов. Крысиные ММСК определяли: негативно — CD 45, CD 34, c-kit (CD117); позитивно — CD 90, SSEA-1, CD 73 [19]. Фенотипирование МСК проводили методом проточной цитофлюориметрии (PartecCyFlowSL) с использованием мышиных моноклональных антител (Dako). Количество ММСК в клеточной культуре составил 4–6 %. Коммитацию мезенхимальных стволовых клеток (кММСК) проводили по Tomita (1999). Для этого среду меняли на IMDM («Gibco», Великобритания), содержащую дополнительно инсулин (0.4 мкМ/л), дексаметазон (10 нМ/л) и фактор роста фибробластов b (FGFb) («Sigma», USA), а также азацитидин, 10 %-ю бычью эмбриональную сыворотку (Биолот, Санкт-Петербург). Через 3 недели культивирования материал был готов для трансплантации животным. У животных всех групп методом твердофазного иммуноферментного анализа определяли суммарную концентрацию нитрат и нитрит ионов, а также содержание эндотелин-1 (ЭТ-1), Vascularendothelialgrowth factor (VEGF) и Fibroblastgrowthfactors(FGF) в сыворотке крови.

Миокард окрашивали по Ван-Гизону. Актин, тропинин и пролиферирующие клетки выявляли иммуногистохимическими методами с использованием первичных антител к тропонину T (клон JLT-12, Sigma-Aldrich, Германия), PCNA (клон PC10, DAKO, Дания), к актину (клон HHF35, DAKO, Дания). Их визуализацию проводили с помощью системы детекции DAKO Advance и красителя DAB+. Регенерационный потенциал ткани оценивали в растворе Antigen Retrieval Solution (DAKO, Дания).

Для детекции введенных клеток, взятых от самцов, использовали 2 этапную гибридизацию *in situ* с определением Y-хромосомы. На I этапе материал обрабатывали раствором протеиназы К. Срезы денатурировали в гибридизаторе DAKO Hybridizer, а затем, при температуре 37°C на протяжении 1 ч. На II этапе применяли пробу к Y-хромосомам (ID Labs Biotechnology, США), меченым биотином и FITC. В последующем срезы промывали и проводили детекцию с помощью систем DAKO GenPoint с тирамидной амплификацией. Препараты окрашивали дополнительно гематоксилином Майера, после чего их заключали в канадский бальзам.

Патоморфологические исследования препаратов проводили с помощью световой микроскопии (Axiostar, Carl Zeiss). Микрофотографирование и морфометрические исследования проводили на микроскопе Olympus AX70 с использованием программы AnalySISPro 3.2 (SoftImaging). УЗИ сердца крыс выполняли под наркозом на аппарате GE Vivid (США) датчиком 12МГц.

Культуру ММСК и кММСК вводили внутривенно к концу первых суток после моделирования ИМ, Г-КСФ вводили подкожно также с первых суток эксперимента. Хоуминг-эффект и насосную функцию сердца оценивали на 30-е сутки эксперимента.

Культура ММСК вводилась крысам 4-ой группы в бедренную вену из расчета $1x10^6$ клеток на одно животное. Культура клеток кММСК вводилась крысам 5-ой группы в бедренную вену из расчета $1x10^6$ клеток на одно животное.

Нормальное распределение данных оценивали по тесту Шапиро-Уилка (W). Для выявления существенных различий между средними значениями различных совокупностей сопоставимых групп применяли методы вариационной статистики с использованием t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений при вероятности ошибки I рода, p=0,05. Достоверными считали различия данных при p <0,05. Для выявления наличия статистической связи между парой признаков применяли корреляционный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние ММСК и кММСК, а также Г-КСФ на процессы васкуляризации миокарда и морфогенез рубцов в сердечной мышце после инфаркта миокарда (рис. 1).

ММСК. Морфометрический анализ зоны ишемии миокарда (табл. 1) показал, что удельный объем участка ИМ у крыс, которым вводились ММСК, уменьшился в 2,5 раза и составил 24,02 % вместо 65,8 % в группе животных без

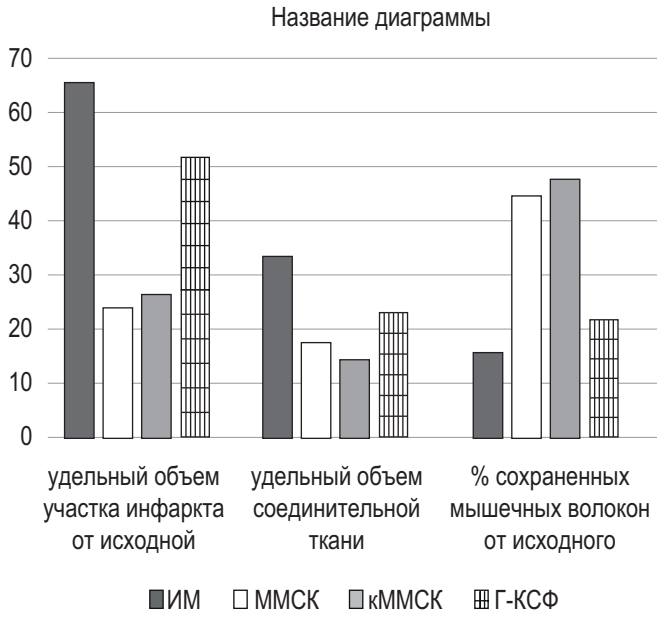

Рис. 1. Изменения % площади инфаркта и размер рубцов при введении ММСК и кММСК, а также Г-КСФ

Таблица 1

Морфометрические показатели васкуляризации миокарда после ИМ и трансплантации ММСК, кММСК и введения Г-КСФ

Средние по группам	ИМ	ММСК	кМСК	Г-КСФ
Удельный объем участка инфаркта от исходной ткани, %	65,83	24,02***	26,84**	52,25
SD	8,21	1,04	8,07	4,25
Удельный объем соединительной ткани, включая сосуды, %	33,78	17,73**	15,39**	23,11
SD	1,72	5,69	7,48	3,79
Удельный объем сосудов, %	6,32	9,42*	8,71*	9,75*
SD	0,16	3,33	3,67	0,54
Среднее кол-во сосудов на 100000 мкм^2	10,21	68,20***	49,35***	25,62*
SD	1,26	4,64	7,75	3,25
% сохранных мышечных волокон (от исходного)	15,90	45,04**	48,17**	22,17
SD	0,28	9,81	8,90	1,33

Примечание. * — p<0,05, ** — p<0,01, *** — p<0,001.

лечения. После трансплантации стволовых клеток, наблюдалось почти двукратное уменьшение (1,91) площади рубца, а также изменение его структуры. У крыс без лечения 34 % площади рубца занимала соединительная ткань, а в группе животных с трансплантацией ММСК доля этой ткани в рубце уменьшалась до 18 %. Удельное содержание сосудов на участке рубцевания у животных с трансплантацией было выше, чем у животных без лечения. Установлено, что удельное количество сосудов на 100 000 мкм^2 в группе с трансплантацией ММСК было в 6 раз больше, чем в группе животных, не подвергавшихся лечению.

кММСК. В группе крыс с трансплантацией кММСК отмечались лучшие результаты в сравнении с группой животных, которым после ИМ лечение не проводили. Удельный объем поврежденного участка сердца у крыс без лечения составил 24,02 % от первоначального объема, то есть возникло уменьшение площади инфаркта миокарда в 4 раза. В группах животных, которым выполняли трансплантацию кМСК, наблюдали более чем двукратное уменьшение площади рубца. У контрольных животных 34 % площади рубца, составляла соединительная ткань, а в группе животных с трансплантацией кММСК соединительная ткань занимала лишь 15,4 %. Исследование удельного количества сосудов в миокарде показало, что после введения кММСК плотность васкуляризации сердечной мышцы увеличилась почти в 5 раз — с 10,21 ± 1,26 без лечения до 49,4 ± 7,75. Увеличение васкуляризации миокарда и уменьшение доли соединительной ткани в зоне ИМ сочеталось с ростом доли сохраненных кардиомиоцитов (КМЦ).

Примечательно, что удельный объем сосудов в участке рубцевания в группе животных с трансплантацией кММСК был меньше, чем у животных без лечения. Однако сами сосуды морфологически различались. Так, у животных без лечения формировались широкие сосуды с большим просветом, тогда как у животных с трансплантацией кММСК эти сосуды были намного меньшего диаметра. Оценка удельного количество сосудов рубца показала, что эта величина была почти в 6 раз больше после трансплантации кММСК, чем у крыс без лечения. Введение кММСК вызывало в зоне инфаркта такой же ангиогенный эффект, как и ММСК.

Г-КСК. После введения животным Г-КСФ происходило увеличение удельного объема и количества сосудов миокарда. Однако, усиление васкуляризации сердечной мышцы не сочеталось с сохранностью КМЦ. Выявлена лишь тенденция к увеличению удельного объема участка инфаркта и процента сохраненных мышечных волокон при уменьшении удельного объема соединительной ткани.

Трансдифференцировка ММСК. При использовании гибридизации in situ было установлено, что в формирующемся рубце крыс-самок определяются клетки с наличием Y- хромосомы в ядре, то есть потомки пересаженных ММСК. Клетки с Y-хромосомой также выявлялись среди эндотелиальных и других клеток стенки формирующихся сосудов (рис. 2–4).

Таким образом, трансплантация ММСК значимо улучшает васкуляризацию зоны инфаркта. Это приводит к уменьшению ишемии в пограничных с инфарктом зонах и числа поврежденных КМЦ. В результате уменьшается площадь рубцового ремоделирования миокарда и вероятность формирования постинфарктной аневризмы сердца. ММСК костного мозга выступают в роли индукторов процессов регенерации поврежденного миокарда, обеспечивая репарацию и повышение адаптационных резервов сохранившегося миокарда.

Влияние трансплантации ММСК и кММСК и введения Г-КСФ на содержание оксида азота и VEGF после ИМ

ММСК. При трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в сроки от 1 часа до 7 суток идет значительное увеличение концентрации оксида азота в сыворотке крови животных, перенесших трансплантацию стволовых клеток по сравнению с нормой и группой животных, не получавших какое-либо лечение. Причем повышенное содержание оксида азота наблюдалось на протяжении всего времени эксперимента (табл.2). Такая же тенденция наблюдается и при изучении содержания VEGF. Обращает на себя внимание, что концентрация оксида азота в сыворотке крови у крыс с ИМ в течение первой недели (1,7 сут) была значительно выше по сравнению с ложно оперированными животными, затем резко снижалась. Содержание VEGF через 6 ч после ИМ почти в 2 раза повышала исходные значения и оставалась выше нормы до 7 сут (табл. 3).

кММСК. Трансплантация кММСК так же, как и ММСК с первых часов эксперимента вызывала повышение содержа-

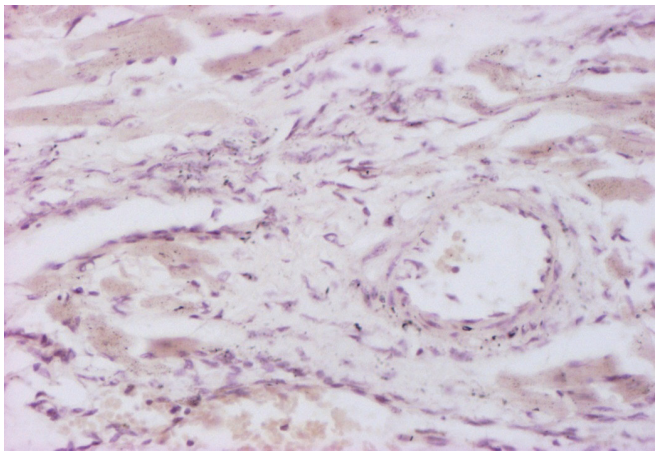

Рис. 2. Крыса 3 группы. Клетки в рубце и стенках сосудов не содержат Y-Хромосому. Гибридизация *in situ* с маркером к Y- хромосомы на 30-е сутки эксперимента, увеличение ×150

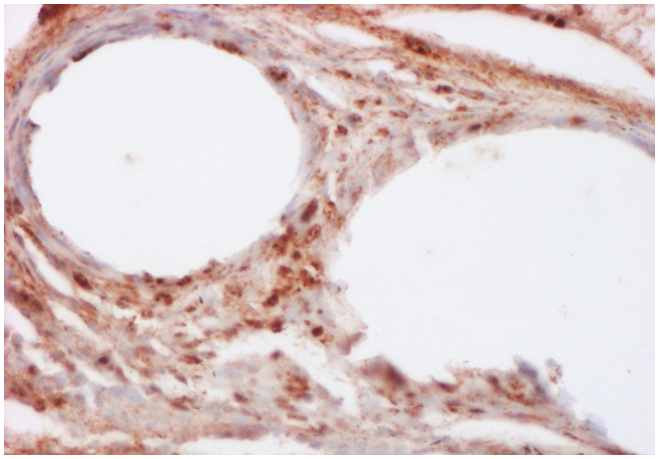

Рис. 3. Позитивное окрашивание клеток стенок сосудов и соединительной ткани с Y-хромосомой при ИГХ исследовании после трансплантации ММСК на 21-е сутки эксперимента. Гибридизация *in situ* с маркером к Y-хромосоме, увеличение ×180

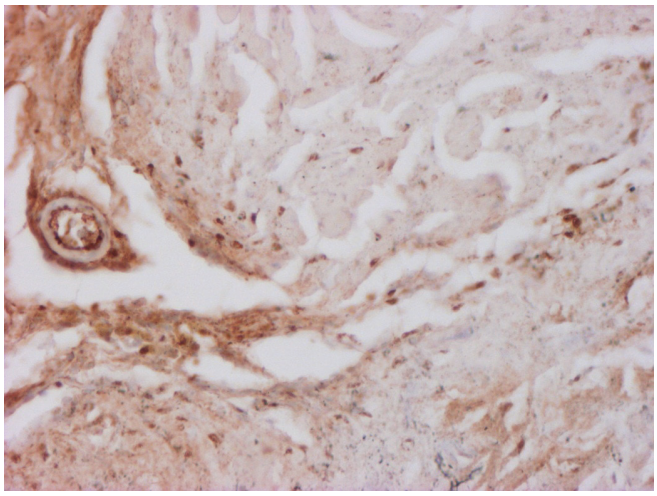

Рис. 4. Позитивное окрашивание клеток стенок сосудов и соединительной ткани между мышцами с Y-хромосомой при ИГХ исследовании после трансплантации ММСК на 30-е сутки. Гибридизация *in situ* с маркером к Y- хромосоме, увеличение ×150

ния оксида азота и VEGF, но достоверных различий между показателями в 4 и 5 группах выявлено не было.

Г-КСФ. Введение Г-КСФ приводило к повышению концентраций оксида азота и VEGF подобных тем, которые наблюдали в группах с клеточной трансплантацией.

Результаты анализа динамики содержания оксида азота и VEGF в плазме крови у крыс разных групп свидетельствовали, что трансплантация ММСК, кММСК и введение Г-КСФ вызывает увеличение концентрации факторов, обладающих вазодилататорным и ангиогенным (VEGF) эффектами. Оба этих механизма были направлены на ликвидацию последствий ишемии миокарда и усиление процессов регенерации поврежденного миокарда. После ИМ наблюдалась схожая реакция этих веществ, но повышение их концентрации было кратковременным и явно недостаточным для восстановления сосудистого русла и усиления кровотока в зоне ишемического поражения миокарда.

Таблица 2

Содержание оксида азота (мкг/мл) в плазме крови экспериментальных животных после ИМ и трансплантации ММСК, кММСК, а также введения Г-КСФ

Группа	Срок после моделирования инфаркта миокарда				
	1 ч	6 ч	1 сут	7 сут	30 сут
1	0,58 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,58 ± 0,03
2	0,61 ± 0,03	0,65 ± 0,04	0,66 ± 0,04	0,65 ± 0,02	0,64 ± 0,04
3	0,86 ± 0,04**	0,92 ± 0,03	1,12 ± 0,05**	0,99 ± 0,04*	0,88 ± 0,03*
4	0,89 ± 0,05**	1,04 ± 0,04*	1,26 ± 0,03**	1,24 ± 0,04	0,96 ± 0,05**
5	0,86 ± 0,05**	0,99 ± 0,03*	1,22 ± 0,04**	1,19 ± 0,03	0,92 ± 0,04**
6	0,87 ± 0,05**	0,95 ± 0,04	1,17 ± 0,04**	1,19 ± 0,04*	0,91 ± 0,04*

Примечания: при сравнении с предыдущим показателем *- p<0,05; ** — p<0,001.

Таблица 3

Содержание VEGF (пг/мл) в плазме крови экспериментальных животных после ИМ и трансплантации ММСК, кММСК, а также введения Г-КСФ

Группа	Время после ИМ				
	1 ч	6 ч	1 сут	7 сут	30 сут
1	66,98 ± 12,47	66,98 ± 12,47	66,98 ± 12,47	66,98 ± 12,47	66,98 ± 12,47
2	69,23 ± 12,45	88,21 ± 11,21*	92,13 ± 18,3*	82,13 ± 19,3*	68,72 ± 21,11
3	70,21 ± 11,36	126,72 ± 24,05*	220,45 ± 22,13*	134,89 ± 25,24	89,74 ± 21,38
4	71,42 ± 13,45	134,86 ± 28,11*	288,22 ± 23,46**	189,57 ± 28,47*	132,74 ± 19,87*
5	69,88 ± 13,21	128,7 ± 19,21*	265,9 ± 20,11**	151,2 ± 24,21*	102,3 ± 14,21*
6	70,47 ± 12,42	129,62 ± 19,25*	249,32 ± 19,26*	164,72 ± 21,36*	91,63 ± 19,44*

Примечания: при сравнении с предыдущим показателем *- p<0,05; ** — p<0,001.

Таблица 4

Концентрация FGF в плазме крови (пг/мл) экспериментальных животных после ИМ и трансплантации ММСК, кММСК, а также введения Г-КСФ

Группа	Срок после ИМ				
	1 ч	6 ч	1 сут	7 сут	30 сут
1	19,98 ± 12,99	19,98 ± 12,99	19,98 ± 12,99	19,98 ± 12,99	19,98 ± 12,99
2	24,56 ± 8,52	36,77 ± 12,11	37,2 ± 13,21	29,3 ± 9,21	21,12 ± 6,43
3	98,12 ± 13,11**	487,35 ± 62,13***	52,8 ± 16,47***	47,12 ± 5,22*	32,56 ± 6,42*
4	97,45 ± 12,12**	532,44 ± 47,23***	348,13 ± 35,19**	127,23 ± 11,35**	33,48 ± 5,41**
5	98,25 ± 11,14**	492,23 ± 14,25***	347,34 ± 28,23**	86,32 ± 12,33**	28,22 ± 6,72*
6	97,36 ± 12,2**	499,27 ± 43,21***	289,42 ± 22,56***	54,33 ± 11,23*	34,21 ± 4,25*

Примечания: при сравнении с предыдущим показателем *- p<0,05; ** — p<0,01; *** — p<0,001.

Влияние трансплантации ММСК и кММСК и введения Г-КСФ на содержание FGF после ИМ

ИМ. FGF оказался более чувствительным к повреждению сердечной мышцы, чем VEGF, а его плазменная концентрация в группе III уже через 1 ч после инфаркта увеличилась почти в 5 раз. К 6 ч наблюдения количество FGF возросло еще в 5 раз, достигнув величины 487,35 ± 62,13 пг/мл. Через сутки содержание FGF уменьшилось почти в 9 раз — до 52,8 ± 16,47 пг/мл. В последующие дни месяца наблюдений концентрация фактора роста фибробластов имела тенденцию к снижению (табл. 4).

ММСК. В группе животных с трансплантацией ММСК (IV) через 6 ч после ИМ наблюдалось повышение концентрации FGF почти в 6 раз. В последующие 7 сут содержание FGF уменьшалась, но по абсолютной величине концентрация этого фактора роста была в 6,5 и 2,7 раза больше через 1 и 7 сут, соответственно. К 30 сут величина данного показателя не отличалась от значения такового в группе с ИМ без лечения.

кММСК. По аналогии, в группе с трансплантацией кММСК, отмечается повышение FGF во все сроки эксперимента по сравнению с нормой. Однако, в срок 7 и 30 суток, он значительно ниже, чем в группе с трансплантацией ММСК.

Г-КСФ. После введения Г-КСФ наблюдалось повышение концентрации FGF, но так же, как и в группе с кММСК, содержание фактора роста было ниже, чем в группе с трансплантацией ММСК. Через 1 сут отмечалось значительное снижение концентрации FGF, возвращение к исходному уровню на 7 сут, и достижение нормальных значений через 30 сут.

Наиболее важной функцией FGF в организме является стимуляция роста эндотелиальных клеток и их организация в трубчатую структуру. Кроме того, различные фракции FGF участвуют в образовании соединительной ткани. После ИМ данный фактор повышался только в первые 6 ч, а затем значительно снижался, что свидетельствовало о его кратковременном участии в неоваскулогенезе. Наибольшая концентрация FGF отмечалась после трансплантации ММСК. В этой группе животных выявлен наиболее интенсивный и длительный эффект. Из табл. 4 следует, что под действием Г-КСФ содержание FGF также возрастало, а по выраженности и длительности действие этого фактора роста напоминало действие кММСК.

Влияние трансплантации ММСК и кММСК, а также введения Г-КСФ на содержание ЭТ-1 после инфаркта миокарда

Увеличение содержания ЭТ-1 наблюдалось у животных во всех экспериментальных группах. Даже в группе ложнооперированных животных (торакотомия) выявлено увеличение концентрации ЭТ-1 с пиком на 6 и 24 ч — 7,8 ± 0,4 моль/мл и 8,1 ± 0,3 моль/мл соответственно. Наибольшие величины ЭТ-1 отмечены через сутки в III группе, в которой после ИМ терапия не проводилась (табл. 5).

ММСК. В группе с трансплантацией ММСК отмечается повышение ЭТ-1 в срок 1–6 часов после моделирования ИМ. Однако к 1 суткам идет значительное снижение данного цитокина, которое более выражено к 7 сут. К 30 суткам не было отличий от группы с ИМ без лечения.

кММСК. В сроки до 1 суток ЭТ-1 в данной группе по концентрации не отличался от группы с трансплантацией МСК. Однако на 1-е и 7-е сутки концентрация ЭТ-1 была выше на 1 моль/мл, что является существенным для усиления ишемии тканей, но тем не менее ниже, чем при ИМ без лечения.

Г-КСФ. ЭТ-1 в данной группе не имел отличия по показателям с группой ИМ без лечения, кроме контрольного измерения в срок — 7 сут, где он значительно ниже.

Использование ММСК и кММСК в 4 и 5 группах оказалось эффективным методом устранения избыточного накопления ЭТ-1 в плазме крови. В 6 группе концентрация ЭТ-1 в 1 и 7 сутки была меньше чем в 3 группе, однако различий в начальные и конечные сроки эксперимента не было. Следует отметить, что отмечается четкая отрицательная обратная связь между ЭТ-1 и оксидом азота.

Влияние трансплантации ММСК и к ММСК и введения Г-КСФ на насосную функцию сердца после инфаркта миокарда.

Нарушения функционального состояния левого желудочка (конечный диастолический и систолический внутренние диаметры левого желудочка, ударный объем (УО), а также фракции укорочения (ФУ) и выброса — ФВ) были изучены с помощью УЗИ.

ММСК. Показано, что ФВ в группе с трансплантацией ММСК равняется 65 ± 4 % против 48 ± 5 % в группе животных без лечения (норма для крыс 78 ± 6 %). УО после ИМ уменьшался с 0,25 ± 0,04 мл до 0,13 ± 0,03 мл (при t=2,4; p<0,05), а в группе с трансплантацией ММСК его величина не отличалась от нормы и составляла 0,24 ± 0,02 мл (t=0,22; p>0,05).

кММСК. Динамика показателей насосной функции сердца после ИМ группе с трансплантацией кММСК была схожей с предыдущей (ММСК). Следует отметить, что у животных с кММСК также не наблюдалось расширения полости левого желудочка, как в систолу, так и в диастолу. Известно, что данные показатели являются самыми информативными в прогнозе развития сердечной недостаточности после ИМ. Вместе с тем, в этой группе животных отмечалось снижение фракции выброса и укорочение левого желудочка по сравнению с группой с трансплантацией ММСК.

Г-КСФ. В группе животных с введением Г-КСФ основные показатели насосной функции сердца не отличались от таковых у крыс с ИМ без лечения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты сравнительного анализа эффектов трансплантации мезенхимальных и коммитированных мезенхимальных стволовых клеток, а также введения Г-КСФ свидетельствуют о преимуществе клеточной кардиомиопластики ММСК и кММСК. После введения ММСК в кровоток они эмигрировали в зону ишемизированного миокарда. Показано, что в формирующемся рубце крыс-самок определяются клетки с наличием Y-хромосомы в ядре, то есть потомки пересаженных ММСК. Клетки с Y-хромосомой также выявлялись среди эндотелиальных и других клеток стенки формирующихся сосудов, что является доказательством «хоуминг»-эффект ММСК в зону ИМ и их дифференцировка в клетки эндотелия и фибробластов. После введения ММСК усиливалась васкуляризация зоны инфаркта, что приводило к уменьшению ишемии в пограничных с инфарктом зонах, а также к уменьшению числа поврежденных КМЦ. Через 30 сут после ИМ увеличивалось содержание сосудов в зоне ишемии миокарда в 6 раз по сравнению с животными, которым ММСК не вводились.

После клеточной терапии ММСК в зоне ишемии миокарда удельный объем участка инфаркта уменьшался в 2,5 раза. Процесс рубцевания поврежденной сердечной мышцы завершался на 21 день после инфаркта. На 30 сут в миокарде наблюдалось двукратное уменьшение площади рубца, а также снижение в рубце доли клеток соединительной ткани почти в 2 раза — с 34 % до 18 %.

Анализ динамики факторов роста и цитокинов в крови в раннем периоде ремоделирования миокарда после инфаркта показал, что вероятнее всего ММСК костного мозга выступают в качестве их индукторов. Обращает на себя внимание, что после введения ММСК наиболее выраженными были изменения концентрации VEGF и оксида азота. Так, через 1 сут после ИМ и введения ММСК отмечалось повышение концентрации VEGF в 3,3 раза. В последующем она снижалось, оставаясь повышенной в течение 30 сут. В течение первых 7 сут концентрация оксида азота в сыворотке крови устойчиво превышала контрольные значения в 1.4 раза.

Содержание FGF и ЭТ-1 было повышенным только в течение первых 7 дней после ИМ и кардиопластики. Так, концентрация FGF в 1-е сут после кардиопластики ММСК увеличилась в 3,6 раза, а затем снизилась, оставаясь повышенным в течение 7 сут. Концентрация ЭТ-1 на протяжении первой недели после кардиопластики ММСК возрастала, но она была наименьшей по сравнению с животными контрольных групп.

Коммитацией ММСК достигалась их преддиференцировка в кардиомиоцитарном направлении. Можно было полагать, что эта процедура уменьшит роль кММСК как индукторов факторов роста и цитокинов. При использовании кММСК эффекты были схожими с ММСК. Площадь инфаркта миокарда у крыс уменьшалась в 4 раза, а размер постинфарктного рубца снижался более, чем в 2 раза. Обращает на себя внимание, что в структуре постинфарктного рубца в 2 раза уменьшилась доля соединительной ткани. Исследование удельного количества сосудов в миокарде показало, что после введения кММСК плотность васкуляризации сердечной мышцы возросла почти в 5 раз, а количество сосудов в рубце увеличилось практически в 6 раз. Увеличение васкуляризации миокарда и уменьшение доли соединительной ткани в зоне ИМ сочеталось с ростом доли сохранных КМЦ.

Таблица 5

Концентрация ЭТ-1 в плазме крови (моль/мл) экспериментальных животных после ИМ и трансплантации ММСК, кММСК, а также введения Г-КСФ

Группа	Срок после ИМ				
	1 ч	6 ч	1 сут	7 сут	30 сут
1	5,2 ± 0,4	5,2 ± 0,4	5,2 ± 0,4	5,2 ± 0,4	5,2 ± 0,4
2	7,1 ± 0,3	7,8 ± 0,4*	8,1 ± 0,3*	6,5 ± 0,3	5,5 ± 0,3
3	10,6 ± 0,7***	12,8 ± 0,5*	12,9 ± 0,4	8,8 ± 0,3***	5,3 ± 0,4***
4	10,4 ± 0,5***	12,8 ± 0,6**	9,1 ± 0,3***	6,9 ± 0,4***	5,1 ± 0,2***
5	10,4 ± 0,6***	12,9 ± 0,7**	10,1 ± 0,3***	7,3 ± 0,4***	5,0 ± 0,3***
6	10,5 ± 0,5***	12,8 ± 0,6*	11,2 ± 0,3*	7,9 ± 0,4***	5,2 ± 0,2***

Примечания: при сравнении с предыдущим показателем * — p<0,05; ** — p<0,01; *** — p<0,001.

Анализ динамики факторов роста и цитокинов в крови в раннем периоде ремоделирования миокарда после инфаркта показал, что введение кММСК приводило к повышению содержания оксида азота и VEGF в крови в такой же степени, как и ММСК. Увеличение концентрации FGF после кардиопластики кММСК сочеталось с уменьшением содержания ЭТ-1.

Под влиянием Г-КСФ происходило усиление васкуляризации, но оно не сочеталось с увеличением сохранности мышечных волокон. Введение Г-КСФ приводило к повышению концентраций оксида азота и VEGF подобных тем, которые наблюдали в группах с клеточной трансплантацией. После введения Г-КСФ наблюдалось повышение концентрации FGF, но так же, как и в группе с кММСК, содержание фактора роста было ниже, чем в группе с трансплантацией ММСК. Г-КСФ не влиял уровень ЭТ-1, а концентрация последнего практически не отличалась от содержания этого пептида в группе животных с ИМ без лечения.

Результаты исследования свидетельствуют, что терапевтические эффекты после кардиопластики ММСК не связаны с трансдифференцировкой мезенхимальных стволовых клеток в КМЦ. Показано, что Y- метка определяется только в клетках (эндотелиоциты, фибробласты) , которые участвуют в процессах васкуляризации миокарда. Подтверждается точка зрения, согласно которой ключевая роль в восстановлении миокарда после острого ишемического повреждения принадлежит проангиогенным и кардиопротективным факторам роста и цитокинам, концентрация которых под влиянием ММСК увеличивается. Результаты анализа динамики содержания оксида азота и VEGF в плазме крови у крыс разных групп свидетельствовали, что трансплантация ММСК, кММСК, а также введение Г-КСФ вызывают увеличение концентрации факторов, обладающих вазодилататорным и ангиогенным (VEGF) эффектами. Доказано, что повышенный уровень эндотелина-1 в крови напрямую связан с увеличением частоты развития ишемии и инфарктов миокарда [20].ЭТ-1 является мощным эндогенным вазоконстриктором, эффект которого в 100 раз превышает действие норадреналина и в 10 раз — ангиотензина II. Под влиянием ММСК и кММСК концентрация этого вазоактивного пептида уменьшалась.

Активация проангиогенных и кардиопротективных механизма была направлена на ликвидацию последствий ишемии миокарда и усиление процессов регенерации поврежденного миокарда. После ИМ наблюдалась схожая реакция этих веществ, но повышение их концентрации было кратковременным и явно недостаточным для восстановления сосудистого русла и усиления кровотока в зоне ишемического поражения миокарда.

УЗИ оценка функционального состояния миокарда после инфаркта показала, что в сроки от 1 месяца отмечалось истончение пораженного сегмента миокарда. Визуализировалось нарушение подвижности стенки: гипокинезия, акинезия или дискинезия. Сегменты стенки противоположной пораженной при остром инфаркте миокарда были, как правило, компенсаторно гиперкинетичными. У некоторых животных с ИМ выявлялись аневризмы левого желудочка, в виде выпячивания «молчащей» стенки. Также отмечалось угнетение насосной функции левого желудочка в виде уменьшения ударного объема и сердечного выброса. Определялась дилатация полостей сердца, проявляющаяся в увеличении конечного диастолического и увеличении конечного систолического внутреннего диаметра левого желудочка.

Таблица 6

Показатели насосной функции сердца у крыс после ИМ и введения ММСК, кММСК и Г-КСФ

Показатель	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5	Группа 6
LVIDd, mm	6,16 ± 0,12**	6,18 ± 0,13**	7,19 ± 0,16*	6,18 ± 0,11**	6,29 ± 0,15*,**	6,79 ± 0,16*,**
LVIDs, mm	2,82 ± 0,18*	2,84 ± 0,4**	3,82 ± 0,11*	2,85 ± 0,14**	2,91 ± 0,12**	3,51 ± 0,14*
FS, %	45,3 ± 1,7**	44,8 ± 1,4**	26,8 ± 0,8*	45,0 ± 0,9**	43,7 ± 0,11**	28,8 ± 0,8*,**
EF, %	76,9 ± 2,5**	75,7 ± 2,4**	55,3 ± 3,4*	75,8 ± 3,2**	71,9 ± 2,7*,**	56,7 ± 4,1*
SV, ml	0,25 ± 0,08**	0,22 ± 0,05**	0,13 ± 0,03*	0,24 ± 0,07**	0,23 ± 0,03**	0,14 ± 0,03*

Примечание: статистическая достоверность показателей представлена в тексте. LVIDd — (конечный диастолический внутренний диаметр левого желудочка); LVIDs — (конечный систолический внутренний диаметр левого желудочка); FS — (ФУ, фракция укорочения); EF — (ФВ, фракция выброса); SV — (УО, ударный объем). * — достоверность различий между изучаемым показателем и 1 группой животных; ** — достоверность различий между изучаемым показателем и 3 группой животных.

Наилучшие результаты восстановления насосной функции сердца после инфаркта миокарда наблюдались при кардиомиопластике ММСК. По данным УЗИ наиболее близкой к нормальным показателям была группа животных с внутривенным введением культуры ММСК. Введение Г-КСФ на насосную функцию сердца после ИМ не влияло. Последний факт является очень важным аргументом в пользу представления о ведущей роли ангиогенных и кардиопротективных механизмов в восстановлении поврежденного миокарда после кардиомиопластики мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования дают основание считать, что регенерационный потенциал поврежденного сердца при инфаркте миокарда сердца можно существенно повысить двумя путями: 1) усилением реваскулизации и кровоснабжения зоны повреждения и повышением устойчивости КМЦ к ишемии путем поддержания протективно направленного профиля факторов роста и цитокинов, а также 2) увеличением доставки «пластического материала» за счет повышения концентрации собственных ММСК в системе циркуляции и оптимизации «хоуминг-эффекта».

К перспективным методам терапии миокарда в первом направлении можно отнести заключение ММСК в проницаемые для цитокинов и факторов роста и защищенные от иммунокомпетентных клеток микробиоконтейнеры с последующей их доставкой в сердечную мышцу. Для повышения концентрации собственных ММСК в крови в эксперименте и в клинике можно использовать инъекции Г-КСФ, лазерные и ультразвуковые воздействия на костный мозг [4, 12, 19].

Однако результаты этих исследований пока не представляется возможным рассматривать как однозначные. Оценка клинических эффектов клеточной терапии в раннем периоде ремоделирования миокарда после инфаркта у пациентов не совпадает с результативностью экспериментальной терапии поврежденного миокарда у экспериментальных животных — они более скромные, а порой не выявляются вообще. Этот факт еще раз подтверждает, что прямой перенос результатов экспериментальных исследований в клинику без учета всего многообразия патогенеза острой и хронической патологии у человека некорректен; более того, это может дискредитировать сам подход использования стволовых клеток для оптимизации процессов регенерации при различных видах патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соколов Ю.М. Новые показания для реваскуляризации миокарда в современной кардиологии. Серце і судини. 2012; 2: 24–7.
2. Мойбенко А.А., Досенко В.Е., Пархоменко О.М. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. К.: Наукова думка; 2008.
3. Шумаков В.И., Онищенко Н.А. Биологические резервы костного мозга и коррекция органных дисфункций. М.; 2009.
4. Mykhaylichenko V.Yu., Kubyshkin A.V., Samarin S.A. et al. Experimental induction of reparative morphogenesis and adaptive reserves in the ischemic myocardium using multipotent mesenchymal bone marrow-derived stem cells. Pathophysiology. 2016: 2–10. http://dx.doi.org/10.1016/j.pathophys.2016.04.002
5. Абсеитова С.Р., Балабаева А.Б. Возможности экстракорпоральной кардиологической ударно-волновой терапии в лечении пациентов с возвратной стенокардией после реваскуляризации миокарда. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2008; 7(6) приложение № 1: 14–15.
6. Ларионов П.М., Сергеевичев Д.С., Чернявский А.М. и др. Ангиоматоз и эктопическая оссификация в миокарде собак после интрамиокардиальной имплантации клеток мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга при моделировании ишемической болезни сердца. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009; 147(5): 576–82.
7. Рахмат-Заде Т.М., Скридлевская Е.А., Конопляников А.Г. и др. Аутологичные культивированные костно-мозговые стволовые клетки в хирургическом лечении хронической сердечной недостаточности. Бюлл. НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН. 2007; 8(6): 297.
8. Калигин М. С. Клетки-мишени фактора стволовых клеток во внутренних органах человека в ходе онтогенеза. Автореф. дис… кан. мед. наук. Казань; 2009.
9. Карпов А.А., Успенская Ю.К., Ваулина Д.Д. Роль мезенхимных стволовых клеток в терапии ишемического повреждения сердца. Бюллетень федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова. 2012; 10: 30–8.
10. Bai X., Kai Pinkernell, Yao-Hua Song et al. Genetically selected stem cells from human adipose tissue express cardiac markers. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2007; 353: 665–71.
11. Keith M.C., Boli R. String theory of c-kit(pos) cardiac cells: a new paradigm regarding the nature of these cells that may reconcile apparently discrepant results. Circ. Res. 2015; 116: 1216–30.
12. Михайличенко В.Ю., Самарин С.А. Обоснование эффективности различных видов кардиомиопластики при инфаркте миокарда в эксперименте. Таврический медико-биологический вестник. 2014; 4: 73–81.
13. Ахмедов Ш. Д., Бабокин В.Е., Дьякова М.Л. и др. Клинико-экспериментальное клеточные технологии в гибридных операциях лечения хронической сердечной недостаточности. IV Всероссийский съезд трансплантологов им. акад. В. И. Шумакова: тезисы докладов. М.; 2008: 226–7.
14. Laugwitz K.-L., Moretti A., Lam J. et al. Postnatal isl1 + cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. Nature. 2005; 433: 647–53.
15. Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S. et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. Circulation. 2002; 105(1): 93–8.
16. Jiang W., Ma A., Wang T. et al. Homing and differentiation of mesenchymal stem cells delivered intravenously to ischemic myocardium in vivo: a time-series study. Pfl.ugers. Arch. 2006; 453(1): 43–52.

17. Noiseux N., Gnecchi M., Lopez-Ilasaca M. et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. Mol. Ther. 2006; 14(6): 840–50.
18. Gnecchi M., He H., Noiseux N. et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell mediated cardiac protection and functional improvement. FASEB J. 2006; 20(6): 661–9.
19. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006; 8(4): 315–7.
20. Tonnessen T., Giaid A., Saleh, D. et al. Increased in vivo expression and production of endothelin-1 by porcine cardiomyocytes subjected to ischemia. Circulation research. 1995; 76: 767–72.

REFERENCES

1. Sokolov YU.M. Novye pokazaniya dlya revaskulyarizacii miokarda v sovremennoj kardiologii. [New indications for myocardial revascularization in modern cardiology]. Serce i sudini. 2012; 2: 24–7. (in Russian).
2. Mojbenko A.A., Dosenko V.E., Parhomenko O.M. Endogennye mekhanizmy kardioprotekcii kak osnova patogeneticheskoj terapii zabolevanij serdca. [Endogenous mechanisms of cardioprotection as a basis for pathogenetic therapy of heart diseases]. K.: Naukova dumka; 2008. (in Russian).
3. SHumakov V.I., Onishchenko N.A. Biologicheskie rezervy kostnogo mozga i korrekciya organnyh disfunkcij. [Bone marrow biological reserves and correction of organ dysfunctions]. M.; 2009. (in Russian).
4. Mykhaylichenko V.Yu., Kubyshkin A.V., Samarin S.A. et al. Experimental induction of reparative morphogenesis and adaptive reserves in the ischemic myocardium using multipotent mesenchymal bone marrow-derived stem cells. Pathophysiology. 2016: 2–10. http://dx.doi.org/10.1016/j.pathophys.2016.04.002
5. Abseitova S.R., Balabayeva A.B. Vozmozhnosti esktrakorporal'noy kardiologicheskoy udarno-volnovoy terapii v lechenii patsiyentov s vozvratnoy stenokardiyey posle revaskulyarizatsii miokarda. [Possibilities of extracorporeal cardiological shock wave therapy in the treatment of patients with recurrent angina pectoris after myocardial revascularization]. Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika. 2008; 7(6) prilozheniye № 1: 14–15. (in Russian).
6. Larionov P.M., Sergeyevichev D.S., Chernyavskiy A.M. i dr. Angiomatoz i ektopicheskaya ossifikatsiya v miokarde sobak posle intramiokardial'noy implantatsii kletok mononuklearnoy fraktsii autologichnogo kostnogo mozga pri modelirovanii ishemicheskoy bolezni serdtsa. [Angiomatosis and ectopic ossification in the dog's myocardium after intramyocardial implantation of autologous bone marrow mononuclear fraction cells in modeling coronary heart disease]. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny. 2009; 147(5): 576–82. (in Russian).
7. Rakhmat-Zade T.M., Skridlevskaya Ye.A., Konoplyanikov A.G. i dr. Autologichnyye kul'tivirovannyye kostno-mozgovyye stvolovyye kletki v khirurgicheskom lechenii khronicheskoy serdechnoy nedostatochnosti. [Autologous cultured bone marrow stem cells in the surgical treatment of chronic heart failure]. Byull. NTSSSKH im. A. N. Bakuleva RAMN. 2007; 8(6): 297. (in Russian).
8. Kaligin M. S. Kletki-misheni faktora stvolovykh kletok vo vnutrennikh organakh cheloveka v khode ontogeneza. [Target cells of stem cell factor in human internal organs during ontogenesis]. Avtoref. dis… kan. med. nauk. Kazan'; 2009. (in Russian).
9. Karpov A.A., Uspenskaya YU.K., Vaulina D.D. Rol' mezenkhimnykh stvolovykh kletok v terapii ishemicheskogo povrezhdeniya serdtsa. [The role of mesenchymal stem cells in the treatment of ischemic heart damage Byulleten' federal'nogo tsentra serdtsa, krovi i endokrinologii im]. V.A. Almazova. 2012; 10: 30–8. (in Russian).
10. Bai X., Kai Pinkernell, Yao-Hua Song et al. Genetically selected stem cells from human adipose tissue express cardiac markers. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2007; 353: 665–71.
11. Keith M.C., Boli R. String theory of c-kit(pos) cardiac cells: a new paradigm regarding the nature of these cells that may reconcile apparently discrepant results. Circ. Res. 2015; 116: 1216–30.
12. Mikhaylichenko V.YU., Samarin S.A. Obosnovaniye effektivnosti razlichnykh vidov kardiomioplastiki pri infarkte miokarda v eksperimente. [Justification of the effectiveness of various types of cardiomyoplasty in myocardial infarction in the experiment]. Tavricheskiy mediko-biologicheskiy vestnik. 2014; 4: 73–81. (in Russian).
13. Akhmedov SH. D., Babokin V.Ye., D'yakova M.L. i dr. Kliniko-eksperimental'noye kletochnyye tekhnologii v gibridnykh operatsiyakh lecheniya khronicheskoy serdechnoy nedostatochnosti. [Clinical and experimental cell technology in hybrid operations for the treatment of chronic heart failure]. IV Vserossiyskiy s»yezd transplantologov im. akad. V. I. Shumakova: tezisy dokladov. M.; 2008: 226–7. (in Russian).
14. Laugwitz K.-L., Moretti A., Lam J. et al. Postnatal isl1 + cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. Nature. 2005; 433: 647–53.
15. Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S. et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. Circulation. 2002; 105(1): 93–8.
16. Jiang W., Ma A., Wang T. et al. Homing and differentiation of mesenchymal stem cells delivered intravenously to ischemic myocardium in vivo: a time-series study. Pfl.ugers. Arch. 2006; 453(1): 43–52.
17. Noiseux N., Gnecchi M., Lopez-Ilasaca M. et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. Mol. Ther. 2006; 14(6): 840–50.
18. Gnecchi M., He H., Noiseux N. et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell mediated cardiac protection and functional improvement. FASEB J. 2006; 20(6): 661–9.
19. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006; 8(4): 315–7.
20. Tonnessen T., Giaid A., Saleh, D. et al. Increased in vivo expression and production of endothelin-1 by porcine cardiomyocytes subjected to ischemia. Circulation research. 1995; 76: 767–782.