Михайличенко В.Ю., Самарин С.А.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ
ВЛИЯНИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК НА АНГИОГЕНЕЗ ПРИ
ИНФАРКТЕ МИОКАРДА**

Михайличенко Вячеслав Юрьевич
доктор медицинских наук,
профессор, лауреат
Государственной премии Украины
в области науки и техники,
академик РАЕ, заведующий
кафедрой общей хирургии
Медицинской академии
им. С.И. Георгиевского

Самарин Сергей Александрович
кандидат медицинских наук, врач
анестезиолог-реаниматолог, врач
трансфузиолог, ассистент кафедры
анестезиологии-реаниматологии и
скорой медицинской помощи
Медицинской академии
им. С.И. Георгиевского

Монография посвящена актуальной теме медицине – регенерации миокарда после моделирования инфаркта. Полученные в ходе экспериментального исследования результаты, свидетельствуют о ключевой роли мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) при регенерации миокарда в результате ишемического поражения, в частности участия в неоангиогенезе и ремоделировании постинфарктного миокарда. Показано, что ММСК участвуют в неоваскулогенезе и паракринном влиянии на поврежденный миокард, что приводит к значительному уменьшению зоны инфаркта миокарда (ИМ) и восстановлению элементов гибернирующего миокарда. С помощью реакции гибридизации с Y-хромосомой были доказаны «хоуминг»-эффект ММСК в зону ИМ и их дифференцировка в клетки эндотелия и фибробластов. Эффективность ангиогенеза подтверждена возрастанием концентрации оксида азота и VEGF, FGF, а также снижением содержания эндотелина 1. По результатам проведенного нами исследования FGF является более чувствительным маркером альтерации миокарда и ангиогенеза по сравнению с VEGF. По данным УЗИ сердца отмечается улучшение контрактильной функции миокарда в группе животных с трансплантацией ММСК по сравнению с моделью ИМ без лечения. В проведенном исследовании на основании изучения маркеров ангиогенеза, функциональных и гистологических методов исследования продемонстрирована эффективность применения ММСК у крыс с экспериментальным инфарктом миокарда, доказана целесообразность использования ММСК по сравнению с коммитированными ММСК.

Монография рекомендована кардиологам, кардиохирургам, трансплантологам, а также врачам-интернам и студентам высших медицинских учебных заведений.

Рецензенты:

Тюкавин Александр Иванович, доктор медицинских наук, профессор, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра физиологии и патологии, заведующий кафедрой;

Калюжная-Земляная Лидия Ивановна, доктор медицинских наук, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории экспериментальной медицины НИЦ.

Ельский Виктор Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент НАМН Украины, профессор кафедры патологической физиологии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького.

Рекомендовано к печати и разрешено использовать гриф «Российская академия естествознания» УМО РАЕ (протокол 605 от 23.11.2016 г.). Разрешено использовать гриф Медицинской академии им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского».

ISBN

DOI

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ВОЗМОЖНОСТЯХ МИОКАРДА И ПЕРСПЕКТИВАХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ КАРДИОМИОПЛАСТИКИ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	13
1.1. Регенерация сердца млекопитающего в норме и при патологии.....	13
1.2. Вопросы регулирования ангиогенеза при инфаркте миокарда	21
1.3. Современный взгляд на вопросы клеточной кардиомиопластики клеточной трансплантацией	29
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	36
2.1. Объём и структура исследований.....	36
2.2. Методика моделирования инфаркта миокарда	37
2.3. Методика получения стволовых клеток	43
2.3.1. Методика получения ММСК.....	43
2.3.2. Методика получения кММСК.....	44
2.4. Методика внутривенного введения ММСК и кММСК.....	48
2.5. Иммунобиохимические методы.....	49
2.5.1. Методика определения суммарной концентрации нитрат и нитрит ионов	49
2.5.2. Методика определения концентрации эндотелина-1	50
2.5.3. Методика определения концентрации VEGF	51
2.5.4. Методика определения концентрации FGF.....	51
2.6. Выполнение ультразвукового исследования сердца	52

2.7. Методика проведения электрокардиографии	53
2.8. Проведение стресс-нагрузки изопропилнорадреналином	55
2.9. Методы гистологической оценки.....	55
2.10. Статистические методы исследования	58
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	59
3.1. Изменение показателей суммарной концентрации нитрат и нитрит ионов под влиянием трансплантации ММСК и кММСК	59
3.2. Изменение уровня эндотелина 1 под влиянием трансплантации ММСК и кММСК.....	60
3.3. Изменение показателей фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) под влиянием трансплантации ММСК и кММСК	63
3.4. Изменение показателей фактора роста фибробластов (FGF) под влиянием трансплантации ММСК и кММСК.....	65
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	67
4.1. Результаты исследования хронотропной функции сердца.....	67
4.2. Результаты ультразвукового исследования сердца	72
4.2.1. Данные морфометрии.....	72
4.2.2. Функциональные показатели сердечной деятельности	74
4.3. Результат морфологических исследований.....	79
4.3.1. Морфологические изменения в участке инфаркта миокарда у животных 3 группы (в разные сроки эксперимента)	80
4.3.2. Морфологические изменения в участке инфаркта миокарда у животных после трансплантации ММСК и кММСК.....	86
4.3.3. Гистологическая морфометрия.....	95

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	102
ВЫВОДЫ	111
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	112
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	115
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	139
ПРИЛОЖЕНИЯ	145

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на большой опыт терапевтических и хирургических методов лечения ишемической болезни сердца и ее осложнений, инфаркт миокарда занимает лидирующее место среди причин смерти и инвалидизации трудоспособного населения. В связи с этим фактором поиски ученых всего мира направлены на разработку новых методов лечения. Самым перспективным из них является использование внутреннего резерва организма для восстановления целостности утраченных морфологических структур и функциональной их активности, в частности трансплантации аутологичных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) [Шумаков В.И., Онищенко Н.А., 2009; Шевченко Ю.Л. и соавт., 2011; Гринь В.К., Михайличенко В.Ю., 2012]. Организация Объединенных Наций в своих докладах 2013 и 2014 годов констатирует факт, что во всем мире происходит необратимая техногенная демографическая трансформация, приводящая к снижению рождаемости, повышению количества лиц возраста старше 60 лет, возрастанию хронических дегенеративных социально значимых заболеваний, что концентрирует внимание на возможностях регенеративной медицины. Так по данным крупных рандомизированных исследований летальность от инфаркта миокарда в США и Западной Европе составляет 8%, а в Российской Федерации – 15,5% [Аронов Д.М., 2014]. Причем значительно возросла заболеваемость повторным инфарктом миокарда в Российской Федерации с 21,5 случаев на 100 тыс. населения в 2002 году до 24,7 случаев на 100 тыс. населения в 2012 году [Бунова С.С. и соавт., 2014].

Стволовые клетки и их потомство имеют множество предполагаемых функциональных ролей, требующих тщательного изучения их поведения и биологического действия в организме реципиента после трансплантации. До сегодняшнего дня нет единого мнения в выборе фенотипа клеток для клеточной кардиоластики. Не определён максимально эффективный путь введения клеточного продукта. Отсутствуют данные по использованию необходимой концентрации клеток в клеточном продукте. А также нет точного ответа на вопрос о механизмах действия полипотентных клеток [Кривенцов А.В. и соавт., 2011]. В

экспериментальных работах описаны различные методы введения (интракоронарный, внутривенный, эндомиокардиальный, непосредственно в зону инфаркта или параинфарктную область) различных культур клеток (миоцитоподобных, мезенхимальных, эмбриональных стволовых клеток и др.). Были сделаны выводы, что использование аутологичных ММСК является наиболее физиологически целесообразным и клинически перспективным методом клеточной кардиомиопластики [Михайличенко В.Ю., 2011, 2013]. Мезенхимальные стволовые клетки, в том числе костномозгового происхождения, обладают иммуномодулирующим потенциалом, а клетки кроветворной линии могут оказывать антифибротическое и прорегенеративное действия, что позволяет предполагать очень разные терапевтические эффекты [Александров В.Н. и соавт., 2014]. В ряде исследований проводятся попытки коммитации культуры клеток трансплантата в кардиогенном направлении. Так, одновременная трансгенная модификация трансплантируемых стволовых клеток ростовыми факторами активирует разнообразные сигнальные механизмы для выживания введенных клеток. Она активизирует также мобилизацию различных стволовых/прогениторных клеток для кардиогенеза при терапии инфаркта миокарда [Шумаков В.И., Онищенко Н.А., 2009; Конопляников М.А. и соавт., 2012; Martino M. et al., 2014]. Некоторые авторы пытаются использовать различные биологические или искусственные (альгинатовые, полиэтиленгликолевые и др.) капсулы, для повышения выживаемости трансплантируемых культур клеток за счет улучшения микроокружения [Levit R.D. et al., 2013].

До конца остаются неизученными механизмы влияния мультипотентных стволовых клеток на регенерацию тканей. Известно, что под воздействием определенных факторов, ММСК могут дифференцироваться ортодоксально и неортодоксально при трансплантации в организм млекопитающего. Соответственно, конечной точкой их дифференцировки могут стать различные ткани – жировая, хрящевая, миокардиальная, печеночная и др. [Шумаков В.И.,

Онищенко Н.А., 2009; Mykhaylichenko V.Yu., 2016; Weil B.R., Canty J.M.Jr., 2013; Orlic D.et al., 2001; Rokosh G., 2013].

Улучшение функции сердца после трансплантации ММСК объясняется рядом факторов: неоваскулогенез за счет дифференцировки непосредственно ММСК в эндотелиальные клетки-предшественники; выделение цитокинов и хемокинов, снижающих воспаление в поврежденной области и участвующих в привлечении других предшественников; восстановление внеклеточного матрикса; вовлечение эндогенных предшественников сердца [Baygenzhin A.etal., 2010]. Таким образом, эффект ММСК при трансплантации для коррекции ишемического повреждения сердца выполняется за счет дифференцировки их в кардиомиоциты и эндотелиоциты, а также паракринного воздействия – выделения ряда факторов роста и хемокинов, улучшающих регенерацию тканей [Burlacu A., 2013; Kuraitis D. et al., 2011].

Множественные экспериментальные исследования сопровождаются различными клиническими пилотными проектами. Активное изучение использования ММСК при различной патологии сердца ведутся в Британском кардиологическом научном центре, Бостонской детской больнице (Бостон, США), НИИ патологии кровообращения им. Е.Н. Мешалкина (Томск, РФ), Института трансплантологии и искусственных органов им. В.И. Шумакова (Москва, РФ), Института неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака (Донецк, Украина). Результаты клинических исследований продемонстрировали, что ММСК улучшают сократительную функцию левого желудочка, уменьшают зону инфаркта миокарда и повышают качество жизни пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) и хронической сердечной недостаточностью (ХСН) ишемического происхождения [Михайличенко В.Ю., 2011, 2012; Эстрин С.И., 2013].

Таким образом, регенеративная клеточная кардиомиопластика должна быть направлена на борьбу с ИБС, последствиями инфаркта миокарда и другими функциональными и структурными изменениями сердечной ткани, т.к. патоморфология миокарда человека не сопровождается органной регенерацией

[Хряпенкова Т.Г., 2010]. Детальное изучение патофизиологических механизмов развития инфаркта миокарда и их коррекция аутологичными ММСК, а также возможность применения коммитированных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (кММСК) является приоритетным направлением развития современной науки, что легло в основу нашего исследования.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ВОЗМОЖНОСТЯХ МИОКАРДА И ПЕРСПЕКТИВАХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ КАРДИОМИОПЛАСТИКИ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Несмотря на свою значимость в организме, приспособительные и адаптационные резервы сердечной мышцы для органического восстановления после ишемии или механического повреждения достаточно ограничены [Березин А.Е., Самура Т.А., 2011; Білоус І.В. и соавт., 2011]. Долгое время считалось, что митотическое деление в кардиомиоците (КМЦ) идет не дальше кариокинеза, в результате чего регенерация ограничена формированием полиплоидных гипертрофированных кардиомиоцитов. Неспособность к цитогенезу, вследствие специфики строения сердечных клеток млекопитающих, приводит к преобладанию необратимых фибропластических процессов в строме над пролиферативными паренхиматозными реакциями [Саркисов Д.С., 1979; Kim W.H. et al., 1998]. Учитывая это, следует отметить, что функциональный дефицит кардиомиоцитов в миокарде возмещается, в первую очередь, не за счет их пролиферации, а посредством гипертрофических реакций внутри клеток.

1.1. Регенерация сердца млекопитающего в норме и при патологии

Гипертрофия левого желудочка, выявляемая при многих патологиях сердца, является не чем иным, как гипертрофией составляющих его кардиомиоцитов [Шперлинг И.Д., Аракелян Л.А., 1989]. Это, в свою очередь, приводит к увеличению массы миокарда [Непомнящих Л.М., 1981]. Но существование человека на протяжении всей его жизни будет невозможным без постоянной, комплексной адаптивно-компенсаторной перестройки – ремоделирования [Gleland D., McGonan R., 1999]. Данный процесс представляет собой последовательные адаптационные и компенсаторные структурно-функциональные изменения компонентов мышцы сердца (соединительной ткани, кардиомиоцитов, сосудов) в результате ее повреждения и диффузной или массивной очаговой гибели клеток

[Непомнящих Л.М., 2001; Swyngheduw B., 1999]. Компенсация не может быть обеспечена бесконечными процессами гипертрофии, а замена поврежденных клеток должна осуществляться непрерывно и способствовать постоянному наличию достаточного количества кардиомиоцитов [Никольская А.О. и соавт., 2008; Никоненко А.С. и соавт., 2009; Бокерия Л.А. и соавт., 2004; Седов В.М. и соавт., 2007]. При изучении возникающих после инфаркта миокарда (ИМ) рубцов в них обнаруживаются единичные гипертрофированные мышечные волокна, окруженные рубцовой тканью. Вдоль сосудов Вьессена-Тебезия или синусоидов располагаются сохранившиеся КМЦ, а также небольшие островки мышечных волокон и стромы рядом с сосудами, что в дальнейшем играет определенную роль при замещении области инфаркта соединительной тканью, являясь своеобразными индукторами роста. Сохранение мелких островков мышечной ткани среди рубцовых полей указывает на резервные возможности миокарда [Anversa P. et al., 2007].

У некоторых групп животных миокард после повреждения способен восстанавливаться с помощью активной пролиферации собственных КМЦ, при этом рубец не образуется. Прежде всего, такие свойства описаны у амфибий, в частности тритонов [Brockers J.P. et al., 2001]. Прекрасные результаты с активным делением клеток сердца при внешнем повреждении продемонстрированы в опытах на аквариумной рыбе *Danio rerio*. При этом, на фоне минимального рубцевания, прослеживается явное сходство с эмбриогенезом, для которого характерна последовательная экспрессия генов кардиомиоцитарной дифференцировки (*Nkx-2.5*, *GATA-4*, *GATA-5*, *Tbx-5*) [Poss K.D. et al., 2002]. Способностью восстанавливать миокард без рубцевания наделены и некоторые млекопитающие, например, мыши линии MRL [Leferavich J.M. et al., 2001]. В результате криодеструкции участка ткани миокарда, их кардиомиоциты активно вступают в S-фазу, в результате чего происходит замещение патологического очага здоровыми клетками. После изучения данного процесса был сделан вывод, что эта

наследуемая способность связана с экспрессией матриксных металлопротеиназ, а также их ингибиторов.

В результате исследований было наглядно доказано, что КМЦ все же способны делиться и, подобно другим клеткам организма, постоянно поддерживать адекватное функционирование органных и тканевых кластеров [Olivetty G. et al., 1996]. Было установлено, что ни одна из популяций КМЦ (желудочковые, предсердные, проводящей системы) взрослых млекопитающих не является чистой популяцией необратимых постмитотических клеток [Reiss K. et al., 1996]. Исследование клеток сердца при обширном ИМ левого желудочка доказывало наличие КМЦ способных вступать в митоз. Причем если в перинфарктной зоне таковыми являлись лишь 10% от общего числа миоцитов, то в предсердиях их процентное соотношение было равно 40%. [Румянцев П.П., 1982]. Следует отметить, что в данном случае речь идет о реактивной репродукции КМЦ взрослых животных, напоминающей пролиферацию при нормальном кардиомиогенезе. При этом лишенные миофибрилл миобласты не образуются путем дедифференцировки, а КМЦ участвующие в реактивной пролиферации зафиксированы в составе мышечных трабекул вставочными дисками и десмосомами. К особенностям такого деления можно отнести время митотического цикла, равное самым длинным циклам в постнатальном кардиомиогенезе [Румянцев П.П., 1982]. Замещение дефекта, возникающего в результате ИМ, никогда не бывает полноценным, так как митозы КМЦ заканчивающиеся цитокинезом очень редки, а пролиферация клеток в первую очередь развивается по периферии некротических очагов или диффузно.

Учитывая многочисленные успехи кардиологии, ИБС все равно имеет один из самых высоких рисков смертности и инвалидизации населения [Шальнова С.А. и соавт., 2012]. ИМ, представляющий собой гибель участка сердечной мышцы по причине его недостаточного кровоснабжения, является наиболее тяжелым проявлением ИБС. Особое внимание в исследованиях уделяется непосредственным механизмам гибели клеток, подвергнутых гипоксии. Так, достоверно доказано, что в результате ишемического повреждения миокарда в миоцитах запускается процесс

программируемой клеточной гибели, в результате которого клетка фрагментируется на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной [Залесский В.Н., Говриленко Т.Н., 2002]. Фрагменты погибшей клетки очень быстро фагоцитируются макрофагами или соседними клетками, минуя развитие воспалительной реакции [Кочуева М.Н. и соавт., 2010]. Данный процесс моделирует клеточные повреждения и слущивание эндотелия [Коноплева Л.Ф., 2011; Сидоренко Г.И. и соавт., 2012], приводящие к закупорке сосудов [Kajstura J., 1996]. И если у людей без сердечной патологии интенсивность данного процесса незначительна, то, например, при кардиомиопатиях возрастает как некротическая гибель кардиомиоцитов, так и сам апоптоз [Передрук Т.В., 2011]. Соответственно, такие потери клеток миокарда должны постоянно восполняться, что подтверждают результаты исследований [Beltrami A.P., 2001]. Как было показано в 2011 году Н. Laeremans и др., существуют различные пептиды способные блокировать рецепторы, приводя к уменьшению размеров инфаркта и улучшению функционального восстановления сердца. Они обладают эффектом, близким к эффекту Фрайззлед-узнающего белка 1 (sFRP) в показателях восстановления сердца, что далее подтверждает логическое обоснование того, что блокирование рецептора является эффективным средством снижения нежелательного влияния на миокард [Laeremans H. et al., 2011].

В настоящее время полагают, что белки группы sFRP, такие как sFRP2, конкурируют с рецептором Wnt лигандов из-за их структурного сходства и, таким образом, противодействуют активации сигнального пути Wnt и, следовательно, приводят в действие антиапоптотические эффекты в кардиомиоцитах и уменьшают фиброз в тканях сердца [Zhang Z. et al., 2009; He W. et al., 2010].

В работах Beltrami A.P. и соавторов показано, что декомпенсационная гипертрофия миокарда, представляющая собой комбинацию процессов гиперплазии и гипертрофии кардиомиоцитов, сопровождается повышением их митотического индекса примерно в 10 раз, увеличением количества клеток на 20-100% [Beltrami A.P. et al., 2001]. Исходя из того, что все фазы митоза длятся в среднем 1 час, подсчитано время полного обновления сердечной мышцы 45 летнего

взрослого мужчины без сердечной патологии, которое составило 10 лет. R. Baserg в своих работах определил, что в год миокард обновляется на 10% [Baserg Ed.R., 1995]. В дальнейшем, на основании анализа соотношения 1-, 2- и 4-ядерных КМЦ в левом желудочке, которое составляет 2:1:1, было сделано заключение, что потенциальный прирост КМЦ может достигать $0,4 \times 10^9$ клеток в год [Бродский В.Я., 1995]. Учитывая скорость замещения дефекта путем образования рубцовой ткани, которая значительно выше, такой прирост не может полностью компенсировать гибель клеток при ИМ. Но очевидно, что частичное возмещение популяции КМЦ путем пролиферации и внутриклеточной регенерации имеет место быть.

Интенсивность пролиферации КМЦ может возрастать при различных патологических процессах, в том числе при ИМ [Карпов А.А., 2012]. Внимательному изучению неоднократно подвергалась зона некроза сердечной мышцы на предмет активной фазы деления клеток. И если в перинфарктной зоне миокарда людей, умерших на 4-12 сутки ИМ, обнаружили 70-кратное увеличение пролиферативной активности КМЦ, то в межжелудочковой перегородке, которая удалена от непосредственной зоны некроза, - лишь 30-кратное [Reiss K. et al., 1996]. Но даже при такой активности по расчетам авторов зона ИМ должна бы была регенерировать полностью за 18 суток. В реальности же этого не происходит, так как в самом очаге выявляется лишь активная пролиферация фибробластов, формирующих рубец.

По-видимому, за фоновое обновление КМЦ в течение жизни отвечают клетки предшественники, наличие которых было доказано в последнее время путем применения современных методов исследования [Jung C. et al., 2012; Sharkey S.W., 2011]. Было обнаружено, что клетки сердца взрослого организма способны входить и митотический цикл и делиться. В результате этих исследований ткани сердечной мышцы были получены стволовые клетки сердца (СКС), которые не только сами экспрессировали маркеры стволовых клеток, но и при культивировании *in vitro*

давали клоны, экспрессирующие биохимические маркеры КМЦ, гладкомышечных клеток и клеток эндотелия [Gallo P. et al., 2006].

В работах Gallo P. и Dawn B. также было показано присутствие в сердце СКС, обеспечивающих регенерацию сердца после ИМ. Эти клетки не экспрессировали факторы транскрипции и структурные протеины КМЦ и гладкомышечных стволовых клеток. [Down B. et al., 2005; Gallo P. et al., 2006]. Они значительно повышали активность теломеразы – энзима, осуществляющего пострепликативное достраивание дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) теломерных участков, в 20 раз при остром и в 10 раз при хроническом ИМ. При этом, количество коммитированных в КМЦ гладкомышечных и эндотелиальных клеток возрастало в 85 и в 25 раз, а количество апоптотических СКС – в 4 и в 2 раза соответственно [Oh H. et al., 2003].

Для регенерации миокарда, наибольший интерес представляют c-kit+ стволовые клетки, которые обнаруживаются в сердце. В опытах на животных, они были выделены, культивированы и трансплантированы в область инфаркта, что сопровождалось их приживлением, миграцией, пролиферацией и дифференцировкой, ведущей к улучшению функции сердца [Чудиновских Ю.А. и соавт., 2009]. Следует отметить, что c-kit+ клетки обнаруживаются в сердце только на сроке 5-6 недель развития, они выстилают изнутри полость желудочков и участвуют в последующем в формировании внутримышечных сосудов сердца. На более поздних сроках гестации и у взрослого человека c-kit+ клетки в сердце не обнаруживаются, а определяются лишь c-kit+ клетки эндотелия, которые при необходимости могут дифференцироваться не только в клетки эндотелия, но и в кардиомиоциты [Куртова А.В. и соавт., 2006].

Серьезным подтверждением участия в регенерации миокарда циркулирующих стволовых клеток (СК) стали данные, полученные при разнополой трансплантации сердца и других органов [Rokosh G., 2013; Thiele J., 2004, V77; Thiele J., 2014, V19; Liet F. et al., 1999]. В результате полового различия клеток по XX и XY хромосоме, возможно отследить перемещение тех или иных клеток из трансплантируемого органа или клеток. Их появление с противоположным

кодированием пола принято называть – "клетки химеры", а явление химеризмом. В классическом представлении, явление химеризма, подразумевает под собой появление в организме реципиента клеток донора. Они, фактически, не уничтожаются иммунитетом реципиента и воспринимаются как собственные [Шумаков В.И., 1995]. Таким образом, присутствие среди клеток хозяина (XX) клеток, содержащих Y-хромосому, позволило предположить, что новообразованные КМЦ и сосудистые эндотелиальные клетки возникли из мигрировавших клеток реципиента. Например, в работах J. Kajstura и P. Anversa, была описана идентификация в пересаженных женских сердцах 18% кардиомиоцитов, 20% артериол и 14% капилляров, содержащих Y-хромосому. Эти клетки не содержали специфические антигенные маркеры, характерные для миелоидных, лимфоидных и эритроидных клеток, поэтому появление в миокарде клеток, имеющих Y-хромосому, нельзя было объяснить митотической погрешностью, реакцией отторжения и лейкоцитарной инфильтрацией [Anversa P. et al., 2007]. Наиболее простым и логичным объяснением химеризма миокарда, по мнению большинства ученых, является миграция в миокард циркулирующих в крови СК костного мозга. Подобные явления химеризма сердца были выявлены и у пациентов, перенесших несовпадающую по полу аллогенную трансплантацию костного мозга [Thiele J., 2004, V77].

В результате повреждения органа, например, развития ИМ, освобождаются специальные сигнальные молекулы, которые вызывают мобилизацию СК в периферической крови, которые впоследствии и проникают в поврежденную ткань [Orlic D., 2002]. В опубликованных работах [Потапов И.В. и соавт, 2011], была продемонстрирована положительная связь между величиной прироста фракции выброса (ФВ) левого желудочка (ЛЖ) и количеством СК костного мозга CD 34. Миграция аутологичных СК при ИМ была доказана в работе D. Orlic [Orlic D., 2002], однако остался открытым вопрос о механизме регенеративного эффекта СК костного мозга: связан он с дифференцировкой клеток в КМЦ и сосуды или же подобное благотворное действие СК является результатом секреции ими каких-то

ростовых факторов, стимулирующих пролиферацию собственных СК миокарда, КМЦ и неоангиогенез.

В последнее десятилетие большое внимание уделяется уже не отдельным исследованиям в области генной и клеточной терапии заболеваний, а новому направлению, цель которого заключается в использовании естественных механизмов восстановления тканей и органов – регенеративной медицине [Бутенко Г.М., Кирик В.М., 2011; Гринь В.К. и соавт., 2010; Кривенцов А.В., 2011]. Важнейшая задача, составляющая это направление, – разработка методов восстановления кровоснабжения поврежденных тканей, без которого полноценная регенерация невозможна [Калигин М.С., 2009; Шевченко Ю.Л. и соавт., 2011].

Наиболее радикальным способом реваскуляризации миокарда является операция аортокоронарного шунтирования (АКШ). АКШ требует проведения стернотомии и, как правило, проводится в условиях искусственного кровообращения, а также требует высококвалифицированного персонала и современного оборудования. В качестве шунтов обычно используют подкожные вены голени или внутренние грудные артерии [Морчадзе Б.Д. и соавт., 2013]. Недостатком венозных шунтов является относительно высокий риск их окклюзии: он составляет 6-11% в течение 1 года после операции. Артериальные шунты окклюдзируются значительно реже [Назарова К.А., 2010]. Менее радикальным способом реваскуляризации миокарда является так называемая чрескожная транслюминальная баллонная коронароангиопластика (ЧТКА). При этой процедуре катетер проводится в область стеноза коронарной артерии, затем в области стеноза раздувается специальный баллончик, расширяющий просвет сосуда. Процедура достаточно эффективна, однако в 30-40% случаев в течение 6 месяцев после нее возникает так называемый рестеноз - повторное сужение коронарной артерии [Осиев А.Г., 2013]. Использование стентов - специальных металлических каркасов, имплантируемых в область стеноза, уменьшает вероятность рестеноза примерно в 2 раза [Тишко В.В., 2014]. ЧТКА в отличие от АКШ - процедура значительно менее травматичная. Однако технически она может быть выполнена далеко не во всех случаях. Следует подчеркнуть, что в ряде

клинических ситуаций больные уже перенесли шунтирование и чрескожные вмешательства, и реваскуляризация одним из этих методов не может быть выполнена повторно. Особенно это актуально для пациентов с сахарным диабетом, при котором повреждаются в основном периферические сосуды.

Таким образом, современные методы исследования направлены на поиск альтернативных методов реваскуляризации миокарда, даже если и с паллиативной точки зрения, одним из таких видов является трансплантация аутологичных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток.

1.2. Вопросы регулирования ангиогенеза при инфаркте миокарда

В последние десятилетия появилось много новых данных касающихся регенерации сердца. В отличие от большинства прочих тканей млекопитающих, мышечная ткань сердца не может полностью восстановиться после повреждения [Gerch B.J. et al., 2009; Mendis S. et al., 2011]. Таким образом, актуальным является постоянное изучение возможных путей воздействия на репаративную регенерацию - восстановление функций органа после повреждений, дистрофических процессов, инфекций, перенапряжений, травм, интоксикаций, гипоксии [Искандеров Б.Г. и соавт., 2012; Михайличенко В.Ю., 2006; Карелкина Е.В. и соавт., 2011].

В постинфарктном периоде приоритетным направлением терапии является восстановление (улучшение) кровоснабжения в зоне ишемизированного миокарда. В организме самостоятельным триггером ангиогенеза является наличие гипоксии как таковой [Пушкарева Т.А. и соавт., 2008; Шурыгин М.Г. и соавт., 2013]. Несмотря на это, сегодня широко применяются различные ангиогенные факторы, которые способны улучшить реперфузию за счет неоваскуляризации. Так активно обсуждаются и подлежат постоянному научному исследованию эффективное влияние на ангиогенез препаратов на основе эритропоэтина [Hitara A. et al., 2006]. В разное время, независимо друг от друга, R. Depping и A. Anagnostou изучали влияние эритропоэтина на инфаркт миокарда, благодаря чему значительно снижался эффект повреждения. [Depping R. et al., 2005; Anagnostou A., 1994]. Одна

доза препарата, вводимая на моделях ИМ у грызунов, кроликов и собак приводила к уменьшению размера ИМ, снижению посттравматического ремоделирования желудочка и сохранению его насосной функции [Yi-Da F. et al., 2009; Hitara A. et al., 2006]. Эти эффекты авторами объясняются эритропоэтинопосредованным снижением апоптотической гибели клеток, повышенным высвобождением циркулирующих костномозговых эндотелиальных клеток предшественников, увеличением ангиогенеза в преинфарктной ишемической зоне [Arcasoy M.O., 2008].

Кроме этого, такими свойствами обладают эндотелиальный фактор роста [Lee R.J. et al., 2000] и фибробластический фактор роста, запускающие внутриклеточные сигнальные каскады [Дремина Н.Н. и соавт., 2009; Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., 2010; Шурыгина И.А., 2009], процессы ремоделирования существующих сосудов и формирование новых сосудов (неоангиогенез) [Батушкин В.В., 2008; Вайда Л.С., Лозинская Н.В., 2013; Михайличенко В.Ю., 2008, 2009; Шурыгин М.Г., 2005]. Проводимое связывание эндотелиального VEGF моноклональными антителами позволяет достичь значимого подавления неоангиогенеза, что дает возможность достоверно обосновать факт его выраженного влияния на стимуляцию образования капиллярного русла в зонах интактного миокарда, пограничной и инфарктной зонах при развитии постинфарктного кардиосклероза. В физиологических концентрациях VEGF действует как фактор выживания эндотелия и обладает митогенным эффектом на клетки эндотелия сосудов. А при его отсутствии или выраженном недостатке эндотелиальные клетки подвергаются апоптозу [Дремина Н.Н., Шурыгин М.Г., 2008]. Кроме этого он обладает митотической активностью и по отношению к кардиомиоцитам. Так, при использовании VEGF значительно увеличивается пролиферативный потенциал кардиомиоцитов, благодаря чему стимулируется сам кардиомиогенез [Дремина Н.Н. и соавт., 2007; Непомнящих Л.М., 2010].

В публикуемых экспериментальных и клинических работах, посвященных роли эндотелиальной дисфункции (ЭД), ей все чаще отдают ведущую роль в возникновении и прогрессировании ряда заболеваний сердечно-сосудистой

системы, таких как гипертоническая болезнь, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда [Амбросова Т.Н., 2013; Аристова И.В., 2013; Березин А.Е., Кремзер А.А., 2013; Гетьман О.И., 2011]. При этом острые проявления дисфункции эндотелия большинство исследователей связывают со сниженной биодоступностью или недостаточностью выработки оксида азота в артериальной стенке [Денина Р.В., 2011; Ройтман А.П. и соавт., 2012]. В свою очередь в других исследованиях доказывается роль дисбаланса между продукцией ангиопротективных, вазодилатирующих, антипролиферативных факторов, с одной стороны, и протромботических, вазоконстрикторных, пролиферативных факторов с другой [Загидуллин Н.Ш. и соавт., 2010; Иванова И.В. и соавт., 2011]. Основную роль в механизме развития ЭД играют окислительный стресс [Непомнящих Л.М. и соавт., 2010], продукция мощных вазоконстрикторов (эндопероксида, эндотелины, АТII), а также цитокинов и фактора некроза опухоли, которые подавляют продукцию NO [Передрук Т.В., 2011]. При этом роль оксидативного стресса и дисфункции эндотелия признана одними из самых значимых факторов в патогенезе различных заболеваний, в том числе ишемической болезни сердца [Мусихина Н.А. и соавт., 2012], хронической сердечной недостаточности [Сукманова Н.А., Яхонтов Д.А., 2009], гипертонической болезни [Лишневская В.Ю., Е.И. Парасюк, 2011; Лишневская В.Ю. и соавт., 2011; Макарова М.А. и соавт., 2011; Макарова М.А. и соавт., 2013], а также сахарного диабета [Якутина Н.В., 2007; Oostrom V. et al., 2008] и других. При длительном воздействии на организм повреждающих факторов, таких как гипоксия, интоксикация, воспаление и т.д., происходит истощение и извращение функции эндотелия, и в результате вместо физиологически адекватных ответов на стандартные стимулы организм отвечает вазоконстрикцией, пролиферацией элементов сосудистой стенки и тромбообразованием [Ягода А.В., 2007].

В экспериментальном исследовании Шурыгиной М.Г. и соавторов на модели ИМ у крыс выполнялось оперативное вмешательство, которое в одном случае было ложным (заканчивалось после выполнения торакотомии), а в другом своей целью ставило вызвать зону некроза в сердечной мышце. У животных подвергшихся

первому варианту вмешательства отмечалось кратковременное повышение в 2 раза уровней VEGF и FGF через 6 и 12 часов после операции. Но уже через 24 часа содержание ростовых факторов приходило в норму. При моделировании реального инфаркта миокарда было отмечено значительно более выраженное увеличение показателей, при этом уровень факторов роста достоверно превышал аналогичный показатель у ложнооперированных животных в сроки 2, 6, 12 часов, 1 и 3 суток после оперативного вмешательства [Дремина Н.Н., 2008; Шурыгин М.Г. и соавт., 2007].

К настоящему времени установлено, что ни один из известных факторов не обладает столь широким спектром эффектов, как FGF. Кроме самих фибробластов, он стимулирует пролиферацию эндотелиоцитов, гладкомышечных клеток сосудов, хондроцитов, меланоцитов. Принимает участие в дифференцировке адипоцитов, подавляет апоптоз. Этот цитокин оказывает также гистопротекторное действие, способствуя выживанию клеток в условиях гипоксии и при повреждении тканей. В частности, отмечено ограничение цитолиза и уменьшение зоны инфаркта миокарда [Шурыгин М.Г. и соавт., 2008, С.68-71]. В то время как при использовании VEGF уровень цитолиза не изменялся [Шурыгин М.Г. и соавт., 2008, С.58-60].

Наряду с изменениями гемодинамики и цитолитическими проявлениями значительно меняется клеточный состав в процессе постинфарктного ремоделирования при изменении концентраций, как VEGF, так и FGF. Например, при подавлении активности FGF за счет связывания его антителами снижается выживаемость эндотелиоцитов в очаге повреждения и замедляется их активация. Снижается интенсивность инфильтративной фазы воспаления, а также нарушается жизненный цикл фибробластов, выражающийся в уменьшении трансформации их в фиброциты с переключением на альтернативные способы снижения фибробластической активности (клазматоз и апоптоз) [Шурыгин М.Г. и соавт., 2010]. В то же время у животных, которым вводили FGF, увеличивалось

количество эндотелиоцитов, однако число капилляров не изменялось [Дремина Н.Н. и соавт., 2007; Шурыгин М.Г. и соавт., 2006].

Учитывая изменение фибробластической активности при искусственном изменении концентрации FGF и VEGF, не остается в стороне вопрос о коллагенообразовании. Коллаген I и III типов, синтезируемый фибробластами, – один из основных компонентов новообразованной соединительной ткани, и именно коллагеновые волокна определяют механические характеристики постинфарктного рубца [Шурыгина И.А. и соавт., 2012].

Активизация пептидов широкого спектра действия – эндотелинов, которые являются одними из важнейших регуляторов функционального состояния эндотелия описана в работах М.Г. Шурыгина и соавторов В физиологических концентрациях эндотелин высвобождает факторы релаксации, а в более высоких – активирует вазоконстрикцию. Таким образом, при помощи одного и того же фактора реализуются две противоположные сосудистые реакции (сокращение и расслабление), реализуемые через различные механизмы [Михайличенко В.Ю., 2008, 2010; Шурыгина И.А. и соавт., 2014]. На сегодняшний день определена не только динамика экспрессии эндотелина в миокарде при его ишемическом повреждении и инфаркте, но также установлено значительное стимулирующее воздействие факторов роста FGF и VEGF на экспрессию эндотелина в зоне ишемического повреждения и перинфарктной зоне при экспериментальном инфаркте миокарда [Шурыгин М.Г. и соавт., 2013].

Как заявлено в статье R.F. Furchgott и J.V. Zawadzki опубликованной в журнале "Nature" ещё в 1980 г., эндотелий – это не пассивный барьер, а активный "сердечно-сосудистый эндокринный орган, осуществляющий связь в критических ситуациях между кровью и тканями" [Furchgott R.F., Zawadzki J.V., 1980], дисфункция которого является обязательным компонентом патогенеза практически всех сердечно-сосудистых заболеваний. Неизменно высокий уровень летальности при ИМ во многом определяется не только утратой способности кардиомиоцитов к регенерации на поздних стадиях онтогенеза, но и в результате нарушения и неэффективности реваскуляризации миокарда на фоне выраженной

эндотелиальной дисфункции. Непосредственно участвуя в гомеостазе, гемостазе и процессах воспаления, эндотелий является первым органом-мишенью, через который реализуются многие звенья патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний [Mudaum et al., 2012], а также основным участником ангиогенеза на всех этапах формирования новых сосудов [Федин и соавт., 2013]. Особенно многогранное участие в проангиогенной функции эндотелия играет NO – триггер и трансдуктор роста и дифференциации клеток, участвующих в ангиогенезе, посредством активации конститутивной NO-синтазы, повышения уровня цГМФ, митогенактивируемой киназы, экспрессии фактора роста фибробластов. В результате повышения уровня NO в поврежденной ткани происходит уменьшение признаков воспаления, повреждения и проявлений сосудистых поражений [Mudau M. et al., 2012].

Функции эндотелия складываются как баланс противоположно действующих начал, вызывая усиление или ослабление сосудистого тонуса, агрегацию или дезагрегацию клеток крови, увеличение или уменьшение числа сосудистых клеток. Стимуляция эндотелином-1 (ЭТ-1) киназ рецепторов, сопряженных с G-белками класса 2, приводит к ингибированию фосфорилирования протеинкиназы В (Akt) и гипопродукции NO [Попова А.А. и соавт., 2010]. В каждом случае результат определяется концентрацией синтезируемых веществ, между которыми существуют строгая зависимость и равновесие. Поиск путей воздействия на их синтез является ключом к эффективной коррекции эндотелиальной дисфункции, как важного компонента лечения многих заболеваний органов кровообращения.

Несмотря на проведенные доклинические исследования, подтверждающие увеличение кровоснабжения сердца и сохранение его функции после ИМ [Padin-Iruegas M.E. et al., 2009], введение VEGF и FGF выявило ряд особенностей их применения. Так, Epstein S.E. с соавторами при введении обоих факторов в коронарные артерии свиней и человека [Epstein S.E. et al., 2001] установили, что оно вызывает опосредованную оксидом азота гипотензию, ограничивая, таким образом, максимально вводимую дозу 50-ю нг/кг/мин. Нередко сосуды, в процессе эксперимента, получались абберантными [Huang K.F. et al., 2014; Wagner A.D. et

al., 2012], что можно объяснить необходимостью согласованных действий различных ростовых и антиангиогенных факторов, например, ангиопоэтинов [London N., Li D., 2011].

Феномен метаболической адаптации к ишемии, после повторяющихся кратковременных эпизодов снижения перфузии органа (прекондиционирование), имеет широкое обсуждение в научных кругах, изучающих данный вопрос [Munk K. et al., 2010]. Феномен ишемического preconditionирования заключается в существенном повышении устойчивости ткани к реперфузионному и ишемическому повреждению, возникающему после нескольких коротких эпизодов ишемии-реперфузии [Mewton N., Ovize M., 2013]. При этом, значимыми стимулами ишемического preconditionирования выступают известные нам FGF и VEGF. Защитный эффект реализуется, как путем повышения жизнеспособности клеток сократительного миокарда и эндотелиоцитов сосудов миокарда в очаге ишемического повреждения, так и за счет неоангиогенеза, который обеспечивает лучшие условия метаболического обеспечения и повышения регенераторной способности зрелых кардиомиоцитов [Frassdorf J. et al., 2010].

Вопрос выбора конкретной изоформы VEGF, действие которых протекает через связывание с различными рецепторами остается дискуссионным [Wagner A.D. et al., 2012; Li R.K., 2013; Hang T.C. et al., 2013]. Авторы продолжают выявление наилучшего варианта по профилю фармакокинетики/фармакодинамики для лечения ИМ. Опасения вызывает возможность роста опухоли под влиянием митоза различных типов клеток при стимуляции VEGF и FGF [Wagner A.D. et al., 2012; Epstein S.E. et al., 2001]. Для более безопасного пути реализации положительных эффектов вводимых стимуляторов продолжается разработка методов адресной доставки в ишемизированный миокард [Scott R.C. et al., 2009].

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) стимулирует пролиферацию гемопоэтических СК. Впервые D. Orlic применил мобилизацию аутологичных СК посредством подкожного введения мышам G-CSF, а также фактора стимуляции костного мозга непосредственно перед созданием очага ишемии миокарда и в течение нескольких дней после экспериментального ИМ. Ему

удалось продемонстрировать превращение этих клеток в миоциты, артериолы и капилляры, что сочеталось с резким ограничением очага ИМ, уменьшением степени дилатации левого желудочка и увеличением фракции выброса. При этом, концентрация СК в периферической крови мышей под влиянием ростовых факторов возрастала в 240 раз [Orlic D. et al., 2001].

Помимо возможного неоангиогенеза нельзя исключить наличия иных механизмов действия G-CSF: он является цитокином с целым комплексом малоизученных гормональных эффектов на уровне металлопротеаз, молекул адгезии и т.д. [Martino M. et al., 2014]. Следует отметить, что до сих пор непонятен непосредственный механизм стимуляции выхода СК из КМ под влиянием G-CSF, поскольку СК не имеют рецепторного аппарата, чувствительного к G-CSF [Schmitt M. et al., 2014]. Авторы отмечают, что проведенное исследование не может служить доказательством связи терапии G-CSF с положительными гемодинамическими и клиническими изменениями. Однако он позволяет надеяться, что такая связь существует.

Minatoguchi S. продемонстрировал в эксперименте, что мобилизованные G-CSF лейкоциты играют важную роль в репарации миокарда и регуляции фагоцитоза в зоне некроза, пролиферацию фибробластов и ангиогенез. Кроме того, доказано, что G-CSF играет важную роль в остановке апоптоза кардиомиоцитов. Помимо прочего он ускоряет эндотелизацию, что при стентировании приводит к повышению числа рестенозов [Bhattacharya V., 2000; Shi Q., 2002]. При применении G-CSF у нестентированных больных происходит реэндотелиализация и рассасывание атеросклеротических бляшек сосудов [Михайличенко В.Ю., 2009].

Таким образом, учитывая вышесказанное, мы видим, что определенно точно установлено, что чем выше уровень в крови VEGF и других факторов тканевого роста, тем быстрее происходит ангиогенез и регенерация тканей. Применение различных колониестимулирующих факторов не имеет однозначного влияния на зону ишемии и некроза миокарда, что требует дальнейшего изучения вопроса. Доказано, что эндотелиальная дисфункция играет первоочередную роль в развитии

ИБС и регенерации миокарда, в основном обусловлена дисбалансом вазоконструкторов и вазодилататоров.

1.3. Современный взгляд на вопросы клеточной кардиомиопластики клеточной трансплантацией

После перенесенного инфаркта миокарда человеку необходимо эффективное лечение, которое может значительно улучшить прогноз дальнейшего течения заболевания. Одним из наиболее перспективных направлений такой терапии является трансплантация клеток [Steinhoff G., 2014; Doppler R. et al., 2013; Schulman I.H., 2012]. Клеточные трансплантаты стимулируют процесс образования новых кардиомиоцитов из эндогенных тканевых и циркулирующих в кровотоке прогениторных клеток. Таким образом реализуется их вклад в постдеструктивную регенерацию сердечной мышцы [Шумаков В.И., Онищенко Н.А., 2009; Бутенко Г.М., Кирик В.М., 2011; Dai W. et al., 2014; Lionetti V., Ventura C., 2013; Rokosh G. et al., 2013; Alvarado A.S., 2009; Rupp S. et al., 2008]. С этой целью в исследованиях используются различные типы клеток, включающие костномозговые гемопоэтические клетки [Wojakowski W. et al., 2012; Naftilan A.J., Schuening F.G., 2011; Wen Y. et al., 2011], эмбриональные стволовые клетки [Su W. et al., 2013; Howard L. et al., 2013; Mummery C. et al., 2003; Erdei Z. et al., 2014; Teo A. et al., 2014; Scavone A. et al., 2013; Akhmedov A.T., Marin-Garcia J., 2013], эндотелиальные клетки предшественники [Jung C. et al., 2012], мезенхимальные стволовые клетки [Burlacu A., 2013; Kuraitis D. et al., 2011; Xinyang H. et al., 2008] и резидентные кардиальные клетки предшественники [Barile L. et al., 2014]. На доклинических моделях повреждения миокарда доказано их эффективное влияние на функциональное состояние сердечной мышцы в ближайшее время после трансплантации. Некоторыми исследователями подтверждается эффективность применения гладкомышечных клеток [Janeczek A. et al., 2013; Glaser R. et al., 2002]

и фибробластов [Jiang B. et al., 2013; Radisic M., Christman K.L., 2013] при экспериментальном ИМ.

Применяемые в кардиологии и кардиохирургии клеточные технологии направлены, в первую очередь, на изменение процессов структурно-функциональной перестройки миокарда, т.е. на ремоделирование сердца [Lenneman A.J., Birks E.J., 2014; Morris M.V.Jr., Liechty K.W., 2013; Калигин М.С., 2009; Попов С.В. и соавт., 2008]. Независимо от того, какая клеточная культура будет применяться для этих целей, такую терапию принято называть "клеточной кардиомиопластикой" [Lalit P.A. et al., 2014; Baygenzhin A. et al., 2010; Lundy S.D. et al., 2010]. Актуальность исследований в данном направлении обусловлена тем, что стандартные методы лечения ИМ не направлены на регенерацию поврежденного миокарда и замену нежизнеспособных тканей функционально нормальными [Ben-Josef G. et al., 2014; Попов С.В., Рябов В.В., 2008]. Тромболизис, коронарное шунтирование и баллонная ангиопластика ограничивают размер некроза и уменьшают проявления сердечной недостаточности и ее осложнений, а также электрическую нестабильность сердца. Это уменьшает смертность пациентов [Ощепкова Е.В. и соавт., 2013; Сыроедов А.М. и соавт., 2011; Lange R.A., Hills L.D., 2003], но не способствует адекватной замене утраченных клеток. На этом фоне была переосмыслена важность дальнейшего исследования вопросов клеточной терапии. В последнее десятилетие начато применение данного метода лечения в клинической практике [Карпов и соавт., 2012].

Трансплантация фетального клеточного материала привлекает исследователей низким риском посттрансплантационных осложнений благодаря слабой экспрессированности антигенов гистосовместимости [Li R.K. et al., 1998]. К положительным свойствам такого материала также относится высокий пролиферативный потенциал и способность к дифференцировке, продуцирование факторов роста и регенерации [Пальцев М.А. и соавт., 2009]. При этом стоимость клеточной трансплантации значительно дешевле органной. В экспериментах доказано, что фетальные кардиомиоциты новорожденных крысят и взрослых крыс

способны образовывать структурированную сердечноподобную ткань как *in vitro*, так и после трансплантации в миокард [Li R.K. et al., 1997; Leor J. et al., 1996]. Причем донорские КМЦ располагались параллельно КМЦ реципиента, не смешиваясь с последними, но образуя продольные и поперечные щелевые контакты между ними [Matsushita T. et al., 1999]. Другими исследователями показано гарантированное наличие рубцовой или грануляционной ткани, разделяющей данные клетки уже на 8 неделе после введения [Li R.K. et al., 1996].

Несмотря на положительные результаты и признаки неоангиогенеза, исследователи встретили явные трудности в применении данной методики. В отдаленные сроки, несмотря на применение циклоспорина, вокруг пересаженных фетальных клеток отмечались явные признаки хронического отторжения [Li R.K. et al., 1997]. Несмотря на это, трансплантация аутогенных взрослых предсердных КМЦ в поврежденный миокард позволяет им оставаться в рубцовой ткани в течение минимум 5 недель [Wiel B.R., Cauty J.M.Jr., 2013], что дает возможность предотвратить дилатацию миокарда, экспансию рубца и способствует сохранению толщины сердечной стенки. Таким образом наиболее перспективным в плане использования фетальных клеток является методика пересадки последних в пограничную зону ИМ, для образования более прочных и долговечных клеточных контактов.

Начиная с 90-х годов прошлого века, активно проводятся экспериментальные исследования с использованием так называемых "мышечных клеток-сателлитов" и выделенных из скелетной мышцы и очищенных миобластов [Карпов А.А. и соавт., 2012], составляющих у новорожденных значительную часть клеток скелетных мышц. При совместной инкубации *ex vivo* миобластов новорожденных с фетальными и неонатальными КМЦ до 10% клеток может коммитироваться в КМЦ [Orlic D., 2002]. Прокультивированные с 3Н-тимидином сателлитные клетки, внедренные в поврежденный миокард собаки в соответственном микроокружении, дифференцировались в КМЦ-подобные клетки [Sawa Y., Mijagawa S., 2013]. Выживание пересаженных клеток подтверждалось наличием изотопной метки в пределах рубца спустя 18 недель после трансплантации. При этом большинство

исследований говорит о неспособности донорских миобластов образовывать контакты с КМЦ реципиента [Sawa Y., Mijagawa S., 2013; Murry C.E. et al., 1996; Taylor D.A. et al., 1998]. Наличие же новых вставочных дисков свидетельствует о потенциальной возможности участия скелетной мышечной ткани в механической и электрической систоле миокарда [Matsushita T. et al., 1999, P1046; Matsushita T. et al., 1999, P262]. Также было описано формирование вставочных дисков между миоблантами и КМЦ в культуре [Reineke H. et al., 2000]. Способность же стволовых миобластов к доставке терапевтических трансгенов в сердце интенсивно изучается в последние годы [Frassdorf J. et al., 2010; Bialas M. et al., 2011]. Главным образом, эти исследования включали использование общепринятой стратегии генетической модификации миобластов одним или двумя трансгенами, обеспечивающими проангиогенный и/или способствующий выживанию эффект и демонстрирующие улучшение ангиогенеза в инфарктном сердце, а также уменьшение размеров зоны инфаркта [Blumenthal B. et al., 2011].

По мнению многих авторов, трансплантированные миобласты уменьшают ригидность зрелого рубца, в результате чего и происходит улучшение систолической функции миокарда [Hutcheson K.A. et al., 1999]. Непосредственного влияния на насосную функцию сердца не отмечается [Matsushita T. et al., 1999, P262]. Выделенные из желудка эмбрионов крыс гладкомышечные клетки (ГМК) после трансплантации в зону ИМ способствовали уменьшению размеров рубца, росту кровеносных сосудов в зоне рубца, а также ограничению дилатации левого желудочка. Об улучшении функции сердца свидетельствовало увеличение систолического и диастолического давления в камере левого желудочка в сравнении с контролем [Li R.K. et al., 1999]. Наибольшее распространение к настоящему времени получил метод трансплантации миобластов в зону рубца, прошедший испытания в нескольких европейских клиниках [Hutcheson K.A. et al., 1999].

На стадии ранней бластоцисты из внутренней клеточной массы (эмбриобласта) донорских эмбрионов возможно получение эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) [Su W. et al., 2013; Steinhoff G., 2014; Dvash T., Benvenisty

N., 2004; Huber I. et al., 2007; Smith A.G., 2001], которые обладают крайне высоким пролиферативным потенциалом. Эти клетки по-своему уникальны, так как в процессе своего развития могут преобразовываться в абсолютно любой вид ткани организма (более 300 типов тканей), включая герминативную линию (ткани женской и мужской половой системы) [Гривенков И.А., Шкуматов А.А., 2002; Li R.K. et al., 1996; Wojakowski W. et al., 2012; Wen et al., 2011, Leor J. et al., 1995; Baserga Ed. R., 1995]. Причем из ЭСК помимо кардиомиоцитов с фенотипом предсердий или желудочков, возможно непосредственное получение клеток Пуркинье и клеток-водителей ритма [Goldenthal M.J., Marin-Garcia J., 2003]. Ряд работ Field M. и другие. и его коллег доказывают, что мышечные КМЦ способны формировать стабильный интракардиальный имплант [Erdei Z. et al., 2014] и обеспечивать функциональную активность миокарда при ИМ у мышей [Akhmedov A.T., Marin-Garcia J., 2013; Hodson D.M. et al., 2004]. Изучением данного типа клеточного образца долгое время занимался J.A. Thomson [Thomson J.A., 1995]. Модифицировав технологию получения клеток он уже в 1995 году получил ЭСК приматов, а в 1998 году – линию клеток человека. В России они впервые были получены в 2003 году в Институте биологии гена Российской академии наук и в Институте цитологии Российской академии наук.

В работах Wold L. et al. была продемонстрирована возможность миграции ММСК крыс в область ишемизированного миокарда. Аллогенные ММСК костного мозга выделяли и метили флуоресцентным маркерами DAPI. Клетки вводились внутривенно через 2 дня после моделирования ИМ у крыс. Спустя 2 недели сердца извлекали, а замороженные участки миокарда подвергали секции и флуоресцентной микроскопии. Донорские клетки определялись в миокарде у 4 из 5 крыс [Wold L. et al., 2004].

На уровне поврежденного миокарда механизмы хоуминга и орган-специфичные сигналы для привлечения стволовых клеток в область повреждения представлены, в первую очередь, ишемией, которая приводит к увеличению уровня экспрессии HIF-1 клетками в пораженной области и последующей активации экспрессии SDF-1 [Leone A.M., 2005]. Некроз вызывает высвобождение белка,

связывающего хроматин, HMGB 1, действующий как внеклеточный аттрактант клеток-предшественников [Palumbo R., 2004]. В свою очередь, сниженный уровень экспрессии генов VEGF и его рецептора в норме также контролируется HIF-1 по типу положительной обратной связи, но у пожилых людей и пациентов, страдающих диабетом, гипоксия-зависимая регуляция нарушена [Сао Y. et al., 2005].

Полной регенерации миокарда человека после инфаркта миокарда никогда не наступает, это связывают с двумя причинами. 1). Фибробласты принимающие участие в формировании рубца обладают гораздо большей пролиферативной активностью и более выносливы к гипоксии, которая присутствует в зоне инфаркта. 2). Кардиомиоциты неспособны активно делиться в условиях гипоксии.

Необходимо отметить, что для регенерации миокарда требуется не только образование КМЦ, но и коронарных сосудов, т.е. восстановление пула КМЦ не может привести к улучшению сократительной функции сердца без усиления трофики, как и образование только сосудов "не оживит" погибшие КМЦ. Таким образом физиологическая регенерация миокарда требует присутствия примитивной мультипотентной клетки, способной дифференцироваться одновременно в нескольких направлениях.

В настоящее время клеточная терапия считается одним из перспективных подходов в лечении пациентов, перенесших инфаркт миокарда [Wu S.M. et al., 2008]. Трансплантации некоторых видов клеток-предшественников после инфаркта миокарда у человека показали, что трансплантированные клетки не только вносят вклад в постдеструктивную регенерацию сердечной мышцы, но и стимулируют процесс образования новых кардиомиоцитов из эндогенных тканевых и циркулирующих в кровотоке прогениторных клеток, принимающих активное участие в процессе регенерации [Бутенко Г.М. и соавт., 2011].

Достижения в области клеточной терапии за последние десятилетия, позволили начать применение ММСК в клинической практике [Беленков Ю.Н., 2008]. Терапия стволовыми клетками стимулирует процессы ангиогенеза и дифференцировки как собственных "тканевых депо" стволовых клеток, так и

введенных из вне стволовых клеток в полноценные кардиомиоциты. Данная процедура позволяет улучшить перфузию миокарда, степень локальной и глобальной сократимости, препятствуют ремоделированию миокарда и процессам апоптоза клеток. Таким образом, клеточная кардиомиопластика представляет собой постоянно расширяющуюся клиническую и научную область, которая изучает применение различных видов малодифференцированных мультипотентных клеток в терапии сердечно-сосудистых заболеваний, главным образом ИБС и ХСН.

В настоящее время исследуют разные способы доставки биологически активных молекул в организм больного путём инъекции рекомбинантного белка, с помощью экспрессионного генетического вектора (плазмидного или вирусного) в клеточной культуре для изучения хоуминг эффекта. Также определение конечного нахождения трансплантируемых клеток производят с помощью радиоизотопной метки трансплантируемой культуры клеток. Так, при использовании клеток костного мозга от здоровых самцов-доноров после пересадки в миокард мышей реципиентов самок с поврежденным миокардом удается обнаружить кардиомиоциты, содержащие Y-хромосому. Но в то же время при трансплантации здоровым мышам самкам данный тип клеток не обнаруживается [Bittner et al., 2008].

Таким образом, изучения механизмов стимуляции регенерации миокарда при ишемическом его повреждении, как непосредственно самостоятельной дифференцировки трансплантируемого материала в те или иные ткани, а также различных цитокинов, выделяемых ими и/или стимулирующее влияния на собственные клетки участвующих в паракринной регуляции процессов ремоделирования кардиомиоцитов, представляет несомненный интерес в современных научных исследованиях.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объём и структура исследования

Исследование проводилось при полном соблюдении международных правил биоэтики.. Протокол экспериментального исследования был вынесен на рассмотрение локальному этическому комитету. После признания его соответствующим Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации 2010 г. пересмотра он был одобрен для дальнейшей работы. Следует также отметить, что эксперимент выполнен с соблюдением принципов гуманного обращения с животными, которые регламентированы приказами МЗ СССР №742 от 13.11.84 г. "Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных" и №48 от 23.01.85 г. "О контроле за проведением работ с использованием экспериментальных животных".

Крысы, выращенные в условиях вивария ИНВХ им. В. К. Гусака, в течение 1 недели проходили акклиматизацию в условиях лаборатории. Животные имели свободный доступ к воде и пище в течение акклиматизации и всего периода исследования.

Для эксперимента наиболее подходящими оказались крысы инбредной линии Вистар-Киото. Работа выполнена на шестимесчных особях средней массой $302,4 \pm 13,2$ грамм. Такой выбор обусловлен в первую очередь высокой степенью гомозиготности данных животных по большинству генов, что максимально приближало аллогенную трансплантацию клеток к идеальным условиям аутоотрансплантации, когда возможные реакции отторжения клеточного материала минимальны. Также учитывался тот факт, что моделирование ИМ выполнялось на крысах самках, в то время как для забора и дальнейшей трансплантации использовали клетки, полученные из костного мозга самцов. Это позволяло в процессе исследования идентифицировать трансплантируемые клетки в организме реципиента с помощью Y-хромосомы. В качестве доноров были отобраны 15

здоровых крыс мужского пола, которых было достаточно для культивирования необходимого количества ММСК.

Всего оперативному вмешательству подверглись 146 крыс самок (у 36 животных операция ограничивалась торакотомией, 110 крыс подверглись моделированию ИМ). Смертность, основной причиной которой являлись ранние ишемические аритмии, составила 18%, что соответствует данным литературы [Selye H, 1960]. Из оставшихся в живых 120 животных успешно перенесших хирургическое моделирование инфаркта (90 крыс) и моноторакотомию (30 крыс), а также 15 крыс не подвергавшихся никаким оперативным вмешательствам и другим манипуляциям были сформированы пять экспериментальных групп:

- 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 хирургическое моделирование ИМ, но никаких лечебных мероприятий за этим не следовало.
- 4 группа (n=30) – крысы, которым после моделирования ИМ выполняли трансплантацию ММСК;
- 5 группа (n=30) – крысы, которым после моделирования ИМ выполняли трансплантацию кММСК.

2.2. Методика моделирования инфаркта миокарда

Прежде чем приступить к выполнению основной части экспериментального исследования, мы изучили три модели инфаркта миокарда (путем высокочастотной электродеструкции, методом криоповреждения и методом лигирования коронарного сосуда), чтобы далее использовать наиболее приемлемую для

поставленных задач. Для нашей работы была необходима модель с четкой локализацией и, по возможности, равной площадью поражения миокарда. С одной стороны, электродеструкция позволяет четко анатомически адекватно получать повреждение миокарда у всех крыс, но имеет ряд негативных сторон. Модель электродеструкции миокарда (рисунок 2.1) не подошла по ряду причин:

- непосредственное действие тока вызывает нарушения ритма сердца, что зачастую приводит к летальному исходу;
- при одинаковых параметрах воздействия тока зачастую получаются абсолютные разные по глубине и площади участки повреждения;
- в очаг коагуляции попадают капилляры пограничных зон.

Рисунок 2.1 – Нанесение электроповреждения миокарду животного

1 - активный электрод коагулятора

Такие же проблемы ряд исследователей получал и при криоповреждениях миокарда. Данная методика в техническом отношении сложная, т.к. требовалось быстро и точно нанести криоудар, что, практически, невозможно. Используя этот метод, исследователь не может гарантировать, что криошрам приведет к ишемии и что, при этом, значительные повреждения миокарда не вызовут патофизиологические побочные эффекты, которые не связаны инфарктом

миокарда. Поэтому необходимым условием эксперимента отвечала модель ИМ путем лигирования коронарной артерии, которую и решено было использовать.

Всем животным 3, 4 и 5 групп моделирование ИМ выполнялось по разработанной нами методике (Патент Украины №39599; зарегестр 14.04.08г. опубл.10.03.09г Бюл. №5).

Оперативное вмешательство выполнялось в асептических условиях. Операции проводили в условиях общего обезболивания, путем интраперитонеального введения калипсола (Гедеон Рихтер А.О., Венгрия) и ксилазина (Ксила, Interchemie, Нидерланды) в дозах 60 мг/кг и 7,5 мг/кг соответственно.

Преимуществом данной методики следует считать быструю индукцию (2-3 минуты) и достаточную продолжительность общего обезболивания (110 ± 5 минут). После достижения адекватной глубины общего обезболивания проводились мероприятия обеспечения поддержания жизненно важных функций.

Следует отметить некоторые анатомические особенности крыс и ход дальнейшего оперативного вмешательства. При торакотомии, для обеспечения дальнейшего доступа к сердцу, необходимо вскрыть плевральную полость, которая, как известно, не имеет полного разделения на правую и левую. Таким образом, обеспечивается развитие двухстороннего пневмоторакса. Это значит, что без обеспечения проведения искусственной вентиляции легких по герметичному контуру крыса обречена на гибель из-за пневматического сжатия легких извне, а также в связи с шоковым состоянием в результате контакта воздуха с висцеральной и париетальной плеврой. А дальнейшее моделирование ИМ дополнительно усугубляет эту картину снижением артериального давления с развитием кардиогенного шока, а также запуском кардиопульмонального рефлекса, приводящего к остановке дыхания. Чтобы предотвратить летальный исход, с целью адекватной интраоперационной вентиляции и обеспечения проходимости дыхательных путей, осуществлялось наложение трахеостомы. Для этого на передней поверхности шеи по средней линии рассекалась кожа разрезом длиной 1 см, после чего тупо зажимом раздвигались мышцы (Патент Украины №39647;

зарегестр. 10.04.08г. опубл. 10.03.09г. Бюл. №5). На 3 мм ниже перстневидного хряща производился разрез, через который в просвет трахеи вводился пластиковый катетер 14G (диаметр до 2мм) (рисунок 2.2).

Рисунок 2.2 – Интубация трахеи и проведения ИВЛ у крыс по разработанной методике

Параметры ИВЛ подбирались исходя из физиологических особенностей крыс. При этом ЧДД в среднем составляло 50-60 в минуту, а объем вдоха рассчитывался из необходимых 1,5 мл на 100 гр веса животного. Адекватность вентиляции оценивалась на основании интраоперационного мониторинга сердечной деятельности и состояния кровоснабжения слизистой оболочки ротовой полости.

Левосторонняя торакотомия, выполненная в 5 межреберье обеспечивает адекватный операционный доступ как для работы, так и для мониторинга и контроля результата. Перикард вскрывается продольно. Передняя левожелудочковая артерия прошивается на уровне левого ушка после первого деления нитью Prolene 7/0 (фирмы Ethicon, Inc.) и лигируется, затем нить обрезается. Анатомической перевязке подвергается и вена, так как отделение её от

артерии не представляется возможным из-за высокой частоты сокращения сердца крысы и крайне близкого расположения двух сосудов. Любые грубые манипуляции или попытки их тупого разделения могут привести к травме и разрыву миокарда, что вызовет кровотечение с последующим летальным исходом экспериментального животного. Непрерывность перикарда не восстанавливается (рисунок 2.3).

Рисунок 2.3 – Оперативное вмешательство

А - торакотомия;

Б - прошивание передней межжелудочковой артерии;

В – макропрепарат сердца с указанием расположения лигатуры;

Г - ушивание плевральной полости

Макроскопически, непосредственно после завязывания лигатуры, оценивается формирование зоны ИМ. После этого производится послойное ушивание грудной полости. После ее герметизации выполняется пункция плевральной полости по стандартной методике: через пункционное отверстие во 2 межреберье по среднеключичной линии эвакуируется воздух, после чего дыхательный контур размыкается и крыса переводится на самостоятельное

дыхания без аппаратной поддержки. После удаления катетера трахея ушивается проленом 7/0 путем наложения узловых швов. Ушиваются мышцы, кожа.

Весь период нахождения крысы на операционном столе сопровождается непрерывным Холтеровским исследованием - мониторингом сердечной деятельности аппаратом Getemed HL5 (Германия) для постоянной регистрации показателей электрокардиографии (ЭКГ) (рисунок 2.4).

Рисунок 2.4 – Холтеровское исследование

А – аппарат для Холтеровского мониторингирования Getemed HL5 (Германия);
 Б – фиксация электродов для корректного отображения данных (1 – красный; 2 – зеленый; 3 – белый; 4 – коричневый; 5 - черный)

После полного восстановления эффективного внешнего дыхания, мышечного тонуса и адекватных поведенческих реакций животное помещали в улучшенные условия вивария по 1 животному в клетку. Средняя продолжительность операции составляла 12-15 минут. По её окончании, с целью профилактики гнойно-септических осложнений в послеоперационном периоде, вводили антибиотик гентамицин из расчета 3 мг / на 100гр веса животного ("Дарница", Украина).

2.3. Методика получения стволовых клеток

Костный мозг может быть использован для выделения 3 видов популяций стволовых клеток: гемопоэтических стволовых клеток, эндотелиальных прогениторных клеток и ММСК. Культивирование и работа с клеточным материалом выполнялась в лаборатории клеточного и тканевого культивирования ИНВХ им. В.К. Гусака НАМН Украины (рисунок 2.5).

Рисунок 2.5 – Механическая фрагментация костного мозга крыс

2.3.1. Методика получения ММСК

ММСК заранее получали из трубчатых костей 15 здоровых крыс самцов (рисунок 2.6).

Рисунок 2.6 – Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК) костного мозга крысы (фазово-контрастная микроскопия, увеличение x100)

Пошаговая методика забора, обработки и культивирования стволовых клеток представлена в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Методика получения мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга трубчатой кости крысы

Шаг 1	Для предотвращения бактериальной контаминации костный мозг промываем физиологическим раствором, содержащим антибиотики, обрабатываем механически и ферментативно (0,2% раствор коллагеназы).
Шаг 2	Помещаем в термостат при 37°C на 10-15 минут (рисунок 2.7)
Шаг 3	Заингибированную добавлением холодного фосфатно-солевого буфера клеточную суспензию центрифугируем при +4°C и сливаем супернатант.
Шаг 4	Клеточный осадок, состоящий из моноклеарной фракции костного мозга, ресуспендируем и подсчитываем клетки в камере Горяева, затем в количестве $1,5-2,0 \times 10^6$ ядродержащих клеток/см ² , ресуспендируем клетки в ростовой среде, состоящей из DMEM:F12 и 10% эмбриональной

	телячьей сыворотки, ЭТС (Биолот, Санкт-Петербург), помещаем в культуральный флакон и культивируем в CO ₂ -инкубаторе при 37°C с 5% содержанием CO ₂ и 95% влажностью (рисунок 2.8).
Шаг 5	Среду меняем через каждые три дня во всех культурах. Перед трансплантацией конфлуэнтную культуру клеток мы промывали буферным раствором и переводили в суспензию, используя стандартный раствор трипсина (0,25%) на среде Хэнкса без Mg ²⁺ и Ca ²⁺ (Sigma, USA).
Шаг 6	Ингибируем суспензию клеток добавлением ЭТС, затем центрифугируем, супернатант удаляем и суспензию клеток в физиологическом растворе отдаем на трансплантацию.

Рисунок 2.7 – Культивирование ММСК, рассеянных по культуральным флаконам, в CO₂-инкубаторе

Рисунок 2.8 – Культура ММСК в субконфлуентном состоянии (А) и выросшая до конфлуентного монослоя (Б) (фазово-контрастная микроскопия, увеличение x100)

Для идентификации крысиных ММСК рекомендовано [Dominici M. et al., 2006], чтобы выполнялись требования: негативно – CD 45, CD 34, c-kit (CD117); позитивно – CD 90, SSEA-1, CD 73. Фенотипирование МСК проводили с использованием метода проточной цитофлюоресценции на аппарате Partec CyFlow SL с использованием мышиных моноклональных антител (Dako).

В дальнейшем культура костномозговых ММСК второго пассажа вводилась в виде одноклеточной суспензии крысам 4 группы в бедренную вену из расчета 10^6 на 1 животное. Формирование терапевтической дозы производилось из расчета примерно 5×10^6 клеток/кг живого веса. Клетки подсчитывали в камере Горяева.

2.3.2. Методика получения кММСК

Для работы с 5-й группой экспериментальных животных мы вынуждены были заранее заготовить коммитированные ММСК. Для этого после наступления 3-их суток этапа культивирования ММСК проводили добавление в культуральную среду 5-азациитидина (рисунок 2.9) в концентрации 6 мкМ/л на 24 часа. (Tomita, 1999); после этого среда заменялась на среду IMDM ("Gibco", Великобритания),

содержащую дополнительно инсулин 0.4 мкМ/л, дексаметазон 10 нМ/л и фактор роста фибробластов b (FGFb) ("Sigma", USA) в концентрации 20 нг/мл, а также 10%-ю бычью эмбриональную сыворотку (Биолот, Санкт-Петербург). Через каждые 3 суток производилась смена среды. После 3-х недель культивирования материал был готов для трансплантации животным. Готовность клеток к трансплантации определялась наличием клеточного монослоя в культуральных флаконах, что позволяло суммарно собрать терапевтическую дозу. В дальнейшем культура костномозговых ММСК второго пассажа вводилась в виде одноклеточной суспензии крысам 5 группы в бедренную вену из расчета 10^6 на 1 животное. Формирование терапевтической дозы производилось из расчета примерно 5×10^6 клеток/кг живого веса.

Рисунок 2.9 – Микрофотография культуры ММСК с генерированными миотубулами, предварительно обработанной азациитидином (кардиомиоцитоподобная морфология с видимым сокращением миотубул) (фазово-контрастная микроскопия, увеличение $\times 200$)

Для доказательства направленной кардиомиоцитарной дифференцировки ММСК, проводили иммуногистохимическую идентификацию этих клеток на

кардиоспецифические белки тропонин I и актин с помощью мышинных моноклональных антител (DAKO, Дания). Установлено, что уже к концу 3-й, началу 4-й недели культивирования количество тропонина I положительных клеток достигает 40%. При этом нами были выявлены как одно – так и многоядерные клетки, которые при фазово-контрастной микроскопии спонтанно сокращались. По физиологическим и иммуногистохимическим характеристикам они соответствуют кардиомиоцитам, что разрешило нам перейти к следующему этапу исследования – непосредственной трансплантации указанных типов клеток крысам с моделью ИМ.

2.4. Методика внутривенного введения ММСК и кММСК

При выборе методики трансплантации мы, в первую очередь, руководствовались выбором метода, основанным на наибольшей эффективности и малотравматичности методики. В конечном счете из интракардиального, внутрижелудочкового и внутривенного пути введения клеточного трансплантата мы остановились на последнем.

Рисунок 2.10 – Пункция бедренной вены у крысы

С целью проведения данной манипуляции животное фиксируется в положении на спине, после чего в асептических условиях производится линейный

разрез (0,5 см) над сосудистым пучком левой нижней конечности в районе верхней трети бедра. Инсулиновым шприцом производится аккуратная пункция вены с последующим введением культуры клеток из расчета 10^6 на 1 животное. Формирование терапевтической дозы производилось из расчета примерно 5×10^6 клеток/кг живого веса (рисунок 2.10).

2.5. Иммунобиохимические методы

Наряду с инструментальным обследованием всем животным участвовавшим в эксперименте проводилось исследование уровня суммарной концентрации нитрат и нитрит ионов, а также уровня ЭТ-1, VEGF и FGF в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа. Забор крови для исследования выполнялся в сроки 1, 6 часов и 1, 7 и 30 суток после оперативного вмешательства. В дальнейшем путем центрифугирования получали сыворотку, являющуюся субстратом для лабораторного анализа.

2.5.1. Методика определения суммарной концентрации нитрат и нитрит ионов

Метаболиты NO (суммарную концентрацию нитрат и нитрит ионов) определяли в сыворотке крови колориметрическим методом с реагентом Грисса и предварительным восстановлением нитрат–ионов в нитрит хлоридом ванадия. Плазму получали центрифугированием цельной крови при 3000 об/мин в течение 10 мин и депротеинизировали путем добавления 1/20 объема $ZnSO_4$ в концентрации 300 г/л. После центрифугирования при комнатной температуре (15 мин при 3000 об/мин) в супернатанте проводили восстановление нитратов до нитритов с помощью редуктора нитратов в присутствии 0,5M NH_4OH , pH 9,0 в качестве буфера (отношение объема плазмы к объему буфера 9:1). После восстановления супернатант смешивали с равным объемом реактива Грисса, инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре для развития окраски

и измеряли интенсивность поглощения на спектрофотометре КФК-3 (Россия) при 540 нм. Концентрацию нитритов определяли по калибровочной кривой (5-50 мкМ NaNO₂).

2.5.2. Методика определения концентрации эндотелина-1

Для определения содержания ЭТ – 1 в сыворотке крови использовался иммуноферментный набор для количественного определения ЭТ - 1 в сыворотке, плазме, моче, слюне и супернатантах клеточных культур производства компании "Biomedica", Австрия. Перед началом анализа все реагенты и образцы сывороток размораживались и выдерживались до достижения комнатной температуры (18 – 26 °С). В лунки вносились по 50 мкл стандартов, образцов и контролей в дублях, в каждую ячейку добавлялись детектирующие антитела (по 200 мкл), тщательно перемешивались. Стрипы инкубировались под пленкой в течение 24 часов при комнатной температуре.

После инкубации ячейки пятикратно промывались 300 мкл разведенным буфером для промывок. Далее во все ячейки добавлялся ферментный конъюгат (по 200 мкл) и в течение часа стрипы инкубировались под пленкой при комнатной температуре (18 - 26 °С). После удаления содержимого ячейки 5-тикратно промывались 300 мкл разведенным буфером для промывок.

Далее во все ячейки вносился субстрат (по 200 мкл) и стрипы инкубировались в течение 30 минут в защищенном от света месте. Реакция останавливалась внесением 50 мкл стоп - реагента и измерялась оптическая плотность растворов в ячейках с помощью спектрофотометра "Униплан" (Россия) вертикальным лучом с длиной волны 450 нм относительно воздуха.

Построение калибровочной кривой осуществлялось по осям абсцисс и ординат, где первая была представлена в качестве контроля, когда использовались растворы с заданной концентрацией эндотелина-1: 0 фмоль/мл, 0,625 фмоль/мл, 1,25 фмоль/мл, 2,5 фмоль/мл, 5 фмоль/мл, 10 фмоль/мл, а вторая по значениям оптической плотности раствора в лунках. Концентрацию эндотелина-1 в

исследуемых образцах сыворотки определяли по значениям оптической плотности, используя калибровочную кривую.

2.5.3. Методика определения концентрации VEGF

Концентрацию VEGF в сыворотке крови определяли с помощью стандартных наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа (Genesis Biotech. Inc. Тайвань) в соответствии с инструкциями производителя. Метод определения основан на твердофазном "сэндвич" варианте иммуноферментного анализа (ИФА) с применением анти-VEGF кроличьих поликлональных антител к VEGF человека. Для построения стандартной кривой использовали калибровочные образцы с известной концентрацией VEGF, входящие в состав набора. Стандартная кривая свидетельствует о чувствительности и линейности детекции измеряемых концентраций VEGF в диапазоне 10–2000 пг/мл. Оптическую плотность растворов измеряли на многофункциональном фотометре ELX800 фирмы "BioTek" (США). Исходя из прямой пропорциональности между величиной оптической плотности и концентрацией VEGF в стандартных образцах, вычисляли концентрацию VEGF в исследуемых образцах. Внутренний контроль качества проводили с использованием контрольного образца, входящего в состав набора. Концентрацию исследованных показателей выражали в пг/мл.

2.5.4. Методика определения концентрации FGF

Забор цельной крови выполнялся у крыс утром натощак, в дальнейшем кровь была центрифугирована в течение 15 минут со скоростью 30 000 оборотов/сек. Полученную таким образом сыворотку замораживали и хранили при температуре -28С до накопления необходимого количества проб. С помощью набора реагентов R&D Systems (США) проводилось исследование морфогенетических белков иммуноферментным анализом. Использовался иммунологический метод количественного определения белков на основании специфической реакции

"антиген-антитело" с помощью фотометра ELX800 фирмы "BioTek" (США). Выявление образовавшегося комплекса выполняли с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала. В каждом исследовании применен "сэндвич" - метод. К носителю с иммобилизованными антителами добавляли сыворотку, содержащую анализируемый антиген (FGF), и в процессе инкубации на первой стадии твердой фазе происходит образование комплекса "антиген-антитело". В последующем носитель отмывали от не связавшихся компонентов и к нему добавляли меченные ферментом специфические антитела. После второй инкубации и удаления избытка конъюгата антител с ферментом, определяли ферментативную активность носителя, которая пропорциональна начальной концентрации исследуемого антигена. На стадии выявления специфического иммунокомплекса антиген фиксируется между молекулами иммобилизованных и меченых антител. Ферментативная цветная реакция проходит в присутствии перекиси водорода и субстрата, представленного неокрашенным соединением, которое в процессе пероксидазной реакции окисляется до окрашенного продукта на финальном этапе постановки. Интенсивность окрашивания зависит от количества выявленных специфических антител. Результат оценивали спектрофотометрически. Внутренний контроль качества проводили с использованием контрольного образца, входящего в состав набора.

2.6. Выполнение ультразвукового исследования сердца

Для проведения ультразвукового исследования (УЗИ) анатомического и функционального состояния сердца применялся аппарат GE Vivid (США) с датчиком 12 МГц. Диагностика производилась под действием анестезии путем интраперитонеального введения калипсола и ксилазина в дозах 60 мг/кг и 7,5 мг/кг соответственно. Грудная клетка животного тщательно подготавливалась к исследованию. После локализации датчика на грудной клетке выполнялось двухмерное и М-режим исследование с использованием тканевой и цветной доплерографии. Последняя выполнена с использованием электронного увеличения компьютером на частоте 205-230 кадров в сек., под углом в 30 градусов и

увеличением изображения от 15 мм. Тканевое ЭХО-исследование отслеживалось в ручном режиме, с дальнейшим просчитыванием средних показателей по данным 3-х последовательных циклов сердца, которые были зафиксированы в цифровом режиме. Затем, с помощью лицензионного программного обеспечения Echo Pac, GE Medical System, прилагающегося к аппарату УЗИ, измерялись систолические показатели на основании данных природных акустических маркеров в течение двух последовательных кадров. Изображение получали с использованием трансдусера 10 S (12,0 МГц).

2.7. Методика проведения электрокардиографии

В соответствии с концепцией о сердечно-сосудистой системе как индикаторе адаптационных возможностей организма уровень ее функционирования рассматривается как ведущий показатель, отражающий равновесие организма со средой. Сердце является довольно чувствительным индикатором всех происходящих в организме функционально значимых процессов, поэтому в экспериментальных исследованиях электрокардиография является весьма ценным интегральным методом изучения реакций организма на различные воздействия (рисунок 2.11).

Рисунок 2.11 – Электрокардиограмма интактной крысы линии Вистар-Киото

В частности данному исследованию принадлежит важнейшая роль в диагностике инфаркта миокарда, определении его локализации и размеров.

Неоднократно экспериментально доказывалось, что некроз миокарда находит отображение в изменениях комплекса QRS ЭКГ; повреждения миокарда соотносятся с элевацией сегмента ST (систолический ток повреждения), а проявления ишемии - как с элевацией, так и с депрессией сегмента ST в сочетании с изменениями зубца Т (рисунок 2.12).

Рисунок 2.12 – Электрокардиограмма крысы линии Вистар-Киото после моделирования ИМ

При этом важно, чтобы в период проведения исследований животное не подвергалось нежелательным воздействиям, связанным, в частности, со страхом, когда крыса насильственно помещается в тесную клетку и находится там в состоянии полного обездвиживания, что неизбежно сопровождается сильным стрессом для животного, вызывая весь каскад патологических явлений. В связи с этим электрокардиография проводилась нами в условиях медикаментозного сна с фиксацией животного в положении на спине. Исследовалось I отведение с помощью аппарата ЭК01Т (импульс 1мВ, амплитуда 20 мм, скорость протяжки ленты 50 мм/с). Также фиксировали предварительные показатели ЧСС до проведения стресс теста.

По окончании измерений электроды кардиографа извлекали, возможные повреждения кожных покровов обрабатывали антисептиком. Для выхода из

наркоза животное помещалось в отдельный бокс повышенной комфортности со свободным доступом к воде.

2.8. Проведение стресс-нагрузки изопропилнорадреналином

На 30 сутки, после предварительных записей показателей ЭКГ и ЧСС по описанной выше методике, животное, все ещё находящееся под действием медикаментозного сна, подвергалось стресс нагрузке, которая моделировалась путем внутримышечного введения 1% раствора изопропилнорадреналина в дозе 3 мкг/кг ("Sigma", США). Измерения ЧСС производили 5 раз - каждые 3 минуты в течение последующих 15 минут.

2.9. Методы гистологической оценки

Предназначенные для морфологического исследования органы и ткани фиксировали в 10% растворе забуференного формалина на протяжении 24 часов при pH 7,0. Окружающие ткани перед фиксацией аккуратно удалялись.

Затем кусочки ткани подвергались обезвоживанию и заливались в парафин при температуре не выше 60°C на заливочной станции Leica EG1140 H/C (Leica, Германия). С помощью ротационного микротома Microm HM325 с системой переносов (STS) (Microm International GmbH, Германия) готовились срезы толщиной 5 ± 1 мкм. В дальнейшем они размещались на стеклах Super Frost (Menzel, Германия), после чего окрашивались гематоксилином и эозином. При исследовании срезов сердечной мышцы ее также окрашивали по Ван-Гизон, после чего размещали в канадский бальзам.

Также проводилось окрашивание ткани миокарда для выявления актина, тропинина, пролиферирующих клеток. Для этого были использованы первичные антитела к тропонину I (клон JLT-12, Sigma-Aldrich, Германия), к ядерному антигену пролиферации клеток PCNA (клон PC10, DAKO, Дания), актину (клон HNF35, DAKO, Дания). В дальнейшем с помощью системы детекции DAKO

Advance и красителя DAB+ они визуализировались. Методика окрашивания соответствовала инструкции рекомендованной изготовителем (рисунок 2.13).

Рисунок 2.13 – Иммуногистохимическое окрашивание на актин (А) и тропонин (Б), увеличение x 200

Окраска на выявление PCNA. PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) - антиген ядер клеток, готовящихся к делению, максимально экспрессирующегося в S-фазе и соответственно отражающего пул пролиферирующих клеток, активность которых является одним из ключевых механизмов. PCNA необходим для клеточного синтеза ДНК. Это антитело реагирует с пролиферирующими клетками в большом количестве нормальных тканей. Крысиный PCNA сделан в белке А (вектор экспрессии pR1T2T). Инкубационный период в течение 30 минут при комнатной температуре. Фиксированные в формалине и залитые парафином тканевые срезы требуют демаскиацию антигена при высокой температуре в микроволновой печи Samsung (Корея), в 10 мМ цитратном буфере pH 6.0 до иммунной окраски. Клеточная локализация – ядерная. Положительная окраска визуализируется в виде коричневой окраски ядер клеток.

Окраска на выявление Y-хромосомы. Регенерацию антигенных возможностей ткани проводили в растворе Antigen Retrieval Solution (DAKO, Дания). Демаскирование клеточных антигенов и усиление иммуногистохимической реакции на срезах, фиксированных в формалине проводили в микроволновой печи Samsung 430 (Корея) и выполняли до окрашивания срезов, в 10мМ цитратном буфере при pH 6,0. Гематоксилин Майера использовался для докрашивания препаратов.

Для детекции введенных клеток, взятых от самца, использовали гибридизацию *in situ* с определением Y-хромосомы. Процесс гибридизации состоял из 2 этапов:

- Подготовленные срезы депарафинизировали и дегидратировали, затем обрабатывали раствором протеиназы К.
- Затем производилась денатурация в гибридизаторе DAKO Hybridizer (DAKO, Дания) в течение 10 минут при температуре 65°C, а затем, при 37°C, на протяжении 1 часа.

С целью денатурации наносили раствор, подогретый до 65°C. Затем использовали смесь проб до 12 и Y-хромосомы (ID Labs Biotechnology, США), меченные биотином и FITC, соответственно. Согласно инструкции производителя окраска 12-й хромосомы является качественным контролем реакции для определения Y-хромосомы. После этого срезы покрывали покровным стеклом, края запечатывали уплотнителем и гибридизовали при 37° на протяжении 6 часов. После производили промывку срезов и детекцию с помощью систем DAKO GenPoint с тирамидной амплификацией (DAKO, Дания). Препараты окрашивались дополнительно гематоксилином Майера (Sigma, США), после чего размещались в канадском бальзаме.

Световая микроскопия осуществлялась на микроскопе Axiostar (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографирование и морфометрическое исследование выполнялось с помощью программы Analysis Pro 3.2 (Германия) и

исследовательского микроскопа Olympus AX70 (Япония) согласно рекомендациям производителей

Рисунок 2.14 – Идентификация клеток миокарда содержащих Y-хромосому крыс-самцов методом гибридизации in situ, увеличение x150

2.10. Статистические методы исследования

Статистическую обработку данных результатов экспериментального исследования проводили на компьютере AMD Athlon™ X4 740 Quad Core Processor 3.20 GHz. с помощью лицензионного пакета программ Microsoft Excel 2013, Statistica 6.0. Для проверки распределения данных использовали тест Шапиро-Уилка (W), что позволило использовать его даже при небольшой выборке ($n < 30$). 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 $p = 0,05$. Данные считали достоверными при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Изменение показателей суммарной концентрации нитрат и нитрит ионов под влиянием трансплантации ММСК и кММСК

При изучении уровней оксида азота была определена общая закономерность содержания данного вазодилататора у крыс в физиологических условиях без экзогенного вмешательства в их организм (группа № 1) что соответствовало нормальным показателям (таблица 3.1). Также изучен его уровень в динамике после выполнения торакотомии (группа № 2), экспериментального моделирования ИМ без лечения (группа № 3), а также с лечением трансплантацией ММСК (группа № 4) и кММСК (группа № 5).

Таким образом достоверных различий в полученных показателях между 1 и 2 группами нет. Это означает, что само по себе проведение оперативного вмешательства (торакотомии) вызывает статистически незначительное увеличение показателей оксида азота по сравнению с интактными животными. И наоборот у животных, которым была проведена операция моделирования ИМ значения статистически превышали показатели нормы первой группы на протяжении всего исследования.

Лечебные мероприятия проведенные крысам 4 и 5 групп с использованием ММСК и кММСК оказались одинаково эффективными по отношению к показателям оксида азота. В тоже время они значительно отличались от 3 группы, что доказывает эффективность применения ММСК и кММСК для дополнительной стимуляции данного компенсаторно-регенераторного механизма.

Характерно, что максимальный пик отмечен в сроки 24-х часов (1 сутки) и был максимальным в 4 и 5 группах составляя $1,26 \pm 0,03$ мкг/мл и $1,22 \pm 0,04$ мкг/мл соответственно.

**Таблица 3.1 - Уровень показателя оксида азота в плазме крови
экспериментальных животных в разные сроки эксперимента**

Группа	Срок после моделирования инфаркта миокарда				
	1 час (мкг/мл)	6 часов (мкг/мл)	1 сутки (мкг/мл)	7 суток (мкг/мл)	30 суток (мкг/мл)
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**

*Примечания: при сравнении с предыдущим показателем *- $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$; 1 группа – интактные животные; 2 - группа крыс с торакотомией без моделирования ИМ; 3 – группа крыс с ИМ без лечения; 4 – ИМ+трансплантация ММСК; 5 – ИМ+трансплантация кММСК.*

3. 2. Изменение уровня эндотелина-1 под влиянием трансплантации ММСК и кММСК

ЭТ-1 является наиболее активным изомером сосудосуживающих пептидов данной группы, играющих ключевую роль в гомеостазе кровеносных сосудов. Будучи самым мощным из известных сосудосуживающих агентов, конечный эффект эндотелина зависит от его концентрации. При низкой концентрации больше проявляется его сосудорасширяющий эффект благодаря связыванию с эндотелиновыми рецепторами группы В (ЕТ_В) на эндотелии. Однако, при более высокой концентрации он начинает связываться с эндотелиновыми рецепторами группы А (ЕТ_А), расположенными на гладкомышечных клетках, и проявляет свою основную активность, вызывая значительное сужение сосудов, равного которому в организме не существует. Образуясь не только в эндотелии, но и в гладких мышцах

сосудов, нейронах, глии, мезенгиальных клетках почек, печени и других органах, его полупериод жизни составляет всего 10-20 мин, а в плазме крови — 4-7 мин. Таким образом, отслеживая его уровень в различные временные периоды после ИМ мы можем наглядно демонстрировать наличие или отсутствие терапевтического эффекта при той или иной тактике лечения. Эффект достигается путем снижения концентрации ЭТ-1 в плазме крови за счет воздействия на его избыточное образование.

После определения нормального физиологического показателя данного пептида в организме крыс линии Вистар-Киото (животные 1 группы), согласно протоколу исследования (таблица 3.2) определялась его концентрация оставшимся экспериментальным группам животных через 1, 6 часов после оперативных и лечебных воздействий (трансплантации ММСК или кММСК), а также на 1, 7 и 30 сутки.

Таблица 3.2 – Уровень ЭТ-1 в плазме крови экспериментальных животных в разные сроки эксперимента

Группа	Срок после моделирования инфаркта миокарда				
	1 час (моль/мл)	6 часов (моль/мл)	1 сутки (моль/мл)	7 суток (моль/мл)	30 суток (моль/мл)
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***

*Примечания: при сравнении с предыдущим показателем *- $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; 1 группа – интактные животные; 2 - группа крыс с торакотомией без моделирования ИМ; 3 – группа крыс с ИМ без лечения; 4 – ИМ+трансплантация ММСК; 5 – ИМ+трансплантация кММСК.*

Концентрация ЭТ-1 (таблица 3.2) значительно повышается при моделировании модели инфаркта миокарда у крыс (группы 3, 4, 5) по сравнению со здоровыми особями. Избыточное образование ЭТ-1 наблюдается во всех экспериментальных группах, что говорит о чувствительности данного показателя к любому травматическому воздействию на организм. Так в срок 1 час после возникновения ИМ, его значения в 3 группе вырос с $5,2 \pm 0,4$ моль/мл до $10,6 \pm 0,7$ моль/мл, такие же значения ЭТ-1 были и в 4, 5 группах. Во 2 группе через 6 часов после торакотомии уровень ЭТ-1 возрос до $7,8 \pm 0,4$ моль/мл и достигает максимальных значение к концу 1 суток $8,1 \pm 0,3$ моль/мл, что связано, по всей вероятности, с травматичностью оперативного вмешательства, тем не менее к 7 суткам он не отличается от нормы и остается таким же до конца эксперимента. В 3 группе концентрация ЭТ-1 достигает максимальных значений уже к 6 часам эксперимента и равняется $12,8 \pm 0,5$ моль/мл, остается в данном диапазоне до 7 суток, в этот срок происходит снижение концентрации до $8,8 \pm 0,3$ моль/мл. Затем в срок 1 месяц она равняется $5,3 \pm 0,4$ моль/мл, что не отличается от нормы. Таким образом, ЭТ-1, как мощный вазоконстриктор, играет ключевую роль в патогенезе инфаркта миокарда и заканчивает свою агрессивное влияние к концу 1 месяца после моделирования ишемического повреждения сердца. В 4 группе концентрация ЭТ-1, как и в предыдущей достигает максимума к 6 часам эксперимента и равняется $12,8 \pm 0,6$ моль/мл, но уже в срок 24 часа он снижается до $9,1 \pm 0,3$ моль/мл, а к 7 суткам – $6,9 \pm 0,4$ моль/мл, что не отличается от нормы. Таким образом, мы видим, что трансплантация ММСК приводит к стабилизации показателя ЭТ-1 к 7 суткам опыта и пик его концентрации наблюдается к 6 часам опыта. В 5 группе также, как и в 4, в срок 6 часов опыта наблюдается повышение концентрации ЭТ-1 до $12,9 \pm 0,7$ моль/мл и в срок 24 часа снижается до $10,1 \pm 0,3$ моль/мл. Однако, в срок эксперимента 7 суток он снижается до $7,3 \pm 0,4$ моль/мл, что выше нормы и нормализуется лишь к концу опыта. Таким образом, мы видим, что трансплантация кММСК приводит также к стабилизации показателя ЭТ-1, как и трансплантация ММСК, однако эффективность меньше и срок нормализации удлиняется. Данный факт может свидетельствовать о более выраженном

паракринном влиянии ММСК по сравнению с кММСК на течение инфаркта миокарда у крыс.

3.3. Изменение уровня фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) под влиянием трансплантации ММСК и кММСК

Известно, что повышенные концентрации VEGF стимулируют образование капиллярного русла в зонах интактного миокарда, пограничной и инфарктной зонах при развитии постинфарктного кардиосклероза. Наряду с этим эндотелиальный фактор роста также обладает митогенным эффектом на клетки эндотелия сосудов. А в физиологических концентрациях VEGF действует как фактор выживания эндотелия, индуцирует экспрессию эндотелиальной NO-синтазы и образование NO, в то время как при отсутствии или недостатке его эндотелиальные клетки могут подвергаться апоптозу. Вместе с тем VEGF обладает митотической активностью и по отношению к кардиомиоцитам, стимулируя тем самым кардиомиогенез. При возникновении инфаркта миокарда ростовые факторы, находящиеся в цитоплазме кардиомиоцитов, высвобождаются. Следовательно, с увеличением количества некротизированных клеток уровень факторов роста изменяется. В эксперименте мы максимально минимизировали данный эффект путем стандартизации модели ИМ, вызывая максимально приближенные по количеству погибших клеток зоны некроза. Важность данного фактора роста невозможно переоценить, поэтому ему уделено особое место в исследовании. Концентрация определялась всем группам животных, включая первую, на модели которой отображался физиологический уровень VEGF у здоровых крыс самок (таблица 3.3). Динамика наблюдений заключалась в измерении концентрации данного показателя через 1, 6 часов и через 1 сутки после проведенной ложной (группа 2) или истинной операции (группы 3,4,5) с одновременным внутривенным введением клеточной культуры ММСК (группа 4) или кММСК (группа 5). Немаловажными являются и показатели отдаленных наблюдений на 7 и 30 сутки после основного этапа эксперимента.

Таблица 3.3 – Уровень VEGF в плазме крови экспериментальных животных в разные сроки эксперимента

Группа	Срок после моделирования инфаркта миокарда				
	1 час (пг/мл)	6 часов (пг/мл)	1 сутки (пг/мл)	7 суток (пг/мл)	30 суток (пг/мл)
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*

*Примечания: при сравнении с предыдущим показателем *- $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$; 1 группа – интактные животные; 2 - группа крыс с торакотомией без моделирования ИМ; 3 – группа крыс с ИМ без лечения; 4 – ИМ+трансплантация ММСК; 5 – ИМ+трансплантация кММСК.*

В исследовании VEGF оказался очень чувствительным фактором и его динамические изменения наглядно отражают эффект травматического повреждения тканей и органов после основных этапов эксперимента, а также терапевтический эффект внутривенного введения использованных в работе культур клеток. Так, уже в группе ложнооперированных животных показатель достоверно увеличивается с 6 часа после проведения операции и продолжал ту же динамику на 1 и 7 сутки. Пиковые значения, как и ожидалось, во всех группах наблюдаются в срок первых суток и являются максимальными в 4 и 5 группах составляя $288,22 \pm 23,46$ пг/мл и $265,9 \pm 20,11$ пг/мл соответственно. Эти же группы во все временные периоды достоверно отличаются от показателей 3 группы где моделирование ИМ не сопровождалось какой-либо терапией. Примечательно, что удалось выявить достоверные отличия в показателях 4 и 5 групп в срок 7 и 30 суток. Так терапия ММСК оказалась более эффективной чем применение кММСК и

составляла в эти временные промежутки $189,57 \pm 28,47$ пг/мл и $132,74 \pm 19,87$ пг/мл против $151,2 \pm 42,21$ пг/мл и $102,3 \pm 14,21$ пг/мл соответственно ($p < 0,05$).

3. 4. Изменение показателей фактора роста фибробластов (FGF) под влиянием трансплантации ММСК и кММСК

FGF является мощным модулятором клеточной дифференцировки, пролиферации и выживаемости. Кроме активации фибробластов, клетками-мишенями FGF являются эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки сосудов и др. Фибробластический фактор также принимает участие в дифференцировке адипоцитов, подавляет апоптоз, оказывает гистопротекторное действие и способствует выживанию клеток в условиях гипоксии и при повреждении тканей, стимулируя выработку IL-6 [Liu, 2012]. В исследовании ему уделено особое внимание, так как он экспрессируется в ишемизированном миокарде и может играть ключевую роль в формировании коллатералей стимулируя рост эндотелиальных клеток и организуя их в трубчатую структуру. Таким образом, он ускоряет ангиогенез, рост новых кровеносных сосудов из уже существующей сосудистой сети. По нашим данным FGF является более мощным ангиогенным фактором, нежели фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Изучение уровня его содержания в плазме крови экспериментальных животных производилось по той же схеме, что и других факторов активации ангиогенеза представленных в исследовании (таблица 3.4).

В последствии показатели сравнивались не только с физиологической нормой изученной на первой группе животных, но и динамически как по временным критериям, так и по сравнению эффективности применяемой тактики лечения. Из полученных результатов следует, что в отличие от других биохимических маркеров, изученных в работе, пиковый показатель FGF практически во всех группах определялся на 6 часу после оперативного вмешательства, а не в срок 24 часов, и имел очень выраженный подъем концентрации.

Таблица 3.4 – Уровень FGF экспериментальных животных в разные сроки эксперимента

Группа	Срок после моделирования инфаркта миокарда				
	1 час (пг/мл)	6 часов (пг/мл)	1 сутки (пг/мл)	7 суток (пг/мл)	30 суток (пг/мл)
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*

*Примечания: при сравнении с предыдущим показателем *- $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$; 1 группа – интактные животные; 2 - группа крыс с торакотомией без моделирования ИМ; 3 – группа крыс с ИМ без лечения; 4 – ИМ+трансплантация ММСК; 5 – ИМ+трансплантация кММСК.*

Так в 3 группе животных к первому часу эксперимента концентрация FGF имела увеличение в 5 раз по сравнению с нормой (98,12±13,11 пг/мл против 19,98±12,99 пг/мл ($p<0,01$)), а уже к 6-му часу этот показатель составил 487,35±62,13 пг/мл, что составляет практически 25 кратное увеличение. При этом дальнейшая динамика снижения уровня FGF в контрольных точках эксперимента в 3 группе значительно превышала таковую в 4 и 5 группе, где пиковые концентрации 6 часа были ещё больше. Это может свидетельствовать об эффективности проводимой клеточной терапии в виде стимулирующего влияния на уровень FGF, особенно в самые важные первые несколько суток после возникновения ИМ. Кроме этого, на 7 сутки эксперимента уровень FGF в 4 группе (применялись ММСК) был статистически значительно более высоким, чем в 5 группе (кММСК) 127,23±11,35 против 86,32±12,33 соответственно ($p<0,01$).

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. Результаты исследования хронотропной функции сердца

Базовое значение средней ЧСС крыс линии Вистар-Киото принимавших участие в эксперименте составило 485 ± 13 уд/мин. Следует отметить что мониторинг данного показателя во время основного этапа эксперимента и в ближайшем постоперационном периоде выявил значительное снижение ЧСС во всех группах животных, которым проводилось моделирование ИМ, и достигало $142,5 \pm 56,8$ уд/мин. Но уже через 2 часа данный показатель соответствовал $270 \pm 86,25$ уд/мин (рисунок 4.1).

Рисунок 4.1 – Изменение частоты сердечных сокращений у животных при моделировании инфаркта миокарда

1 - частота сердечных сокращений у животных до моделирования инфаркта миокарда; 2 - частота сердечных сокращений у животных при моделировании инфаркта миокарда; 3 - частота сердечных сокращений у животных через два часа после моделирования инфаркта миокарда

При динамическом наблюдении за животными с достоверным экспериментальным ИМ в дальнейшем были выявлены периоды увеличения базовых показателей ЧСС. Так через неделю после проведения оперативного вмешательства данный показатель деятельности сердечно-сосудистой системы был значительно выше изначальных значений и в среднем составлял 541 ± 19 уд/мин. Но уже через две недели статистически значимых различий ($p < 0,05$) с данными полученными от интактных животных выявлено не было, ЧСС составил в среднем 501 ± 32 уд/мин, а через 30 дней 503 ± 13 уд/мин (рисунок 4.2).

Рисунок 4.2 – Влияние ИМ на динамику изменений частоты сердечных сокращений у экспериментальных животных на разных сроках эксперимента

1–интактные животные;

2–животные через семь дней после моделирования инфаркта миокарда;

3–животные через четырнадцать дней после моделирования инфаркта миокарда;

4–животные через тридцать дней после моделирования инфаркта миокарда

В начале наблюдений за крысами на 30 сутки эксперимента, до введения изопропилнорадреналина, базовые значения ЧСС существенно различались у всех групп животных (таблица 4.1). У животных 1 группы этот показатель составил 485 ± 43 уд/мин., у 2 группы ЧСС было на уровне 492 ± 17 уд/мин ($p \geq 0,05$). У крыс после моделирования инфаркта миокарда отмечались более высокие значения – 503 ± 23 уд/мин ($p \geq 0,05$). Введение ММСК животным с моделью инфаркта миокарда привело к снижению базовых значений ЧСС на 30 сутки до 489 ± 14 уд/мин ($p \geq 0,05$). Внутривенное введение кММСК также отразилось некоторым снижением ЧСС до средних 492 ± 11 уд/мин соответственно ($p \geq 0,05$).

Таблица 4.1 – Показатели ЧСС у экспериментальных животных при моделировании стрессовой нагрузки изопропилнорадреналином на 30 сутки эксперимента

Показатель	Базовые значения (уд/мин)	Максимальные показатели (уд/мин)	Результат на момент окончания нагрузки (уд/мин)
1 группа	485 ± 13	$527 \pm 18^{**}$	$490 \pm 13^{***}$
2 группа	492 ± 17	$519 \pm 25^{*}$	$492 \pm 16^{**}$
3 группа	503 ± 13	525 ± 15	$515 \pm 15^{*}$
4 группа	489 ± 14	$528 \pm 9^{**}$	$503 \pm 15^{***}$
5 группа	492 ± 11	$529 \pm 11^{*}$	$490 \pm 10^{***}$

*Примечание: * - при $p < 0,05$; ** - при $p < 0,01$; *** - при $p < 0,001$*

Применение изопропилнорадреналина вызвало прогнозируемое увеличение ЧСС во всех группах животных. Как видно из таблицы 4.1. максимальные показатели ЧСС обеспечили относительно равномерный прирост количества ударов в минуту относительно базовых значений в каждой из групп. Лишь в группе с ИМ без лечения (3 группа) реакция организма была наименьшей.

Так как, помимо максимальных значений, хронотропный эффект удобно оценивать по величине абсолютного прироста. Мы отследили данный показатель

для каждой из групп. У интактных животных первой группы он составил 43 уд/мин ($p \leq 0,05$), у животных с моноторакотомией 37 уд/мин ($p \leq 0,05$). Развитие инфаркта миокарда сопровождалось снижением величины стресс – индуцирующего увеличения ЧСС до 22 уд/мин ($p \geq 0,05$). Введение ММСК и кММСК приводило к значительному увеличению реакции сердца на стресс – моделирующую нагрузку. Так в 4 и 5 группах абсолютный прирост данного показателя составил 39 и 37 уд/мин ($p \leq 0,05$) соответственно. Анализируя величину ЧСС на основании этих данных и выразив их графически (рисунок 4.3) можно сделать заключение, что использование клеточных технологий, примененных в эксперименте улучшает компенсаторные возможности организма животного адекватно реагировать на стрессовые нагрузки путем тахикардии, что приближает крыс 4 и 5 групп к интактным животным, в отличие от слабовыраженной реакции на нагрузку у крыс 3 группы.

Рисунок 4.3 – Прирост значений ЧСС после нагрузки изопропилнорадреналином

К моменту окончания наблюдения за животными (15 минута после введения изопропилнорадреналина) ЧСС снижалось во всех экспериментальных группах. Наиболее высоким этот показатель остался у крыс с моделью ИМ (3 группа) и составил 515 ± 15 уд/мин ($p < 0,05$). Затем следуют крысы 4 группы с терапией

ММСК – 503 ± 15 уд/мин ($p < 0,001$), 2 группы с ложной операцией торакотомии 492 ± 16 уд/мин ($p < 0,01$). По результатам исследования, окончательный уровень ЧСС животных 1 и 5 максимально приблизился к исходному уровню и был практически равен между собой, составляя 490 ± 13 уд/мин ($p < 0,001$) и 490 ± 10 уд/мин ($p < 0,001$) соответственно.

В целом, анализируя полученные данные (рисунок 4.4), необходимо отметить, что развитие реакции на введение изопропилнорадреналина у интактных животных характеризуется двумя фазами – быстрым, в течении одной – трех минут, увеличением ЧСС и её медленной стабилизацией с последующим снижением до окончания наблюдения. Как правило, у здоровых животных, значения ЧСС, наблюдаемые к окончанию эксперимента несколько выше базовых.

Рисунок 4.4 – Показатели ЧСС у экспериментальных животных при моделировании стрессовой нагрузки на 30 сутки эксперимента

В наших исследованиях, использование как ММСК так и кММСК способствовало восстановлению реакции сердца на стресс, проявлявшееся в нормализации как хронотропного ответа на введение изопропилнорадреналина, так и стабилизации этого показателя к концу эксперимента.

4.2. Результаты ультразвукового исследования сердца

4.2.1. Данные морфометрии

Исследование массы сердца крыс производили после выведения их из исследования на 30 сутки после начала эксперимента. При этом полученные результаты наглядно иллюстрируют отсутствие статистически достоверных отличий между 1 и 2 группой животных по всем показателям, что вполне объяснимо отсутствием каких-либо воздействий непосредственно на сердечную мышцу в обеих экспериментальных группах.

При изучении массы сердца (HW) мы видим, что нет различий между интактными животными ($1,064 \pm 0,025$ г.) и животными 4 группы с пересаженными ММСК ($1,054 \pm 0,02$ г.) при $t=1,34$, $p=0,18$ (таблица 4.2). В остальных группах (3 и 5) было отмечено существенное уменьшение массы сердца – $1,029 \pm 0,012$ г. и $1,045 \pm 0,02$ г. соответственно.

При сопоставлении показателей массы левого желудочка были получены следующие результаты: достоверные различия между 1 и 4 группами отсутствуют ($0,62 \pm 0,05$ г. против $0,6 \pm 0,05$ г. при $t=1,15$, $p=0,25$). В остальных группах масса левого желудочка была значительно меньше показателей нормы, которые соответствуют первой группе.

При анализе интегрального показателя LW/BW было отмечено, что между нормальными показателями 1 группы – $0,2 \pm 0,02$ г/г. и данными полученными от 4 группы животных $0,2 \pm 0,02$ г/г. нет различий при $t=0,93$, $p=0,36$. Однако существует различия 1 группы по сравнению с 5 группой $0,18 \pm 0,01$ при $t=4,5$, $p=0,001$ и 3 группой $0,16 \pm 0,01$ при $t=8,67$, $p=0,001$.

Таким образом на 30 сутки эксперимента массы сердец крыс 4 группы с трансплантированными ММСК не отличаются от нормы и не существует различия между нормой и животными 2 группы с ложной операцией торакотомии. В первом случае результат можно объяснить терапевтическим эффектом пересаженной клеточной культуры, во втором – отсутствием какого-либо повреждения сердца

при торакотомии. При этом наименьшей массой обладают сердца 3 и 5 групп животных.

Таблица 4.2 – Морфометрические показатели сердца животных, выведенных из эксперимента на 30 сутки

Показатель	Группа				
	1	2	3	4	5
BW - масса тела (г)	302,4±13,2	302,9±14,9	301,5±12,8	300±14,2	303,9±14,6
HW - масса сердца (г)	1,064±0,025	1,055±0,022	1,029±0,012*,**	1,054±0,02*,**	1,045±0,02**,***
LW – масса ЛЖ (г)	0,62±0,05	0,63±0,03	0,48±0,018*,**	0,6±0,05*	0,56±0,024**,***
HW/BW (г/г)	0,354±0,019	0,357±0,016	0,345±0,021*,**	0,355±0,02*	0,354±0,019***
LW/BW (г/г)	0,2±0,02	0,19±0,02	0,16±0,01*,**	0,2±0,02*	0,18±0,01***

*Примечание: * - разница между предыдущим и изучаемым показателем достоверна при $p<0,05$; ** - разница между изучаемым показателем и показателем 1 группы достоверна при $p<0,05$; *** - разница между изучаемым показателем и показателем 3 группы достоверна при $p<0,05$.*

Кроме этого при изучении интегрального показателя отношения массы сердца к массе тела животного мы не видим разницы между группами. Возможным объяснением может быть уменьшение массы левого желудочка при замене нормального миокарда рубцовой тканью, с последующим его растяжением, что приводит к снижению насосной функции сердца. Благодаря процессу ремоделирования это, в свою очередь, приводит к митральной регургитации крови и увеличению объема левого предсердия, что влечет за собой увеличение давления в малом круге кровообращения. Данный патофизиологический процесс сопровождается гипертрофией правых отделов сердца, за счет чего HW/BW остается неизменным.

4.2.2. Функциональные показатели сердечной деятельности

При выполнении ультразвукового исследования функции сердца животных мы ставили перед собой задачу изучения пяти основных показателей функции левого желудочка: LVIDd – end-diastolic left ventricular internal dimensions (конечный диастолический внутренний диаметр левого желудочка); LVIDs – end-systolic left ventricular internal dimensions (конечный систолический внутренний диаметр левого желудочка); FS – fractional shortening (ФУ, фракция укорочения); EF – ejection fraction (ФВ, фракция выброса); SV – stroke volume (УО, ударный объем). При анализе полученных данных, мы видим, что по аналогии с морфометрическими показателями, все данные 1 и 2 групп практически идентичны и не нуждаются в дополнительном обсуждении и анализе. При этом и фракция выброса в группе с трансплантацией МСК не отличается от здоровых животных (при $t=0,16$; $p>0,05$) и равняется $75,8 \pm 3,2\%$. Следует отметить, что в группе с ИМ без лечения ФУ снижалась до $26,8 \pm 0,8\%$ ($t=4,53$; $p<0,05$). Наиболее близкие по значению показатели к норме опять же отмечались в группе с трансплантацией ММСК $45,0 \pm 0,9\%$ ($t=0,94$; $p>0,05$), что не отличается от 5 группы - $43,7 \pm 0,11\%$ ($t=1,43$; $p>0,05$). Такая же тенденция наблюдается и при изучении LVIDd и обратно пропорциональная связь показателя LVIDs (таблица 4.3).

Таблица 4.3 – Ультразвуковые показатели функционирования сердца у крыс

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

*Примечания: * - достоверна разница между изучаемым показателем и 1 группой животных; ϵ - достоверна разница между изучаемым показателем и 3 группой животных.*

У крыс фракция выброса в норме составляет $76,9 \pm 2,5\%$, но уже через месяц после моделирования ИМ, она снижается до $55,3 \pm 3,4\%$ (3 группа) ($t=5,12$; $p<0,001$). Однако в 4 и 5 группе ФВ гораздо выше, чем в 3 и равняется $75,8 \pm 3,2$ ($t=4,4$; $p<0,001$), а также $71,9 \pm 2,7$ ($t=3,82$; $p<0,001$) соответственно. Следует отметить, что нет различий в показателе ФВ между 1 и 4, 5 группой – $75,8 \pm 3,2$ ($t=0,27$; $p>0,05$) и $71,9 \pm 2,7$ ($t=1,36$; $p>0,05$). Подобная картина наблюдается и при изучении ударного объема. В 3 группе к 30 суткам УО снижался с $0,25 \pm 0,04$ до $0,13 \pm 0,03$ мл при $t=2,4$; $p<0,05$, а в 4 и 5 группах не отличался от нормы и равнялся соответственно $0,24 \pm 0,02$ ($t=0,22$; $p>0,05$) и $0,23 \pm 0,03$ ($t=0,4$; $p>0,05$). По сравнению с 3 группой в 4 и 5 показатели были значительно выше при $t=3,05$; $p<0,01$ и $t=2,36$; $p<0,05$ соответственно. Таким образом, мы видим четкую аналогию в динамике ФВ, ФУ и УО, а также конечного диастолического внутреннего диаметра и конечного систолического внутреннего диаметра левого желудочка.

Из качественных характеристик следует отметить: наличие систолического утолщения пораженного сегмента миокарда при ИМ в систолу либо снижено, либо вообще отсутствует. В сроки от 1 месяца отмечается истончение пораженного сегмента миокарда. Истонченный сегмент обладает повышенной эхогенностью по сравнению с прилегающими сегментами вследствие большего количества соединительной ткани (рисунок 4.5).

Рисунок 4.5 – ЭХО-кардиография сердца у крысы в норме (А) и через 1 месяц после моделирования ИМ (В)

1 – полость левого желудочка в В-режиме;

2 – волны сокращения трикуспидального клапана сердца крысы в М-режиме

Визуализируется нарушение подвижности стенки: гипокинезия, акинезия или дискинезия, т.е. движение пораженного сегмента в систолу внутрь частично снижено, отсутствует или парадоксально направлено наружу. Сегменты стенки противоположной пораженной при остром инфаркте миокарда, как правило, компенсаторно гиперкинетичны. У ряда животных 3 группы визуализировалась аневризма левого желудочка, в виде выпячивания "молчащей" стенки.

На рисунке 4.6 представлено ЭХО-КГ крыс 4 группы, четко видны номинальные изменения в 4 группе, являющимися по сути вариантом нормы.

Подтверждает ИМ, существенное снижение кинетики миокарда в участке стенки ЛЖ, совпадающем с ЭКГ-топографией предполагаемого инфаркта. Роль эхокардиографии в диагностике ИМ, оценка динамики развития процесса и возникающих осложнений существенно повышается при использовании доплер ЭХО-КГ, ЭХО-кимографии.

Рисунок 4.6 – ЭХО-кардиография сердца у крысы через 1 месяц после трансплантации ММСК при ИМ

1 – полость левого желудочка в В-режиме;

2 – волны сокращения трикуспидального клапана сердца крысы в М-режиме

Таким образом ИМ сопровождается, в зависимости от площади поражения, снижением сократительной функции сердца в зоне некроза и повреждения. При этом появляется гипокинезия, акинезия и дискинезия участка миокарда. В менее пораженных областях наблюдается диссинхронизация – замедление процесса сокращения по сравнению с неповрежденным миокардом. В то же время функция последнего компенсаторно возрастает за счет механизма Франка-Старлинга и повышенного уровня катехоламинов в крови.

Во время проведения стресс нагрузки изопропилнорадреналином мы изучали показатели минутного объема (МО) сердца, т.е. объема крови, выбрасываемого сердцем в сосудистую сеть в течение одной минуты. В результате мы получили данные представленные на рисунке 4.7.

Рисунок 4.7 – Динамика минутного объема при стресс-имитируемой нагрузке изопропилнорадреналином в 1,3,4,5 группах
 покой – начальные показатели до введения препарата;
 макс. – максимальное значение при стресс-нагрузке;
 конечн. – показатель при окончании нагрузки

Мы видим, что при сравнении четырех групп животных: интактных, модель ИМ, животных которым на фоне ИМ выполнили трансплантацию ММСК и

животных которым на фоне ИМ трансплантировали кММСК, у крыс с ИМ МО существенно снизился по сравнению с нормой с $121,25 \pm 2,49$ мл/мин до $65,39 \pm 1,12$ мл/мин при $t=20,26$; $p<0,001$ и был гораздо меньше, чем в группе с трансплантацией ММСК ($117,36 \pm 2,15$ мл/мин при $t=21,43$; $p<0,001$) и кММСК ($108,22 \pm 2,17$ мл/мин при $t=15,25$; $p<0,01$). Интересен тот факт, что МО при максимальной нагрузке изопропилнорадреналином, достоверно увеличивался у здоровых животных с $121,25 \pm 2,49$ мл/мин до $129,25 \pm 3,2$ мл/мин при $t=1,97$; $p<0,05$, в группе ИМ+ММСК с $117,36 \pm 2,15$ мл/мин до $126,72 \pm 3,06$ мл/мин при $t=2,5$; $p<0,05$., а в группе ИМ+кММСК с $108,22 \pm 2,17$ мл/мин до $116,71 \pm 3,01$ мл/мин. В конце опыта МО равнялся начальному показателю, т.е. $123,25 \pm 2,04$ мл/мин (при $t=0,62$; $p>0,05$) в 1 группе, $120,72 \pm 2,33$ мл/мин (при $t=1,06$; $p>0,05$) в 4 группе и $116,33 \pm 2,17$ мл/мин в 5 группе.

В группе крыс с ИМ без лечения изменение МО на протяжении всего опыта не наблюдалось, что можно объяснить тем, что при учащении сердечных сокращений, уменьшался ударный объем сердца.

Итак, по данным функциональным исследованиям сердца с помощью УЗИ, мы видим, что трансплантация ММСК и кММСК приводит к стабилизации изучаемых показателей функционирования сердца, которые не отличаются от нормы. Тем не менее по ряду параметров, трансплантация ММСК имеет преимущества по сравнению с группой трансплантации кММСК, в частности в 4 группе выше фракция укорочения левого желудочка по сравнению с 5 группой.

4.3. Результат морфологических исследований

4.3.1. Морфологические изменения в участке инфаркта миокарда у животных 1 группы (в разные сроки эксперимента)

Комплексное понимание патоморфофизиологических изменений в участке развивающегося инфаркта миокарда жизненно необходимо для дальнейшего

развития теоретических и практических аспектов, связанных с различными способами лечения данного заболевания. Экспериментальное моделирование на крысах в сочетании с современными и классическими методами исследований оказывает незаменимую помощь в этом вопросе.

В проводимом нами исследовании, мы изучали последовательные морфологические изменения в участках некроза сердечной мышцы, а также в близлежащих окружающих тканях, динамика которых напоминает картину острого инфаркта миокарда развивающегося в тканях человека. По нашим наблюдениям, уже к концу первых суток под влиянием ишемии, вызванной лигированием передней левой межжелудочковой артерии, в тканях миокарда наблюдается характерные изменения, сопровождаемые воспалительной реакцией. Так, прослеживается классическая стадия альтерации, сопровождающаяся набуханием и отеком КМЦ с последующим развитием дистрофии с дегенеративных процессов. КМЦ начинают терять свою поперечную очерченность, в интерстициальной ткани и между мышечными волокнами появляются клеточные инфильтраты, содержащие нейтрофилы, моноциты и лимфоциты. Четких границ некроза в данном периоде выявить невозможно, но в кровеносных сосудах микроциркуляторного русла уже хорошо прослеживается стаз клеток крови, кровоизлияния и лейкоцитарная инфильтрация.

К 3-4 суткам тканевые макрофаги, лейкоциты и лимфоциты массивно инфильтрируют зону повреждения. Классическая воспалительная реакция проявляется дальнейшим образованием грануляционной ткани в виде барьера вокруг зоны повреждения, где отмечались явления миоцитолита. Свежий коагуляционный некроз миокарда с выраженным перифокальным воспалением на 3 сутки эксперимента представлен на рисунке 4.8.

Рисунок 4.8 – Коагуляционный некроз у животных 3 группы. 3 сутки после моделирования ИМ. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 10

Одновременно с этим, наблюдалась пролиферация клеток стромы и активация эндотелиоцитов, что может косвенно свидетельствовать о повышенной активности стромального компонента. Прослеживается формирование рубца в виде синтеза коллагена без образования коллагеновых волокон. Короткие толстые коллагеновые структуры в зоне постинфарктного рубца ориентированы правильно. Дальнейшее развитие инфаркта миокарда происходит благодаря прогрессированию периферического миоцитолиза, что значительно расширяет зону поражения. Отек кардиомиоцитов и формирование сладжей эритроцитов в капиллярах характерен для окружающей внеинфарктной зоны.

Уже к 7 суткам после оперативного моделирования ИМ, определялся организуемый инфаркт. В ишемизированной зоне наблюдались отдельные островки кардиомиоцитов подвергшиеся миоцитолизу. Участок повреждения значительно отличался от картины, наблюдаемой на 3-4 сутки, так как процесс инфильтрации уменьшался, что приводило к значительному снижению количества макрофагов, лимфоцитов и лейкоцитов.

Фагоцитоз и выделение лизосомальных ферментов, очевидно, приводят к резорбции мышечных клеток. В зоне повреждения происходят начальные этапы формирования соединительной ткани, в толще которой выявляются множественные молодые тонкостенные сосуды и фибробласты. В соединительной ткани возникает пролиферативная реакция, проявляющая себя преобладанием моноклеарных клеток (моноциты, макрофаги и лимфоциты) над гранулоцитами. В центральных участках некротической области происходит построение коллагеновых волокон. Вне зоны ишемизированного участка наблюдались функциональная перегрузка и интрацеллюлярный отек кардиомиоцитов.

К 21 суткам мы видим практически полное прекращение процесса инфильтрации, когда небольшое количество тканевых макрофагов, лейкоцитов и лимфоцитов удается обнаружить только в периваскулярном пространстве. При этом активно формируется и структуризируется рубцовая соединительная ткань, коллагеновые волокна и небольшое количество отдельных эластических волокон. На этом этапе наблюдается большое количество новых сосудов синусоидного типа с тонкой, легко растягивающейся стенкой. Интерцеллюлярный отек в кардиомиоцитах пограничной зоны провоцировался, по нашему мнению, ситуацией "no reflow", когда в зоне, находящейся вне перевязки, нарушался кровоток, поскольку сосуды сдавливались кардиомиоцитами. Именно поэтому высок риск развития повторных инфарктов в неповрежденных зонах.

К 30 суткам в 3 группе животных с моделью инфаркта миокарда, сформировался большой рубец в зоне некроза, распространяющийся на все пласты миокарда (рисунок 4.9, 4.10).

Рисунок 4.9 – Крысы 3 группы 30-е сутки эксперимента. Рубцующийся участок сердечной мышцы на верхушке левого желудочка, формирование аневризмы.

Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 5

По своим свойствам он напоминает трансмуральный ИМ у человека. В пограничной зоне наблюдаются признаки прогрессирующего периферического повреждения миокарда: инфильтрация, активация стромального компонента, формирование грануляционной ткани. В интактной зоне видна функциональная перегрузка и отек кардиомиоцитов. В некоторых образцах наблюдались периваскулярно расположенные островки мышечных волокон. Соединительная ткань содержит сосуды синусоидного типа с такой же тонкой стенкой как на более ранних сроках патологического процесса.

Рисунок 4.10 – Крысы 3 группы 30-е сутки эксперимента. Определяется большой рубец на месте трансмурального инфаркта с формированием аневризмы.

Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 30$

У некоторых животных мы наблюдали развитие перикардита. Его появление можно объяснить разрезом перикарда и развитием асептического воспаления как реакции на стерильный шовный материал использованный нами для перевязки коронарного сосуда.

При попадании эпикардального слоя миоцитов в зону прошивания наблюдался коагуляционный некроз в зоне лигатуры (рисунок 4.11).

Рисунок 4.11 – Крысы 3 группы 30-е сутки эксперимента. Очаг коагуляционного некроза в зоне лигатуры. Отсутствие поперечной исчерченности мышечных волокон, гемолиз эритроцитов в капиллярах. Окраска гематоксилин и эозином, увеличение x 40

При иммуногистохимическом окрашивании на актин и тропонин I наиболее ярко визуализировалась тотальная гибель мышечных волокон в зоне рубцевания. На 30 день стенка участки, которая рубцевалась, была полностью представлена соединительной тканью. При этом во все сроки находили пролиферирующие клетки соединительной ткани и сосудистой стенки, которая свидетельствует о том, что на данный срок еще длятся процессы неполной регенерации и ремоделирования (рисунок 4.12, 4.13, 4.14). Также обращало на себя внимание множество сосудов синусоидного типа, которые в ранние сроки после инфаркта, имели стенку и широкий просвет.

Рисунок 4.12 – Миокард, рубцующийся на 30 сутки эксперимента у крыс 3 группы. Большой рубец с сохранением одиночных пучков мышечных волокон в субэпикардальных отделах. ИГХ-Окраска с антителами к тропонину I, увеличение x 30

Рисунок 4.13 – Миокард, рубцующийся на 30 сутки эксперимента у крыс 3 группы. Большой рубец с большим количеством клеток соединительной ткани, которая пролиферирует. При присутствии изучаемого фактора, ядра клеток окрашиваются в темно-коричневый цвет. ИГХ-Окраска с антителами к PCNA, увеличение x 150

Рисунок 4.14 – Миокард, рубцующийся на 30 сутки эксперимента у крыс 3 группы. Большой рубец с большим количеством клеток соединительной ткани, которая пролиферирует. При присутствии изучаемого фактора, ядра клеток окрашиваются в темно-коричневый цвет. ИГХ-Окраска с антителами к PCNA, увеличение x 75

4.3.2. Морфологические изменения в участке инфаркта миокарда у животных после трансплантации ММСК и кММСК

По нашим наблюдениям, после проведения качественного морфологического исследования тканей сердца животных, которым на экспериментальном этапе трансплантировались ММСК и кММСК, были обнаружены существенные отличия морфологической картины в поврежденном участке. Прежде всего, в участке инфаркта наблюдали чередование кардиомиоцитов, которые сохранились, и полей рубцовой ткани. Особенно показательно то, что ни в одном случае после трансплантации ММСК или кММСК мы не наблюдали формирования аневризм (рисунок 4.15). При иммуногистохимической окраске на актин и тропонин I мы так же четко видели чередование кардиомиоцитов, которые сохранились, и полей рубцовой ткани (Рисунки 4.16 и 4.17).

Рисунок 4.15 – Миокард, рубцующийся на 30 сутки эксперимента у крыс 5 группы после моделирования ИМ. Рубец на месте интрамурального инфаркта. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 10

Рисунок 4.16 – Миокард, рубцующийся на 30 сутки эксперимента у крыс 4 группы. Рубец на месте интрамурального инфаркта. ИГХ-окраска с первичными антителами к тропонину I, увеличение x 30

1 - сохраненные пучки кардиомиоцитов;

2 - рубцовая ткань

Рисунок 4.17 – Миокард, рубцующийся на 30 сутки эксперимента у крыс 4 группы. ИГХ-окраска с первичными антителами к актину, увеличение $\times 150$

Уже с 21 суток в 4 и 5 группах визуализировались лишь одиночные пролиферирующие клетки в рубце, что свидетельствует о завершенности процесса рубцевания на данный срок. Особенно показательным, на наш взгляд, является различное состояния сосудов у животных, которые получали и не получали лечение (рисунок 4.18). Так, у животных подвергшихся клеточной кардиомиопластике, сосудов было больше на единицу площади, их просвет был меньше, они имели хорошо сформированную стенку.

При использовании гибридизации *in situ* мы выявили в рубце, который формируется, у крыс-самок клетки с наличием Y- хромосомы в ядре, то есть клетки-преемники трансплантируемых ММСК и кММСК. При окраске тканей у крыс-самок, которым трансплантацию не выполняли, мы не наблюдали никакой окраски при использовании проб к Y- хромосомы (рисунок 4.19, 4.20), что говорит об отсутствии этих клеток в организме реципиента до введения клеток самца. Контрольная окраска 12 хромосомы была положительная как у самок, так и у самцов (рисунок 4.21, 4.22, 4.23). Клетки с фенотипом Y-хромосомы мы выявляли

среди эндотелия сосудов, в стенке сосудов, которые формируются, и среди фибробластов рубца (рисунок 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.28, 4.29). В соседних с рубцом пучках миокарда мы не выявляли положительных клеток.

3 группа

4 группа

Рисунок 4.18 – Морфологическая структура сосудов у животных 3 и 4 групп на 30 сутки эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 300

Рисунок 4.19 – Крысы 3 группы. Клетки в рубце не содержат Y-хромосому. Гибридизация *in situ* с маркером к Y- хромосоме на 30 сутки эксперимента, увеличение x 150

Рисунок 4.20 – Крыса 3 группы. Клетки в рубце и стенках сосудов не содержат Y-Хромосому. Гибридизация *in situ* с маркером к Y- хромосомы на 30 сутки эксперимента, увеличение x 150

Рисунок 4.21 – Позитивное окрашивание клеток с Y-хромосомой при ИГХ исследовании после трансплантации кММСК на 30 сутки эксперимента. Гибридизация *in situ* с маркером к 12 хромосоме, увеличение x 150

Рисунок 4.22 – Позитивное окрашивание клеток миокарда с Y-хромосомой при ИГХ исследовании после трансплантации кММСК на 30 сутки эксперимента.
Гибридизация *in situ* с маркером к 12 хромосоме, увеличение x 150

Рисунок 4.23 – Позитивное окрашивание клеток миокарда с Y-хромосомой при ИГХ исследовании после трансплантации кММСК на 30 сутки эксперимента.
Гибридизация *in situ* с маркером к 12 хромосоме, увеличение x 270

Рисунок 4.24 – Позитивное окрашивание клеток стенок сосудов и соединительной ткани с Y-хромосомой при ИГХ исследовании после трансплантации ММСК на 21 сутки эксперимента. Гибридизация *in situ* с маркером к Y- хромосоме, увеличение x 180

Рисунок 4.25 – Позитивное окрашивание клеток стенок сосудов, соединительной ткани и ближайшего окружения с Y-хромосомой при ИГХ исследовании после трансплантации ММСК 21 сутки эксперимента. Гибридизация *in situ* с маркером к Y- хромосоме, увеличение x 300

Рисунок 4.26 – Позитивное окрашивание клеток стенок сосудов и соединительной ткани между мышцами с Y-хромосомой при ИГХ исследовании после трансплантации ММСК на 30 сутки. Гибридизация *in situ* с маркером к Y-хромосоме, увеличение x 150

Рисунок 4.27 – Позитивное окрашивание клеток, содержащих Y-хромосому, в соединительной ткани у крыс-самок на 30 сутки после трансплантации кММСК. Гибридизация *in situ* с маркером к Y-хромосоме, увеличение x 150

Рисунок 4.28 – Позитивное окрашивание клеток, содержащих Y-хромосому, в соединительной ткани и стенке сосудов у крыс-самок на 30 сутки после трансплантации ММСК. Гибридизация *in situ* с маркером к Y- хромосоме, увеличение x 150

Рисунок 4.29 – Позитивное окрашивание клеток, содержащих Y-хромосому, в соединительной ткани у крыс-самок на 30 сутки после трансплантации кММСК. Гибридизация *in situ* с маркером к Y- хромосоме, увеличение x 300

Подводя итог, можно сделать вывод, что трансплантация как ММСК так и кММСК приводит к значительному улучшению процессов васкуляризации в зоне ИМ. За счет этого, возможно, уменьшается риск ишемии в пограничных с инфарктом зонах, что содействует уменьшению площади рубца и предупреждает формирование аневризмы сердца. Трансплантируемые клетки активно способствуют, а также непосредственно принимают участие в формировании сосудов в зоне рубцевания. Обычные морфометрические данные не дали нам представления о преимуществе использования ММСК или кММСК, поэтому для объективизации данного вопроса были проведены морфометрические гистологические исследования, результаты которого приведены ниже.

4.3.3. Гистологическая морфометрия

Общеизвестно, что при рубцевании инфаркта миокарда происходит уменьшения его размера. Морфометрическое исследование выполнялось с помощью программы Analysis Pro 3.2 (Германия) и исследовательского микроскопа Olympus AX70 (Япония) согласно рекомендациям производителя. Таким образом, для количественного анализа состояния рубца мы определяли степень контракции очага ИМ. Для этого измерялись внешний и внутренний диаметры нормальной ткани миокарда, пограничной с участком инфаркта. Таким образом, теоретически возможную площадь миокарда в тотальном срезе вычисляли за формулой $S = \pi(R_{\text{внешний}}^2 - r_{\text{внутренний}}^2)$. Поскольку участок инфаркта захватывал определенный сектор этого кольца, то теоретическую первоначальную площадь участка инфаркта определяли путем деления площади всего кольца на удельный объем инфарктированного участка по отношению ко всей площади кольца. После этого удельный объем рубца определяли путем деления его площади в срезе на теоретическую первоначальную площадь. Также морфометрически вычисляли удельный объем соединительной ткани и сосудов в рубце.

Вычисляли площадь участка инфаркта (путем деления площади всего кольца на удельный объем инфартированного участка по отношению ко всей площади кольца), удельный объем рубца путем деления его площади в срезе на теоретическую первоначальную площадь, удельный объем соединительной ткани и сосудов в рубце (рисунок 4.30, 4.31, 4.32).

Рисунок 4.30 – 30 сутки после ИМ и введения кММСК. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 10$

- 1 – истончение миокарда в зоне инфаркта;
- 2 – интактный участок стенки левого желудочка

Рисунок 4.31 – Морфометрия сосудов. Инфаркт миокарда, с формированием рубца. Отмечены сосуды и их площадь, увеличение x 10

Рисунок 4.32 – Морфометрия соединительной ткани. Инфаркт миокарда. Отмечены участки сохраненного миокарда и их площадь, увеличение x 10

Как видно из таблицы 4.4, в 4 экспериментальной группе с трансплантацией ММСК, по всем изученными критериям достигались существенно лучшие результаты в сравнении с нелечеными животными (группа 3), причем уровень достоверности различий был как правило меньше 0,01 ($p < 0,05$).

Таблица 4.4 – Морфометрический анализ результатов трансплантации ММСК

Средние по группам	ИМ	Трансплантация ММСК
Удельный объем участка инфаркта от исходной ткани, %	65,83	24,02***
SD	8,21	1,04
Удельный объем соединительной ткани, включая сосуды, %	33,78	17,73**
SD	1,72	5,69
Удельный объем сосудов, %	6,32	9,42*
SD	0,16	3,33
Среднее кол-во сосудов на 100000 мкм ²	10,21	68,20***
SD	1,26	4,64
% сохранившихся мышечных волокон (от исходного)	15,90	45,04**
SD	0,28	9,81

Примечание. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$.

При исследовании среднего количества сосудов на 100 тыс. мкм² были получены следующие результаты - $10,21 \pm 1,26$ без лечения в сравнении с $68,2 \pm 4,64$ у крыс с моделью острого ИМ после введения ММСК. У животных без лечения сосуды были широкими, с большим просветом, тогда как у леченных животных - небольшого диаметра. Поэтому мы также вычислили удельное количество сосудов на 100 000 мкм² ткани рубца. Таким образом количество сосудов на 100 тыс. мкм² в группе с трансплантацией ММСК стало в 6 раз больше. Следует учитывать, что удельный объем участка ИМ в 3 группе составил $65,89 \pm 8,21\%$, а в 4 группе – $24,02 \pm 1,04\%$, т.е. площадь инфаркта миокарда уменьшилась почти в 3 раза. Благоприятная динамика со стороны сосудов сопровождалась существенным улучшением показателей: уменьшением объема соединительной ткани в зоне ИМ с $33,78\%$ до $17,73\%$ (в 1,9 раза), увеличение процента сохраненных мышечных волокон (КМЦ) с 15,9 до $45,04\%$ (в 2,8 раз).

Итак, трансплантация ММСК при экспериментальном ИМ у крыс приводит к уменьшению зоны ИМ в 3 раза, при этом соединительнотканый компонент зоны инфаркта уменьшился в 1,9 раза, за счет увеличения количества сосудов в 6 раз и сохранения мышечных волокон в 2,6 раза больше, чем в 1 группе.

Как видно из таблицы 4.5, в 5 группе, также за всеми изученными показателями было достигнуто существенным образом лучшие результаты в сравнении с 3 группой животными с высоким уровнем достоверности различий. Также существенные результаты получены при исследовании удельного количества сосудов на 100 тыс. мкм² ($10,21 \pm 1,26$ без лечения в сравнении с $49,4 \pm 7,75$ у крыс с моделью ИМ после введения кММСК). Благоприятная динамика со стороны сосудов сопровождалась существенным улучшением других показателей: уменьшением объема соединительной ткани в зоне ИМ, увеличением процента сохраненных мышечных волокон (КМЦ).

При анализе морфометрических данных видно, что удельный объем инфицированного участка у крыс без лечения составил $24,02\%$ от первоначального объема, то есть возникло уменьшение площади миокарда в 4 раза.

Таблица 4.5 – Морфометрический анализ результатов трансплантации кММСК

Средние по группам	ИМ	Трансплантация кММСК
Удельный объем участка инфаркта от исходной ткани, %	65,83	26,84**
SD	8,21	8,07
Удельный объем соединительной ткани, включая сосуды, %	33,78	15,39**
SD	1,72	7,48
Удельный объем сосудов, %	6,32	8,71*
SD	0,16	3,67
Среднее кол-во сосудов на 100000 мкм ²	10,21	49,35***
SD	1,26	7,75
% сохранившихся мышечных волокон (от исходного)	15,90	48,17**
SD	0,28	8,90

Примечание. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$.

В группах животных, которым выполняли трансплантацию кММСК, наблюдалось более чем двукратное уменьшение площади рубца. При этом в животных 1 группы 34% площади образования рубца, было занято соединительной тканью, а в 4 группе животных – 15,4%. Удельный объем сосудов в участке рубцевания в 4 группе животных был ниже, чем у животных без лечения, однако сами сосуды были разного строения. Так, у животных без лечения сосуды были

широкими с большим просветом, тогда как у животных 4 группы эти сосуды были небольшого диаметра. Поэтому мы также вычислили удельное количество сосудов на 100 000 мкм² ткани рубца. По полученным данным видно, что удельное количество сосудов на единицу объема приблизительно в 6 раз больше после трансплантации кММСК.

Следует отметить, что трансплантация кММСК продемонстрировала такой же морфологический эффект (кроме среднего количества сосудов на 10 000 мкм²), чем необработанных ММСК.

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современная медицина обладает широким арсеналом медикаментозной и хирургической помощи больным с ишемической болезнью сердца. Тем не менее, результаты лечения пациентов с данной патологией оставляют желать лучшего, в связи с чем внимание ученых направлено на поиск альтернативных методов лечения, направленных на неоангиогенез с целью коррекции гипоперфузионного синдрома и профилактики склероза [Михайличенко, 2009]. Исследование последних десятилетий продемонстрировали роль мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток при той или иной патологии и возможности их участия в компенсации морфофункциональных потребностей [Шумаков, 2009]. Существует 3 механизма клеточной смерти: апоптоз, некроз или их комбинация. Смерть клетки в результате апоптоза или некроза имеет разные последствия для ремоделирования сердца. Некроз КМЦ ведет к воспалительной реакции, пролиферации сосудов, инфильтрации макрофагами, активации фибробластов и соответственно образованию рубца. После апоптоза репаративный процесс идет без накопления коллагена, а апоптозные тела удаляются соседними клетками без видимых изменений морфологии ткани. Тем не менее, апоптоз также может индуцировать острое ремоделирование стенки желудочка [Liu, 2012].

Учитывая вышеперечисленные патогенетические аспекты инфаркта миокарда, первоначально перед нами стал вопрос об адекватности выбора модели у экспериментального животного. Модель повреждения миокарда с помощью низких или высоких температур с одной стороны проста в выполнении, позволяет четко локализовать стандартную площадь инфаркта в определенном участке сердца, но к сожалению, при этом не будет зон "спящего" и гибернирующего миокарда, что наблюдается при ИМ у человека. Поэтому нами была выбрана модель ИМ, которая производилась путем лигирования левой межжелудочковой артерии, таким образом имитировалась окклюзия сосуда, аналогичная острому тромбозу у человека. Соответственно происходили патофизиологические и патоморфологические процессы, соответствующие ИМ у человека.

Для клеточной кардиомиопластики нами были выбраны два вида клеточного трансплантата, полученных из костного мозга бедренных костей крысы – ММСК и кММСК. Использование донорских клеток самца позволило нам по Y-хромосоме в организме самки определить их хоуминг и окончательную дифференцировку при модели ИМ у крыс.

При изучении нарушения эндотелиальной функции у крыс с моделью ИМ (рисунок 5.1), мы определили дисбаланс между вазодилататорами и вазоконстрикторами, которые значительно варьировали при разных стадиях ЭКГ течения ИМ. Так же нами изучался FGF, который с одной стороны демонстрирует активность ангиогенеза, а с другой образование соединительной ткани, т.е. активно участвует в процессе ремоделирования сердца.

У крыс сроки формирования стадии ИМ по данным ЭКГ, имеют свои специфические временные параметры, так стадия повреждения соответствует первым часам развития ИМ, острая – 1 сутки, подострая – 7 суток и стадия рубцевания – 1 месяц. Для отражения динамики и улучшения визуализации при построении графиков для показателей NO использовали коэффициент X100, а для ЭТ-1 – X10.

Рисунок 5.1 – Динамика маркеров эндотелиальной дисфункции в 3 группе

Итак, исходя из рисунка 5.1, мы видим, что все четыре изучаемых показателя, в стадию повреждения миокарда, реагируют повышением своего содержания в крови крыс, причем наиболее выражено по данным FGF и ЭТ-1, менее выражено для показателей VEGF и NO. В острую стадию ИМ у крыс происходит максимальное повышение всех изучаемых показателей эндотелиальной дисфункции, наиболее выражена для показателей VEGF и FGF.

Таблица 5.1 – Отражение динамики процесса эндотелиальной дисфункции у крыс при ИМ

Показатель \ Стадия ИМ	NO	VEGF	FGF	ЭТ-1
Повреждения	↑	↑	↑	↑
Острая	↑	↑↑	↑↑	↑
Подострая	↓	↓↓	↓↓	↓
Рубцевания	↓	↓	↓	↓
По отношению к норме	↑	↑	↑	=

В подострую стадию FGF значительно снижается, приближаясь к норме, а показатели VEGF, остаются на высоком уровне. Показатели NO и ЭТ-1 постепенно снижаются. К стадии рубцевания все изучаемые показатели постепенно снижаются, приближаясь к норме (таблица 5.1).

В 4 группе (рисунок 5.2), также после моделирования ИМ и введения ММСК, отмечается повышение всех изучаемых показателей, в дальнейшем в острую фазу следует отметить значительное повышение FGF, как и в 3 группе, но сопровождается более высокими показателями VEGF. При этом отмечается по сравнению с 3 группой более высокое содержание NO и более низкий уровень ЭТ-1, причем данная тенденция отмечается до конца опыта.

Рисунок 5.2 – Динамика маркеров эндотелиальной дисфункции в 4 группе

Итак, мы видим, что при трансплантации ММСК, происходит стабилизация вазодилатации, в виде прекращения прогрессивного подъёма концентрации ЭТ-1, который является мощным вазоконстриктором и более быстрая его нормализация по сравнению с 3 группой. При этом позитивное влияние трансплантации ММСК на ангиогенез отражается в значительном повышении концентрации VEGF, FGF и NO, что, несомненно, положительно влияет на постинфарктное ремоделирование миокарда. Таким образом, динамика маркеров эндотелиальной функции отображена в таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Отражение динамики процесса эндотелиальной дисфункции у крыс в 4 группе

Показатель / Стадия ИМ	NO	VEGF	FGF	ЭТ-1
Повреждения	↑	↑	↑	↑
Острая	↑	↑↑↑	↑↑↑	↓
Подострая	0	↓	↓↓	↓
Рубцевания	↓	↓	↓	↓
По отношению к норме	↑↑	↑↑	↑	=

В 5 группе (рисунок 5.3), отмечается аналогичная динамика изучаемых показателей, при моделировании ИМ и введения кММСК, в острую фазу отмечается значительное повышение FGF и менее выраженное VEGF, уровень ЭТ-1 остается на том же высоком уровне, оксид азота незначительно повышается. Далее в динамике в подострой стадии, отмечается резкое снижение FGF и VEGF, данная тенденция наблюдается и в стадии рубцевания.

Рисунок 5.3 – Динамика маркеров эндотелиальной дисфункции в 5 группе

Из таблицы 5.3, мы видим, что трансплантация кММСК приводит в стадию повреждения к таким же изменениям, как и в группе 4, но в острую фазу, происходит стабилизация ЭТ-1, на фоне значительного роста VEGF и FGF. Далее в отличие от 4 группы, происходит значительное снижение последних показателей, в остальном наблюдается аналогичная динамика.

Таким образом, мы видим, что клеточная кардиомиопластика при модели ИМ у крыс, с использованием ММСК и кММСК, приводит к стабилизации эндотелиальной дисфункции.

Таблица 5.3 – Отражение динамики процесса эндотелиальной дисфункции у крыс в 5 группе

Показатель \ Стадия ИМ	NO	VEGF	FGF	ЭТ-1
Повреждения	↑	↑	↑	↑
Острая	↑	↑↑↑	↑↑↑	0
Подострая	0	↓↓	↓↓↓	↓
Рубцевания	↓	↓↓	↓↓↓	↓
По отношению к норме	↑↑	↑	↑	=

Использование ММСК, имеет ряд преимуществ по сравнению с кММСК, заключающихся в более высоких и стабильных показателях VEGF и FGF, а также более быстром снижении вазоконстриктора ЭТ-1, еще в острую фазу. Вышеперечисленные факты, подтверждают положительное влияние ММСК и кММСК на ангиогенез и ремоделирование ишемизированного миокарда.

Исходя, из рисунка 5.4, мы видим, что моделирование ИМ у крыс приводило к значительному снижению сократительной способности миокарда, проявляющееся в снижении функции левого желудочка в результате развития рубца в миокарде. Трансплантация ММСК и кММСК, значительно адаптирует сократительную функцию сердца, за счет ангиогенеза, сохранения гибернирующего миокарда и тем самым уменьшая площадь постинфарктного рубца. Следует отметить, что в представленных анализируемых показателях, имеется значительное преимущество ММСК перед кММСК, за счет более выраженного ангиогенеза, сохранения большего количества мышечных волокон, уменьшения площади рубца, что позволяет достичь более высокую фракцию укорочения и выброса левого желудочка, а также добиться уменьшения конечного диастолического объема левого желудочка сердца, что демонстрирует компенсацию сердечной недостаточности при ИМ.

Рисунок 5.4 – Динамика морфофункциональных характеристик сердца крысы в разных группах в стадию рубцевания

УОИ – удельный объем участка инфаркта от исходной ткани;

УОМ – процент сохранившихся мышечных волокон; СКС – среднее количество сосудов

Патогенетическая модель эндотелиальной дисфункции при модели ИМ, а также ее коррекция внутривенной трансплантацией ММСК у крыс представлена на рисунке 5.5.

Итак, в результате проделанной работы, мы установили, что клеточная кардиомиопластика, нормализует дисфункцию эндотелия при модели острого инфаркта миокарда у крыс. Причем при сравнительном анализе использования ММСК и кММСК 5-азациитидином, нами определено ряд преимуществ ММСК в виде большей площади сохранения нормального миокарда, интенсивности ангиогенеза, уменьшения площади рубца, повышения фракции выброса и укорочения левого желудочка сердца, стабилизации конечного систолического и сердечной недостаточности, а также повышения устойчивости к стресс-имитируемой нагрузке изопропилнорадреналином.

Рисунок 5.5 - Патогенетическая модель эндотелиальной дисфункции при модели ИМ, а также ее коррекция внутривенной трансплантацией ММСК

Интенсивность ангиогенеза оценивалась по концентрации факторов роста сосудов и вазоконстрикторов, а также удельному объему сосудов и среднего количества сосудов на 100 000 мкм².

С помощью реакции гибридизации с Y-хромосомой, был продемонстрирован хоуминг-эффект ММСК и кММСК, который заключался в том, что трансплантируемые клетки перемещались в зону ишемии миокарда и участвовали в конечной дифференцировке в клетки эндотелия и соединительной ткани. Необходимо подчеркнуть, что мы не наблюдали окончательную дифференцировку трансплантируемых клеток в миокард у крыс, что имеет дискуссионное место в современной литературе. Следует отметить, что помимо вышеперечисленного, комитация клеток занимает более длительный срок инкубирования и соответственно существенные затраты. Учитывая все вышеизложенное, мы можем по изучаемым факторам отметить преимущество применения ММСК при остром ИМ по сравнению с кММСК. В работе доказано, что помимо непосредственного участия трансплантируемых клеток в виде конечной дифференцировки в различные клетки, ММСК за счет паракринного влияния стимулирует интенсивность ангиогенеза, что существенно улучшает ремоделирование миокарда при ИМ.

ВЫВОДЫ

1. Развитие острого инфаркта миокарда у крыс сопровождается депрессией сегмента ST на ЭКГ, снижением сократительной функции левого желудочка, повышением концентрации эндотелина-1 с $5,2 \pm 0,4$ до $8,1 \pm 0,3$ моль/мл к концу 1 суток при $p < 0,05$, а также содержания в плазме крови VEGF и оксида азота.

2. Трансплантация мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток при инфаркте миокарда у крыс приводит к увеличению среднего количества сосудов на $100\ 000\ \text{мкм}^2$ с 10,21 до 68,2 и сопровождается повышением концентрации VEGF к концу первых 24 часов опыта с $66,98 \pm 12,47$ до $220,45 \pm 22,13$ пг/мл.

3. Коммитированные мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки в кардиомиоцитарном направлении, также, как и мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки при трансплантации улучшают васкуляризацию зоны ишемии, что приводит к значительному уменьшению зоны инфаркта миокарда и морфофункциональному восстановлению гибернирующего миокарда, однако учитывая себестоимость и трудоемкость культивирования кММСК, предпочтение отдается ММСК.

4. Трансплантация мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток приводит к уменьшению зоны рубца, повышению васкуляризации зоны ишемии, что сопровождается сохранением фракции выброса и фракции укорочения левого желудочка, повышением адаптационных свойств сердца к стресс-нагрузке.

5. Основной эффект трансплантации ММСК заключается в неоваскулогенезе и паракринном влиянии на поврежденный миокард, что приводит к значительному уменьшению зоны ИМ и восстановлению элементов гибернирующего миокарда. С помощью реакции гибридизации с Y-хромосомой был доказан "хоуминг"-эффект ММСК в зону ИМ и их дифференцировка в клетки эндотелия и фибробластов. Эффективность ангиогенеза подтверждена возрастанием концентрации оксида азота и VEGF, FGF, а также снижением содержания эндотелина 1.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью стимуляции ангиогенеза, уменьшения зоны рубца и повышения функциональных способностей миокарда при ишемическом его повреждении рекомендовано использовать трансплантацию мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток.

2. Для сохранения фракции выброса и укорочения левого желудочка, стабилизации показателей эндотелина-1, оксида азота и VEGF, а также повышения адаптационных свойств сердца к стресс-нагрузке при остром инфаркте миокарда рекомендовано применять в комплексе лечения клеточную кардиомиопластику ММСК.

3. На основании проведенных экспериментальных исследований обоснованы определенные патофизиологические механизмы ремоделирования сердца при инфаркте миокарда в посттрансплантационном периоде, «хоуминг»-эффект мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток при внутривенном способе введения клеточного трансплантата.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

BW	— масса тела
FGF	— фактор роста фибробластов
G-CSF	— гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
HW	— масса сердца
LVIDd	— конечный диастолический внутренний диаметр левого желудочка
LVIDs	— конечный систолический внутренний диаметр левого желудочка
LW	— масса левого желудочка
NO	— оксид азота
PDGF	— фактор роста тромбоцитов
sFRP	— фрейзлед-узнающий белок 1
VEGF	— фактор роста эндотелия сосудов
АКШ	— аорто-коронарное шунтирование
ГМК	— гладкомышечные клетки
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ИБС	— ишемическая болезнь сердца
ИМ	— инфаркт миокарда
кММСК	— коммитированные мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки
КМЦ	— кардиомиоциты
ЛЖ	— левый желудочек
ММСК	— мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки
МО	— минутный объем

СК	– стволовые клетки
СКС	– стволовые клетки сердца
УЗИ	– ультразвуковое исследование
УО	– ударный объем
ФВ	– фракция выброса
ФУ	– фракция укорочения
ХСН	– хроническая сердечная недостаточность
цГМФ	– циклический гуанозинмонофосфат
ЧСС	– частота сердечных сокращений
ЧТКА	–чрескожная транслюминальная баллонная коронароангиопластика
ЭД	– эндотелиальная дисфункция
ЭКГ	– электрокардиография
ЭСК	– эмбриональные стволовые клетки
ЭТ-1	– эндотелин-1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров, В. Н. Клеточная терапия цирроза печени / В. Н. Александров, Т. А. Камилова, Л. И. Калюжная [и др.] // Вестник российской военно-медицинской академии . – 2014. – № 1 (45). – С. 197-202.
2. Амбросова, Т. Н. Эндотелиальная дисфункция при гипертонической болезни / Т. Н. Амбросова // Міжнародний медичний журнал. – 2013. – Т. 19 № 4. – С.16-21.
3. Аристова, И. В. Коррекция эмоциональных нарушений у больных с артериальной гипертензией / И. В. Аристова // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2013. – Т. 113 № 11, Вып. 1. – С.88-90.
4. Аронов, Д. М. Значение Амлодипина (Норваска) В Кардиологии / Д. М. Аронов // Cardiosоматика. – 2014. – № 2, Вып. 1. – С.88-90.
5. Батушкін, В. В. Порушення функціонального стану ендотелію та тромбоцитів в патогенезі гострого інфаркту міокарда у хворих похилого віку та їх значення для прогнозу перебігу хвороби / В.В. Батушкін // Український медичний альманах. – 2008. – Т. 11 № 3. – С.13-16.
6. Беленков, Ю. Н. Клеточная терапия в лечении хронической сердечной недостаточности: виды применяемых стволовых клеток, результаты последних клинических исследований / Ю. Н. Беленков, Е. В. Привалов, И. С. Чекнева // Kardiol serdečno-sosud hir. – 2008. – № 5. – С. 4-18.
7. Березин, А. Е. Прогностический потенциал маркеров биомеханического стресса у пациентов, перенесших Q-инфаркт миокарда. Результаты проспективного одногодичного исследования / А. Е. Березин, Т. А. Самура // Український медичний часопис. – 2011. – № 6 (86) . – С.100-103.
8. Березин, А. Е. Циркулирующие эндотелиальные прогениторные клетки как маркер миокардиальной дисфункции ишемического генеза / А. Е. Березин, А. А. Кремзер // Серце і судини. – 2013. – № 4. – С.37-46

9. Білоус, І. В. Адаптаційний синдром як загальна неспецифічна нейроендокринна реакція організму на стрес / І. В. Білоус, В. А. Левицький, О.Т. Білоус // Галицький лікарський вісник. – 2011. – Т. 18 № 3. – С.111-115
10. Бокерия, Л. А. Новые подходы к лечению ишемической болезни сердца: терапевтический ангиогенез в сочетании с хирургической реваскуляризацией миокарда / Л. А. Бокерия, Е. З. Голухова, М. В. Еремеева [и др.] // Терапевтический архив. – 2004. – Т. 76, № 6. – С. 25-30.
11. Бродский, В. Я. Полиплоидия в миокарде: компенсаторный резерв сердца / В. Я. Бродский // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1995. – Т. 119. – С. 454–459.
12. Бунова, С. С. Динамика Заболеваемости Инфарктом Миокарда В Регионах Российской Федерации За 11-Летний Период (2002-2012 Гг.) /С. С. Бунова, Е. В. Усачева, О. В. Замахина // Социальные аспекты здоровья населения. – 2014. – №. 6. – С. 3.
13. Бутенко, Г. М. Регенеративная медицина и стволовые клетки – проблемы и решения / Г. М. Бутенко, В. М. Кирик // Журнал НАМН Украины. – 2011. – Т. 17, № 1. – С. 62-66.
14. Вайда, Л. С. Зв'язок структурно-функціонального стану лівих відділів серця, рівня циркулюючого NT-pro-BNP та ендотелійзалежної вазодилататорної відповіді з показниками добового моніторингу артеріального тиску у хворих з артеріальною гіпертензією / Л. С. Вайда, Н. В. Лозинська // Лікарська справа. Врачебное дело. – 2013. – № 3. – С.16-24
15. Гетьман, О. И. Роль факторов повреждения эндотелия в формировании аутоиммунных реакций у больных с артериальной гипертензией / О.И. Гетьман //Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2011. – Т. 12, № 1. – С.88-90.
16. Гривенков, И. А. Эмбриональные стволовые клетки / И. А. Гривенков, А. А. Шкуматов // Институт молекулярной генетики РАН. Проблемы репродукции. – М., 2002. – Вып. 3. – С. 16-25.

17. Гринь, В. К. Сократительная функция сердца после различных вариантов введения клеточного трансплантата при инфаркте миокарда в эксперименте / В. К. Гринь, В. Ю. Михайличенко, В. А. Коноплянко // Университетская клиника. – 2010. – Т. 6, № 1-2. – С. 20-23.
18. Гринь, В. К. Патологические аспекты клеточной кардиомиопластики при экспериментальном инфаркте миокарда / В. К. Гринь, В. Ю. Михайличенко // Таврический Медико-Биологический Вестник. – 2012. – Т. 15, № 3-1. – С. 81-84.
19. Деніна, Р. В. Особливості ендотеліальної дисфункції у хворих із повторними інфарктами міокарда і хронічною серцевою недостатністю / Р. В. Деніна // Галицький лікарський вісник. – 2011. – Т. 18 № 2. – С.33-37
20. Дремина, Н. Н. Влияние фактора роста эндотелия сосудов на ремоделирование миокарда при инфаркте левого желудочка / Н. Н. Дремина, М. Г. Шурыгин // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2008. – № 2. – С. 86–87.
21. Дремина, Н. Н. Влияние FGF2 на динамику клеток фибробластического ряда в зоне формирования постинфарктного кардиосклероза / Н. Н. Дремина, М. Г. Шурыгин // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – № 1. – С. 210–211.
22. Дремина, Н. Н. Влияние эндотелиального факторароста на постинфарктное ремоделирование миокарда / Н. Н. Дремина, И. А. Шурыгина, Е. Л. Лушникова [и др.] // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 148, № 9. – С. 330–336.
23. Дремина, Н. Н. Изменение микроциркуляторного компонента миокарда под воздействием фактора роста эндотелия сосудов в постинфарктный период / Н. Н. Дремина, М. Г. Шурыгин, И. А. Шурыгина / Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2008. – № 4. – С. 73–75.
24. Дремина, Н. Н. Морфофункциональный анализ влияния фактора роста эндотелия сосудов на репаративные процессы при моделировании инфаркта миокарда: автореф. дис. канд. биол. наук. – Новосибирск, 2008. – 24 с.
25. Загидуллин, Н. Ш. Значение дисфункции эндотелия при сердечно-сосудистых заболеваниях и методы ее медикаментозной коррекции / Н. Ш.

- Загидуллин, К. Ф. Валеева, Н. Гассанов, Ш. З. Загидуллин // Кардиология. – 2010. – Т. 50 № 5. – С.54-60
26. Залесский, В. Н. Апоптоз при ишемии и репродукции миокарда / В. Н. Залесский, Т. Н. Гавриленко // Врач. дело. – 2002. – № 1. – С. 8–15.
 27. Искандеров, Б. Г. Влияние ремоделирования сосудов и вазомоторной функции эндотелия на эффективность Индапамида ретард у больных гипертонической болезнью / Б. Г. Искандеров, О. Н. Сисина, С. В. Саушкина [и др.] // Клиническая медицина. – 2012. – Т. 90 № 1. – С.64-68
 28. Іванова, І. В. Ендотелійзалежний фактор гіперполяризації як резервний захисний механізм регуляції судинного тону при дії іонізуючого опромінення / І. В. Іванова, О. В. Кислова, А. І. Соловйов // Фізіологічний журнал. – 2011. – Т. 57 № 4. – С.46-56
 29. Калигин, М. С. Клетки-мишени фактора стволовых клеток во внутренних органах человека в ходе онтогенеза : автореф. дис. на соиск. Степени к. мед. н.: 03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология / М. С. Калигин. – Казань, 2009. – 22 с.
 30. Карелкина, Е. В. Влияние терапии Лизиноприлом на циркулирующие эндотелиальные клетки-предшественники у больных гипертонической болезнью/ Е. В. Карелкина, О. Б. Иртюга, В. С. Морошкин [и др.] // Артериальная гипертензия. – 2011. – Т. 17 № 5. – С.493-500
 31. Карпов, А. А. Роль мезенхимных стволовых клеток в терапии ишемического повреждения сердца / А. А. Карпов, Ю. К. Успенская, Д. Д. Ваулина // Трансляционная медицина. – 2012. – № 5. – С. 30-37.
 32. Коноплева, Л. Ф. Эндотелиальная дисфункция в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и методы ее коррекции / Л. Ф. Коноплева // Therapia: Український медичний вісник. – 2011. – № 3. – С.26-30.
 33. Конопляников, М. А. Стволовые клетки для терапии ишемической болезни сердца: достижения и перспективы / М. А. Конопляников, В. А. Кальсин, А.В. Аверьянов // Клиническая практика. – 2012. – № 3 (11). – С.63-77.

34. Кочуева, М. Н. Механизмы формирования диастолической дисфункции левого желудочка сердца у больных артериальной гипертензией/ М. Н. Кочуева, А. С. Шалимова, Г. И. Кочуев [и др.] // Медицина сьогодні і завтра. – 2010. – № 1. – С.45-49.
35. Кривенцов, А. В. Клеточная терапия диффузного поражения миокарда в эксперименте / А. В. Кривенцов, Г. Г. Хубулава, В. Н. Александров [и др.] // Вестник российской военно-медицинской академии . – 2011. – № 2 (34). – С. 57.
36. Кривенцов, А. В. Клеточная терапия застойной сердечной недостаточности (экспериментальное исследование): автореф дисс. ... канд. мед. наук: 14.01.26 / Кривенцов Александр Викторович. – Спб., 2011. –20 с.
37. Куртова, А. В. Постинфарктная клеточная регенерационная терапия сердечной мышцы / А. В. Куртова, Е. Е. Зуева, А. С. Немко // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – № 2. – С. 35-43.
38. Лишневская, В. Ю. Возрастные особенности коррекции эндотелиальной дисфункции у больных гипертонической болезнью / В. Ю. Лишневская, Е. И. Парасюк // Сімейна медицина. – 2011. – №2. – С.54-56.
39. Лишневська, В. Ю. Роль L-аргініну в корекції ендотеліальної дисфункції у людей літнього віку, хворих на гіпертонічну хворобу/ В. Ю. Лишневська, О. І. Парасюк, Р. І. Леськів // Буковинський медичний вісник. – 2011. – Т. 15 № 3. – С.210-212.
40. Макарова, М. А. Артериальная ригидность и эндотелиальная дисфункция у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких: что первично?/ М. А. Макарова, С. Н. Авдеев, А. Г. Чучалин // Пульмонология. – 2011. – № 6. – С.73-79.
41. Макарова, М. А. Гипоксемия как потенциальный фактор развития эндотелиальной дисфункции и артериальной ригидности у больных хронической обструктивной болезнью легких / М. А. Макарова, С. Н. Авдеев, А. Г. Чучалин // Пульмонология. – 2013. – № 3. – С.36-40.

42. Михайличенко, В. Ю. Хронотропный эффект трансплантации эмбриональной культуры клеток при экспериментальном инфаркте миокарда / В. Ю. Михайличенко // Питання експериментальної та клінічної медицини. - 2007. - Т. 1, вип. 11. - С. 155-159.
43. Михайличенко, В. Ю. Эффект «хоуминга» при трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в эксперименте / В. Ю. Михайличенко // Проблеми військової охорони здоров'я. - 2008. - Вип. 23. - С. 216-222.
44. Михайличенко, В. Ю. Мезенхимальные стволовые клетки в лечении инфаркта миокарда: перспективы ангиогенеза и регенерации / В. Ю. Михайличенко // Вестник неотложной и восстановительной медицины. - 2009. - Т. 10, № 1. - С. 102-105.
45. Михайличенко, В. Ю. Клеточная кардиомиопластика при инфаркте миокарда в эксперименте / В. Ю. Михайличенко // Харківська хірургічна школа. - 2009. - № 4.1. - С. 349-350.
46. Михайличенко, В. Ю. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор при лечении инфаркта миокарда / В. Ю. Михайличенко // Новоутворення. - 2009. - № 3-4. - С. 268-273.
47. Михайличенко, В.Ю. Применение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора при лечении инфаркта миокарда / В. Ю. Михайличенко // Вестник неотложной и восстановительной медицины. - 2009. - Т. 10, № 3. - С. 352-355.
48. Михайличенко, В. Ю. Роль VEGF в ангиогенезе при норме и патологии / В. Ю. Михайличенко // Новоутворення. - 2010. - № 5. - С. 174-181.
49. Михайличенко, В. Ю. Патологические аспекты инфаркта миокарда у крыс после различных способов кардиомиопластики / В. Ю. Михайличенко // Вестник неотложной и восстановительной медицины. - 2010. - Т. 11, № 2. - С. 250-253.
50. Михайличенко В. Ю. Индукция репаративного морфогенеза и адаптационных резервов в поврежденном миокарде при использовании стромальных стволовых клеток костного мозга различного фенотипа / В.

- Ю. Михайличенко // Вестник неотложной и восстановительной медицины. - 2011. - Т. 12, № 2. - С. 216-223.
51. Михайличенко, В. Ю. Сократительная функция сердца у крыс через 1 и 3 месяца после создания инфаркта миокарда и трансплантации МСК // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2011. – Т. 12, № 4. – С. 435-438.
 52. Михайличенко, В. Ю. Применение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора при лечении инфаркта миокарда / В. Ю. Михайличенко // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2009. – Т. 10, № 3. – С. 352-355.
 53. Морчадзе, Б. Д. Повторные операции реваскуляризации миокарда у больных ИБС с рецидивом стенокардии после операций АКШ / Б. Д. Морчадзе, Л. А. Бокерия, И. Ю. Сигаев // Сердечно-сосудистые заболевания. – 2013. – № 6. – С. 54.
 54. Мусихина, Н. А. Церебральный кровоток, функциональная активность эндотелия у больных ишемической болезнью сердца и артериальной гипертонией на фоне терапии ивабрадином в комбинации с периндоприлом / Н. А. Мусихина, Л. И. Гапон, А. Б. Утешева [и др.] // Терапевтический архив. - 2012. – Т. 84 № 12. – С.30-34.
 55. Назарова, К. А. Факторы периоперационного сердечно-сосудистого риска и пути его снижения у больных ишемической болезнью сердца при чрескожных коронарных вмешательствах / К. А. Назарова, О. В. Хилькевич, Г. К. Киякбаев, // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2010. – Т. 9. № 8. – С. 86-95.
 56. Национальные клинические рекомендации Всероссийского научного общества кардиологов. – Москва, 2008. – 512 с.
 57. Непомнящих, Л. М. Патологическая анатомия и ультраструктура сердца. / Л. М. Непомнящих // Новосибирск: наука, - 1981. – 324 с.

58. Непомнящих, Л. М. Регенераторно-пластическая недостаточность кардиомиоцитов при нарушении синтеза белков / Л.М. Непомнящих // Бюл. Эспер. Биол. и мед. – 2001. – Т. 131, № 1. – С. 11-21.
59. Непомнящих, Л. М. Регенерация миокарда: пролиферативный потенциал кардиомиоцитов и индукция кардиомиогенеза при альтернативной и пластической недостаточности сердца / Л. М. Непомнящих, Е. Л. Лушникова, П. М. Ларионов [и др.] // Вестник РАМН. – 2010. – № 5. – С. 3–11.
60. Никольская, А. О. Интраоперационное применение аутологичных клеток костного мозга снижает частоту и тяжесть инфекционных осложнений у больных при аортальном шунтировании в послеоперационном периоде / А. О. Никольская, О. А. Савостьянова, Т. С. Спирина [и др.] // IV Всероссийский съезд трансплантологов им. акад. В. И. Шумакова: тезисы докладов. – М., 2008. – С. 261.
61. Никоненко, А. С. Ударно-волновая терапия в лечении ишемической болезни сердца / А. С. Никоненко, А. В. Молодан, С. Н. Завгородний // Сучасні медичні технології. – 2009. – № 1. – С. 31-35.
62. Осиев, А. Г. Эффективность баллонных катетеров с лекарственным покрытием в лечении больных с рестенозом ранее имплантированных коронарных стентов / Осиев А. Г., Мироненко С. П., Крестьянинов О. В. [и др.] // Международный журнал интервенционной кардиоангиологии. – 2013. – № 35. – С. 65.
63. Ощепкова, Е. В. Заболеваемость и смертность от инфаркта миокарда в российской федерации в 2000-2011 гг./ Е. В. Ощепкова, Ю. Е. Ефремова, Ю. А. Карпов // Терапевтический архив. – 2013. – Vol. 4. – Р. 4-10.
64. Пальцев, М. А. Стволовые клетки. перспективы применения в медицине / М. А. Пальцев, В. Н. Смирнов, А. А. Иванов // Вестник российской академии наук. – 2009. – № 11. – С.1012-1019.
65. Передрук, Т. В. Особливості перебігу безбольової ішемії міокарда з урахуванням показників ехокардіографії, міокардіальної ішемії та дисфункції ендотелію із стратифікацією ризику ускладнень ішемічної

- хвороби серця / Т. В. Передрук // Галицький лікарський вісник. – 2011. – Т. 18 № 4. – С.56-60.
66. Попов, С. В. Фундаментальные и прикладные аспекты клеточных технологий в кардиологии и кардиохирургии / С. В. Попов, В. В. Рябов, М. А. Сулова [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2008. – Т. 132, № 4. – С. 5-15.
 67. Попова, А. А., Эндотелиальная дисфункция и механизмы ее формирования / А.А. Попова , Е.Н. Березикова , С.Д. Маянская // Сибирское медицинское обозрение . – 2010. – № 4 (64). – С. 7-11.
 68. Потапов, И. В. Клеточная кардиомиопластика / И. В. Потапов, М. Е. Крашенинников, Н. А. Онищенко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2001. – № 2. – С. 53-62.
 69. Пушкарёва, Т. А. Критерии оценки дисфункции эндотелия артерий и пути ее коррекции (обзор литературы) / Т.А. Пушкарёва, Л.Б. Корякина, А.А. Рунович. [и др.] / Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 5. – С. 1–8.
 70. Ройтман, А. П. Динамика лабораторных маркеров эндотелиальной дисфункции при лечении больных с нестабильной стенокардией/ А.П. Ройтман, Б. М. Танхилевич, В.В. Долгов [и др.] // Клиническая медицина. – 2012. – Т. 90 № 9. – С.43-46.
 71. Румянцев, П. П. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации. — Л.: Наука, 1982. — 288 с.
 72. Саркисов, Д. С. Регенерация и ее клиническое значение. – М.: Медицина, 1979.– 284 с.
 73. Седов, В. М. Отдаленные результаты применения интракоронарной инфузии аутологичных мононуклеаров костного мозга / В. М.Седов, А. С. Немков, Б. В. Афанасьев [и др.] // Бюллетень НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН "Сердечно-сосудистые заболевания". – 2007. – Т. 8, № 6. – С.297.
 74. Сидоренко, Г. И. Определение фаз стресса в клинической кардиологии / Г.И. Сидоренко, А. В. Фролов, С. М. Комиссарова [и др.] //Кардиология. – 2012. – Т. 52 № 12. – С.40-44.

75. Сидорова, Л. П. Рекомендации Европейского общества гипертензии и Европейского кардиологического общества по ведению больных с артериальной гипертензией (2013 г.) / Л.П. Сидорова //Therapia: Український медичний вісник. – 2014. – № 1. – С.60.
76. Способ патоморфологического определения давности наступления инфаркта миокарда: пат. 2518333 Рос. Федерация: МПК а61В 10/00, G01N 1/28 /Шурыгина И. А., Шурыгин М. Г., Дремина Н. Н., Каня О. В.; заявитель и патентообладатель ФГБУ "НЦРВХ" СО РАМН. – №2012152730/14, заявл. 06.12.2012; опубл. 10.06.2014, Бюл. № 16. – 10 с.
77. Сукманова, И. А. Значение оксидативного стресса и дисфункции эндотелия при диастолической ХСН у пациентов разных возрастных групп / И. А. Сукманова, Д. А. Яхонтов // Российский кардиологический журнал. – 2009. – № 4. – С.22-26.
78. Сумин, А. Н. Стресс-реактивность эндотелиальной функции у больных артериальной гипертензией с типом личности Д / А. Н. Сумин, Л. Ю. Сумина, Т. А. Красилова [и др.] //Артериальная гипертензия. – 2011. – Т. 17 № 5. – С.467-473.
79. Сыродоев, А. М. Тенденции смертности от инфаркта миокарда / А. М. Сыродоев, А. П. Припачкина, Л. С. Селищева // Врач-аспирант. – 2011. – № 3.4. – С.582-586.
80. Тишко, В. В. Мультидисциплинарный подход к ведению пациентов высокого риска после повторных реваскуляризаций миокарда / В. В. Тишко, В. В. Тыренко, К. Л. Козлов // Клиническая геронтология. – 2014. –Т. 20. № 9-10. – С. 40-44.
81. Федин, А. И. Фармакологическая коррекция эндотелиальной дисфункции при атеросклеротической хронической ишемии головного мозга /А. И. Федин, Е. П. Старых, А. С. Парфенов [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2013. – Т. 113. № 10. – С. 45-48.
82. Хряпенкова, Т. Г. Межклеточные взаимодействия мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток и дифференцированных клеток

- сердца и почки: дисс. ... канд. биол. наук: 03.03.0 / Хряпенкова Татьяна Геннадиевна. – М., 2010. – 120 с.
83. Чудиновских, Ю. А. Анализ возможности пролиферации клеток в зрелом миокарде / Ю. А. Чудиновских, М. В. Еремеевна, Р. А. Серов [и др.] // Сердечно-сосудистые заболевания. – 2009. – Т. 10, № 6. – С. 312.
 84. Шальнова, С. А. Анализ смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в 12 регионах Российской Федерации, участвующих в исследовании "Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России" / С.А. Шальнова, А.О. Конради, Ю.А. Карпов [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2012. – № 5 (97). – С. 6–11.
 85. Шевченко, Ю. Л. Робот-ассистированная реваскуляризация миокарда у пациента с ИБС / Ю. Л. Шевченко, Г. Г. Борщев, П. А. Федотов // Вестник национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова. – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 138-140.
 86. Шперлинг, И. Д. Число и размеры желудочковых кардиомиоцитов человека и количество ядер в них / И.Д. Шперлинг, Л.А. Аракелян // Цитология. – 1989. – № 4. – С. 426-430.
 87. Шумаков, В. И. Биологические резервы костного мозга и коррекция органных дисфункций / В. И. Шумаков, Н. А. Онищенко – М., 2009. – 308 с.
 88. Шумаков, В. И. Трансплантология – руководство / В. И. Шумаков. - Москва, 1995. – 392 с.
 89. Шурыгин, М. Г. Ангиогенез как адаптивный механизм при ишемии / М. Г. Шурыгин, И. А. Шурыгина, Дремина Н. Н [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 5 (93). – С. 192–195.
 90. Шурыгин, М. Г. Влияние основного фибробластического фактора роста на выраженность цитолиза при экспериментальном инфаркте миокарда / М. Г. Шурыгин, И. А. Шурыгина, Н. Н. Дремина // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2008. – № 6. – С. 58–60.
 91. Шурыгин, М. Г. Влияние уровня FGF2 на динамику фаз воспаления при постинфарктном кардиосклерозе / М.Г. Шурыгин, И. А. Шурыгина //

- Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2010. – № 4. – С. 34–37.
92. Шурыгин, М. Г. Влияние фактора роста эндотелия сосудов на выраженность цитолиза при экспериментальном инфаркте миокарда / М. Г. Шурыгин, И. А. Шурыгина, Н. Н. Дремина // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2008. – № 1. – С. 68–71.
93. Шурыгин, М. Г. Количественная гистопатология инфаркта миокарда при воздействии основного фактора роста фибробластов / М. Г. Шурыгин, Н. Н. Дремина, В. В. Малышев [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – № 5. – С. 257–261.
94. Шурыгин, М. Г. Основные активаторы ангиогенеза и их применение в кардиологии (обзор литературы) / М. Г. Шурыгин, Н. Н. Дремина, И. А. Шурыгина [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2005. – № 6. – С. 199–207.
95. Шурыгин, М. Г. Роль ангиотензиновой системы и фактора роста фибробластов в патогенезе постинфарктного кардиосклероза: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Иркутск, 2007. – 38 с.
96. Шурыгин, М. Г. Фактор роста фибробластов как стимулятор ангиогенеза при инфаркте миокарда / М. Г. Шурыгин, И. А. Шурыгина // Бюл. СО РАМН. – 2010. – Т. 30, № 6. – С. 89–92.
97. Шурыгин, М. Г. Экспрессия эндотелина при экспериментальном инфаркте миокарда в условиях измененной концентрации фибробластического и вазоэндотелиального факторов роста / М. Г. Шурыгин, И. А. Шурыгина, Н. Н. Дремина [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 1. – С. 125–129.
98. Шурыгина, И. А. Роль MAP-киназных механизмов в регуляции клеточного роста (обзор литературы) / И. А. Шурыгина, М. Г. Шурыгин, Н. В. Зеленин [и др.] // Сибирский медицинский журнал (г. Иркутск). – 2009. – Т. 89, № 6. – С. 36–40.
99. Шурыгина, И. А. Фибробласты и их роль в развитии соединительной ткани // И. А. Шурыгина, М. Г. Шурыгин, Н. Н. Дремина [и др.] / Сибирский медицинский журнал (г. Иркутск). – 2012. – Т. 110, № 3. – С. 8–12.

100. Эстрин, С. И. Использование навигационных систем carto и noxa hr при выполнении клеточной кардиомиопластики / С. И. Эстрин // вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2013. – Т. 14, № 1. – С. 127-131.
101. Ягода, А. В. Цитокины при малых аномалиях сердца: роль в формировании эндотелиальной дисфункции / А. В. Ягода, Н. Н. Гладких // Клиническая медицина. – 2007. – Т. 85 № 7. – С.31-34.
102. Якутина, Н. В. Коррекция эндотелиальной дисфункции и микроциркуляторных нарушений у больных артериальной гипертонией в сочетании с сахарным диабетом 2 типа / Н. В. Якутина // Российский кардиологический журнал. – 2007. – № 6. – С.27-30.
103. Akhmedov, A. T. Myocardial regeneration of the failing heart. / A.T. Akhmedov, J. Marín-García // Heart Fail Rev. – 2013. – Vol. 18. – P. 815-833.
104. Alvarado, A. S. A cellular view of regeneration / A. S. Alvarado // Nature. – 2009. – № 460. – P. 39-40.
105. Anagnostou, A. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells / A. Anagnostou, Z. Liu, M. Steiner [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1994. – V. 91, N 9. – P. 3974–3978.
106. Anversa, P. Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology / P. Anversa, J. Kajstura, A. Leri [et al.] // Circulation. – 2006. – V. 113, N 11. – 1451–1463.
107. Anversa, P. Stem cells, myocardial regeneration and methodological artifacts / P. Anversa et al // Stem cells. – 2007. – Vol. 25. – P. 589-601.
108. Arcasoy, M. O. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin / M. O. Arcasoy // Br. J. Haematol. – 2008. – V. 141, N 1. – P. 14–31.
109. Barile, L. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction / L. Barile, V. Lionetti, E. Cervio [et al.] // Cardiovasc Res. – 2014. – Vol. 103. – P. 530-541.

110. Baygenzhin, A. Actual problems of cellular cardiomyoplasty / A. Baygenzhin, S. Tuganbekova, G. Fedotovskiyh [et al.] // Medical and health sciences journal. – 2010. – P. 12-17.
111. Beltrami, A. P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction / A. P. Beltrami, K. Urbanek, J. Kajstura [et al.] // New Engl. J. Med. – 2001. – V. 344, N 23. – P. 1750–1757.
112. Ben-Josef, G. Payments for acute myocardial infarction episodes-of-care initiated at hospitals with and without interventional capabilities. / G. Ben-Josef, L.S. Ott, S.B. Spivack [et al.] // Circ Cardiovasc Qual Outcomes. – 2014. – № 6. – C. 882-888.
113. Bhattacharya, V. Administration of granulocyte colony-stimulating factor enhances endothelization and microvessel formation in small caliber synthetic vascular grafts / V. Bhattacharya, P.A. McSweeney, Q. Shi [et al.] // J. Vasc. Surg. – 2000. – Vol.32. – N116-123.
114. Bialas, M. Transient and stable transfections of mouse myoblasts with genes coding for pro_angiogenic factors / M. Bialas, M. Krupka, A. Janeczek [et al.] // J Physiol Pharmacol. – 2011. – V. 6. – P. 219–28.
115. Bittner, R. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice / R. Bittner, C. Schofer, K. Weipoltshammer // Anat. Embryol. – 1999; – V. 199 (5) – P. 391–396.
116. Blumenthal, B. Polyurethane scaffolds seeded with genetically engineered skeletal myoblasts: a promising tool to regenerate myocardial function / B. Blumenthal, P. Golsong, A. Poppe [et al.] // Artif Organs. – 2011. – V. 34, - P. 46-54.
117. Brockes, J. P. Regeneration as an evolutionary variable / J. P. Brockes, A. Kumar, C. P. Velloso // J. Anat. – 2001. – V. 199. – P. 3–11.
118. Burlacu, A. Tracking the mesenchymal stem cell fate after transplantation into the infarcted myocardium / A. Burlacu // Curr Stem. – 2013. – Vol. 8. – P. 284-291.
119. Cao, Y. Update on therapeutic neovascularization / Y. Cao, A. Hong, H.Schulten [et al.] // Cardiovasc. Res. – 2005. – Vol. 65. – P. 639-648.

120. Cleland, J. Heart failure due to ischemic heart disease: epidemiology, pathophysiology and progression / J. Cleland., J. McGowan. // J. cardiovasc. Pharmacol. – 1999. – Vol. 33. – P. 317-329.
121. Dai, W. The Therapeutic Effect of Cell Transplantation Versus Noncellular Biomaterial Implantation on Cardiac Structure and Function Following Myocardial Infarction. / W. Dai, G.L. Kay, R.A. Kloner. // J. Cardiovasc Pharmacol Ther. – 2014. – Vol. 19. N. 4. – P. 350-357.
122. Dawn, B. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function / B. Dawn, A. Stein K. Urbaneke [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – V. 102, N 10. – P. 3766–3771.
123. Depping, R. Expression of the erythropoietin receptor in human heart / R. Depping, K. Kawakami, H. Ocker [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2005. – V. 130, N 3. – P. 877–878.
124. Dominici, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M Dominici1, K Le Blanc, I Mueller [et al.] // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8, No. 4. – 315 – 317
125. Doppler, S.A. Cardiac regeneration: current therapies-future concepts / S.A. Doppler, M.A. Deutsch, R. Lange [et al.] // J Thorac Dis. – 2013. – Vol. 5. N. 5. – P. 683-697.
126. Dvash, T. Human embryonic stem cells as a model for early human development / T. Dvash, N. Benvenisty // Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. – 2004. – Vol. 18, № 4. – P. 929-940.
127. Epstein, S. E. Angiogenesis therapy: amidst the hype, the neglected potential for serious side effects / S. E. Epstein, R. Kornowski, S. Fuchs [et al.] // Ibid. – 2001. – V. 104, N 1. – P. 115–119.
128. Erdei, Z. Expression pattern of the human ABC transporters in pluripotentembryonic stem cells and in their derivatives / Z. Erdei, R. Lőrincz, K. Szebényi [et al.] // Cytometry B Clin Cytom. – 2014. – Vol. 86. – P. 299-310.

129. Frassdorf, J. Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial K(Ca) channels / J. Frassdorf, R. Huhn, C. Niersmann, N.C. Weber // *Can. J. Anaesth.* – 2010. – Vol. 57. – P. 767-773.
130. Furchgott, R.F. The obligatory role of the endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine / R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki // *Nature.* – 1980. – Vol.288. – P. 373-376.
131. Gallo, P. Sources of cardiomyocytes for stem cell therapy: an update / P. Gallo, C. Peschle, G. Condorelli // *Pediatr. Res.* – 2006. – V. 59, N 4. – P. 79–83.
132. Gersh, B. J. Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective / B. J. Gersh, R. D. Simari, A. Behfar [et al.] // *Mayo Clinic Proceedings.* – 2009. – Vol. 84.N10. – P.876–892.
133. Glaser, R. Smooth muscle cells, but not myocytes, of host origin in transplanted human hearts / R. Glaser // *Circulation.* – 2002. – Vol. 106. – P. 17-19.
134. Goldenthal, M. J. Stem cells and cardiac disorders: an appraisal / M. J. Goldenthal, J. Marin-Garcia // *Cardiovasc. Res.* – 2003. – Vol. 58. – P. 369-377.
135. Guerra, S. Myocyte death in the failing human heart is gender dependent / S. Guerra, A. Leri, X. Wang [et al.] // *Circ. Res.* – 1999. – V. 85, N 9. – P. 856–866.
136. Hang, T.C. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet (PF-4) factor 4 inputs modulate human microvascular endothelial signaling in a three-dimensional matrix migration context. / T.C. Hang, N.C. Tedford, R.J. Reddy [et al.] // *Mol Cell Proteomics.* – 2013. – V. 12, N 12. – P. 3704–3718.
137. He, W. Exogenously administered secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) reduces fibrosis and improves cardiacfunction in a rat model of myocardial infarction / W. He, L. Zhang, A. Ni [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2010. – V.107. – P.21110-21115.
138. Hirata, A. Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs / A. Hirata, T. Minamino, H. Asanuma [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2006. – V. 48, N 1. – P. 176–184.

139. Hodgson, D.M. Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction / D. M. Hodgson, A. Behfar, L. V. Zingman [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – Vol. 287. – P. 471–479.
140. Howard, L. Profiling of transcriptional and epigenetic changes during directed endothelial differentiation of human embryonic stem cells identifies FOXA2 as a marker of early mesoderm commitment. / L. Howard, R.M. Mackenzie, N.A. Pchelintsev [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* –2013. – Vol. 2. – P. 36.
141. Huang, K.F. Recombinant human kallistatin inhibits angiogenesis by blocking VEGF signaling pathway / K.F. Huang., H.Y. Yang, Y.M. Xing [et al.] // *J Cell Biochem.* – 2014.–N-115(3).–P.575-584.
142. Huber, I. Identification and selection of cardiomyocytes during human embryonic stem cell differentiation / I. Huber, I. Itzhaki, O. Caspi [et al.] // *FASEB J.* – 2007. – № 21(10). – P. 2551-2563.
143. Hutcheson, K. A. Comparing Cell Types for Cellular Cardiomyoplasty: Analysis of Improved Diastolic Properties with Autologous Skeletal Myoblasts and Fibroblasts / K. A. Hutcheson, B. Z. Atkins, M. B. Hopkins [et al.] // *Circulation.* – 1999. – V. 100, suppl I. – P. 118.
144. Janeczek, A. Genetically modified human myoblasts with eNOS may improve regenerative ability of myogenic stem cells to infarcted heart. / A. Janeczek, A. Zimna, N. Rozwadowska, [et al.] // *Kardiol Pol.* – 2013. – Vol. 71, № 10. – P. 1048-1058.
145. Jiang, B. Differentiation of reprogrammed mouse cardiac fibroblasts into functional cardiomyocytes. / B. Jiang, H. Dong, Q. Li [et al.] // *Cell Biochem Biophys.* – 2013. – Vol. 66. – P.309-318.
146. Jung, C. Effects of myocardial postconditioning on the recruitment of endothelial progenitor cells / C. Jung, P. Sörensson, N. Saleh, [et al.]]// *J Interv Cardiol.* – 2012. – № 2. – P. 103-110.
147. Kajstura, J. Apoptotic and necrotic myocyte cell death are independent contributing variables of infarct size in rats / J. Kajstura, W. Cheng, K. Reiss [et al.]]// *Lab. Invest.* – 1996. – V. 74. – P. 86–107.

148. Kim, W.H. Cell cycle regulators during human atrial development / W.H. Kim, C.U. Joo, J.H. Ku [et al.] // Korean. J. Intern. Med. – 1998. – Vol. 13. – P. 77-82.
149. Kuraitis, D. Mesenchymal stem cells for cardiovascular regeneration. / D. Kuraitis, M. Ruel, E.J. Suuronen // Cardiovasc Drugs Ther. – 2011. – Vol. 25, N4. – P. 349-362.
150. Laeremans, H. Blocking of frizzled signaling with a homologous peptide fragment of Wnt3a/Wnt5a reduces infarct expansion and prevents the development of heart failure after myocardial infarction / H. Laeremans, T.M. Hackeng, M.A. van Zandvoort [et al.] // Circulation. – 2011. – V.124. – P. 1626-1635.
151. Lalit, P.A. Induced pluripotent stem cells for post-myocardial infarction repair: remarkable opportunities and challenges. / P.A. Lalit, D.J. Hei, A.N. Raval [et al.] // Circ Res - 2014. – № 8. – P. 1328-1345.
152. Lange, R. A. Reperfusion Therapy in acute myocardial infarction / R. A. Lange, L. D. Hillis // N. Eng. J. Med. – 2003. – Vol. 346. – P. 954-955.
153. Lee, R. J. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression / R. J. Lee, M. L.Springer, W. E. Blanco-Bose [et al.] // Circulation. – 2000. – V. 102, N 8. – P. 898–901.
154. Leferavich, J. M. Heart regeneration in MRL mice / J. M. Leferavich, K. Bedelbaeva, S. Samulewicz [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. –V. 98. – P. 9830–9835.
155. Lenneman, A.J. Treatment strategies for myocardial recovery in heart failure. / A.J. Lenneman, E.J. Birks // Curr Treat Options Cardiovasc Med. – 2014. – № 16. – C. 287.
156. Leone, A. M. Endogenous G-CSF and CD 34+ cell mobilization after acute myocardium infarction / A. M. Leone, S. Rutello, G. Bonanno [et al.] // Int. J. Cardiol. In press. – 2005. – Vol. 4, № 8. – P. 54-62.
157. Leor, J. Successful transplantation of fetal cardiomyoblasts into the infarcted myocardium of rat: a potential method for repair of infarcted myocardium / J. Leor, M. Patterson, M. J. Quinones [et al.] // Circulation. – 1995. – Vol. 92, Suppl. I. – P. 51–50.

158. Leor, J. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? / J. Leor, M. Patterson, M. J. Quinones [et al.] // *Circulation*. – 1996. – Vol. 94, Suppl. 9. – P. 332–336.
159. Levit, R. D. Cellular Encapsulation Enhances Cardiac Repair / R.D. Levit, N. Landazuri, E.A. Phelps [et al.] // *Behalf of the American Heart Association*. – 2013; 2: e000367
160. Li, R. K. Cardiomyocyte transplantation improves heart function / R. K. Li, Z. Q. Jia, R. D. Weisel [et al.] // *Ann. Thorac. Surg.* – 1996. – Vol. 62. – P. 654-660.
161. Li, R. K. Cell therapy to repair broken hearts / R. K. Li, T. M. Yau, T. Sakai [et al.] // *Can. J. Cardiol.* – 1998. – V. 14, N 5. – P. 735–744.
162. Li, R. K. In Vivo Survival and Function of Transplanted Rat Cardiomyocytes / R. K. Li, D. A. G. Mickle, R. D. Weisel [et al.] // *Circ. Res.* – 1996. – V. 78, N 2. – P. 283–288.
163. Li, R. K. Natural history of fetal rat cardiomyocytes transplanted into adult rat myocardial scar tissue / R. K. Li, D. A. G. Mickle, R. D. Weisel [et al.] // *Circulation*. – 1997. – V. 96. – P. 179–187.
164. Li, R. K. Smooth Muscle Cell Transplantation into Myocardial Scar Tissue Improves Heart Function / R. K. Li, Z. Q. Jia, R. D. Weisel [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1999. – V. 31. – P. 513–522.
165. Li, S. Endothelial VEGF sculpts cortical cytoarchitecture. / S. Li, K. Haigh, J.J. Haigh // *J. Neurosci.* – 2013. – V. 33, N 37. – P. 14809-14815.
166. Lionetti, V. Regenerative medicine approach to repair the failing heart. / V. Lionetti, C. Ventura // *Vascul Pharmacol.* – 2013. – № 3. – P. 159-163.
167. Liu, W.H. Fibroblast growth factor-23 and interleukin-6 are risk factors for left ventricular hypertrophy in peritoneal dialysis patients / WH Liu, QL Zhou, X Ao, [et al.] // *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* . – 2012. – Vol. 13, № 9. – P. 565-9.
168. London, N. Robodependent Slit signaling stabilizes the vasculature during pathologic angiogenesis and cytokine storm. / N. London, D. Li // *Curr Opin Hematol.* – 2011. – V. 18, N 3. – P.186–190.

169. Lundy, S.D. Pluripotent stem cell derived cardiomyocytes for cardiac repair. / S.D. Lundy, J.A. Gantz, C.M. Pagan // *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* – 2014. – № 16. – P. 319.
170. Martino, M. Long-active granulocyte colony-stimulating factor for peripheral blood hematopoietic progenitor cell mobilization./M. Martino, D. Laszlo, F. Lanza // *Expert Opin Biol Ther.*.. – 2014. – Vol. 14, N6. – P. 757-772.
171. Matsushita, T. Formation of Cell Junctions Between Grafted and Host Cardiomyocytes at the Border Zone of Rat Myocardial Infarction / T. Matsushita, M. Oyamada, H. Kurata [et al.] // *Circulation.* — 1999. — V. 100, Suppl II. — P. 262–268.
172. Matsushita T. Remodeling of Cell_Cell and Cell_Extracellular Matrix Interactions at the Border Zone of Rat Myocardial Infarcts / T. Matsushita, M. Oyamada, K. Fujimoto et al. // *Circ. Res.* — 1999. — V. 85. — P. 1046–1055.
173. Mendis, S., Puska P., Norrving B. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011, 356p.
174. Mewton, N. Remote preconditioning and all-cause mortality / N. Mewton, M. Ovize // *Lancet.* – 2013. – Vol. 382. – P. 579-580.
175. Morris, M.W. Jr. Cardiac Progenitor Cells in Myocardial Infarction Wound Healing: A Critical Review / M.W. Jr. Morris, K.W. Liechty // *Adv Wound Care (New Rochelle).* – 2013. – № 6. – C. 317-326.
176. Mudau, M. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis/ M.Mudau, A. Genis , A. Lochner [et al.] // *Cardiovasc. J. Afr.* – 2012. – Vol. 23 (4) . – P. 222-231.
177. Mummery, C. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells / C. Mummery, D. Ward-van Oostwaard, P. Doevendans [et al.] // *Circulation.* – 2003. – Vol. 107. – P. 2733-2740.
178. Munk, K. Remote ischemic conditioning in patients with myocardial infarction treated primary angioplasty impact on left ventricular function assessed by

- comprehensive echocardiography and gated single-photon emission CT / K. Munk, N.H. Andersen, M.R. Schmidt [et al.] // *Circulation*. – 2010. – Vol. 3. – P. 656-662.
179. Mykhaylichenko V.Yu. Experimental induction of reparative morphogenesis and adaptive reserves in the ischemic myocardium using multipotent mesenchymal bone marrow-derived stem cells / V.Yu. Mykhaylichenko, A.V. Kubyshkin, S.A. Samarin, I.I. Fomochkina, L.V. Anisimova // *Pathophysiology*. – 2016. – P. 2-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pathophys.2016.04.002>
 180. Murry, C. E. Skeletal Myoblast Transplantation for Repair of Myocardial Necrosis / C. E. Murry, R. W. Wiseman, S. M. Schwartz [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1996. – V. 98. – P. 2512–2523.
 181. Naftilan, A.J. Stem cell therapy for cardiac disease: what can be learned from oncology / A.J. Naftilan, F.G. Schuening. // *Heart Fail Clin.* – 2011. – Vol. 3. – P. 345-355.
 182. Oh, H. Telomere attrition and Chk2 activation in human heartfailure / H. Oh, S. C. Wang, A. Prahash [et al.] // *Ibid.* – 2003. – V. 100. – P. 5378–5383.
 183. Olivetti, G. Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do to affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart / G. Olivetti, E. Cigola, R. Macstri [et al.] // *J. Mol. Coll. Cardiol.* – 1996. – V. 28. – P. 1463–1477.
 184. Orlic, D. Mobilized bone marrow cells repair the myocardial heart, improving function and survival / D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – V. 98, Suppl 18. – P. 344–349.
 185. Orlic, D. Stem cell repair in ischemic heart disease: an experiment models / D. Orlic // *Int. J. Hematol.* – 2002. – V. 76, Suppl I. – P. 144–145.
 186. Orlic, D. Stem cells for myocardial regeneration / D. Orlic, J. M. Hill, A. E. Arai // *Circ. Res.* – 2002. – Vol. 91. – P. 1092-1102.
 187. Padin-Iruegas, M. E. Cardiac progenitor cells and biotinylated insulin-like growth factor-1 nanofibers improve endogenous and exogenous myocardial regeneration after infarction / M. E. Padin-Iruegas, Y. Misao, M. E. Davis [et al.] // *Circulation*. – 2009. – V. 120, N 10. – P. 876–887.

188. Palumbo, R. Extracellular hmgpl, a signal of tissue damage, induces mesangioblast migration and proliferation / R. Palumbo // J. Cell Biol. – 2004. – Vol. 164. – P. 441-449.
189. Poss, K. D. Heart regeneration in zebrafish / K. D. Poss, L. G. Wilson, M. T. Keating // Science. – 2002. – V. 298. – P. 2188–2190.
190. Radisic, M. Materials science and tissue engineering: repairing the heart / M. Radisic, K.L. Christman. // Mayo Clin Proc. – 2013. – № 88. – P. 884–898.
191. Reinecke, H. Electromechanical Coupling between Skeletal and Cardiac Muscle: Implications for Infarct Repair / H. Reinecke, G. H. MacDonald, S. D. Hauschka [et al.] // J. Cell. Biol. – 2000. – V. 149. – P. 731–740.
192. Reiss, K. Atentemyocardial infarction leads to upregulation of the IGF, auto crine system, DNA replication, and nuclear mitotic division in the remaining viable cardiac myocytes / K. Reiss, J. Kaistura, X. Zhang [et al.] // Exp. Cell Res. – 1994. – V. 213, N 2. – P. 463–472.
193. Reiss, K. Overexpression of insulin_like growth factor_1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice / K. Reiss, W. Cheng, A. Ferber [et al.] // Proc. Natl. Acad.Sci. USA. – 1996. – V. 93, N 16. – P. 8630–8635.
194. Rokosh, G. Mechanisms of stem cell effects: insights from MRI. / G. Rokosh, S. Ghafghazi, R. Bolli. // Minerva Cardioangiol. – 2013. – Vol. 61. – N. 6. – P. 605-616.
195. Rupp, S. Characterization of long-term endogenous cardiac repair in children after heart transplantation / S. Rupp, M. Koyanagi, M. Iwasaki [et al.] // Eur. Heart J. – 2008. – Vol. 29. – P. 1867-1872.
196. Sawa, Y., Present and future perspectives on cell sheet-based myocardialregeneration therapy. with satellite cell implantation./ Y. Sawa, S. Miyagawa. // Biomed Res Int. – 2013. – V. 58. – P. 583
197. Scavone, A. Embryonic stem cell-derived CD166+ precursors develop into fully functional sinoatrial-like cells / A. Scavone, D. Capiluppo, N. Mazzocchi, A. [et al.] // Circ Res. – 2013. – Vol. 113. – P. 389-398.

198. Schmitt, M. Biosimilar G-CSF based mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells for autologous and allogeneic stem cell transplantation. / M. Schmitt, A. Publicover, K.H. Orchard // *Theranostics*. – 2014. – Vol. 4, N3. – P. 280-289.
199. Schulman, I.H. Key developments in stem cell therapy in cardiology / I.H. Schulman // *Regen Med*. – 2012. – Vol. 7. – P. 17-24.
200. Scott, R. C. Targeting VEGF-encapsulated immunoliposomes to MI heart improves vascularity and cardiac function / R. C. Scott, J. M. Rosano, Z. Ivanov [et al.] // *FASEB J*. – 2009. – V. 23, N 10. – P. 3361–3367.
201. Sharkey, S.W. Остро возникающая обратимая кардиомиопатия, обусловленная внезапным эмоциональным стрессом: описание серии случаев / S.W. Sharkey, J.R. Lesser, A.G. Zenovich // *Медицина неотложных состояний*. – 2011. – № 1-2. – С.58-64
202. Shi, Q. Utilizing granulocyte colony-stimulating factor to enhance vascular graft endothelialization from circulating blood cells / Q. Shi, V. Bhattacharya, M. Hong-De Wu [et al.] // *Ann. Vasc. Surg*. – 2002. – Vol.16. – P.314-320.
203. Smith, A. G. Embryo-derived stem cells: of mice and men / A. G. Smith // *Annu Rev. Cell Dev. Biol*. – 2001. – № 17. – P. 435-462.
204. Steinhoff, G. Re-growth of the adult heart by stem cells?/ G. Steinhoff // *Eur J Cardiothorac Surg*. – 2014. – Vol. 45. N 1. – P. 937-942.
205. Su, W. Bioluminescence imaging of human embryonic stem cell-derived endothelial cells for treatment of myocardial infarction./ W. Su, L. Leng, Z. Han [et al.] // *Cell*. – 2013. – Vol. 1052. – P. 203-215.
206. Sullivan, K.E. Extracellular matrix remodeling following myocardial infarction influences the therapeutic potential of mesenchymal stem cells. / K.E. Sullivan, K.P. Quinn, K.M. Tang [et al.] // *Stem Cell Res The*. – 2014. – № 5. – С. 14-32.
207. Sun, L. Нарушение функции эндотелия - препятствие для терапевтического ангиогенеза/ L. Sun, Y. Bai, G. Du // *Therapia: Український медичний вісник*. – 2011. – № 7-8. – С.68-75

208. Swynghedauw, B. Molecular mechanism of myocardial remodeling /B. Swynghedauw // *Physiol. Rev.* – 1999. – Vol. 79. – P. 215-262.
209. Tang, Y. Effects of recombinant human erythropoietin on platelet activation in acute myocardial infarction: results of a double-blind, placebo-controlled randomized trial / Y. Tang, H. Faisal, J. Frank [et al.] // *Am. Heart J.* – 2009. – V. 158, N 6. – P. 941–947.
210. Taylor, D. A. Regenerating functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation / D. A. Taylor, B. Z. Atkins, P. Hungspreugs [et al.] // *Nature Medicine.* – 1998. – N 4. – P. 929–933.
211. Teo, A. A novel perfused rotary bioreactor for cardiomyogenesis of embryonic stem cells / A. Teo, A. Mantalaris, K. Song, M. Lim // *Biotechnol Lett.* – 2014. – Vol. 36. – P. 947-960.
212. The biology of cell reproduction / Ed. R. Baserga. – London: Harvard Univ. Press, 1995. — 452 p.
213. Thiele, J. Mixed chimerism of cardiomyocytes and vessels after allogeneic bone marrow and stem-cell transplantation in comparison with cardiac allografts / J. Thiele // *Transplantation.* – 2004. – Vol. 77. – P. 1902-1905.
214. Thiele, J. Regeneration of heart muscle tissue: quantification of chimeric cardiomyocytes and endothelial cells following transplantation / J. Thiele // *Histol. Histopathol.* – 2004. – Vol. 19. – P. 201-209.
215. Thomson, J.A. Isolation of a primate embryonic stem cell line /J.A. Thomson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – V. 92. – P. 7844-7848
216. Van Oostrom, A.J.H.H.M. Инсулинорезистентность и эндотелиальная функция/ A.J.H.H.M. Van Oostrom, M.C. Cabezas, T.J. Rabelink // *Биологическая терапия.* – 2008. – № 3. – С.4-8.
217. Wagner, A.D. Vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) targeting therapies for endocrine refractory or resistant metastatic breast cancer. /A.D. Wagner, C. Thomssen, J. Haerting // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2012. – V. 69, Suppl. 3. – P. 4–10.

218. Weil, B.R. Stem cell stimulation of endogenous myocyte regeneration / B.R. Weil, J.M. Jr. Canty // Clin Sci (Lond). – 2013. – Vol. 125 (3). – P. 109-119.
219. Wen, Y. Autologous transplantation of blood-derived stem/progenitor cells for ischaemic heart disease. / Y. Wen, L. Meng, Y. Ding [et al.] // Int J Clin Pract. – 2011. – Vol. 65, Suppl. 8. – P. 858-865.
220. Wojakowski, W. Mobilization of stem and progenitor cells in cardiovascular diseases. / W. Wojakowski, U. Landmesser, R. Bachowski [et al.] // Leukemia. – 2012. – Vol. 26. – P. 23-33.
221. Wold, L. Stem cell therapy for the Heart / L. Wold, W. Dai, C. Sesti [et al.] // Congestive heart failure. – 2004. – Vol. 10, № 6. – P. 293-301.
222. Wu, S. M. Origins and fates of cardiovascular progenitor cells / S. M. Wu, K. R. Chien, C. Mummery // Cell. – 2008. – Vol. 132. – P. 637-643.
223. Xinyang, H. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis / H. Xinyang, Yu, P. Shan, J. L. Fraser [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2008. – Vol. 135. – P. 799-808.
224. Zhang, Z. Secreted frizzled related protein 2 protects cells from apoptosis by blocking the effect of canonical Wnt3a / Z. Zhang, A. Deb, A. Pachori [et al.] // J Mol Cell Cardiol. – 2009. – V. 46. – P. 370-377.