

Выбор стратегии экспансии мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга, полученных от доноров с сердечной недостаточностью и коморбидностями

Р.И. Дмитриева¹, М.А. Ключкина¹, И.Р. Минуллина¹, С.В. Анисимов¹, А.Ю. Зарицкий²

¹ Институт молекулярной биологии и генетики Федерального Центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург

² Институт Гематологии, Федерального Центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург

The adoption of expansion strategies of bone marrow derived mesenchymal stromal cells from patients with heart failure and co-morbidities

R.I. Dmitrieva¹, M.A. Klukina¹, I.R. Minullina¹, S.V. Anisimov¹, A.Yu. Zaritsky²

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics of the Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St. Petersburg

² Institute of Haematology of the Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St. Petersburg

Трансплантация аутогенных мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) костного мозга рассматривается в качестве нового перспективного подхода в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе хронической сердечной недостаточности (ХСН). Кандидатами для такого лечения могут оказаться пожилые пациенты с широким спектром сопутствующих заболеваний, которые могут влиять на функциональные свойства клеточного образца – субстрата трансплантации. В данной работе впервые исследовано влияние ХСН, ожирения и сахарного диабета на свойства клеточного препарата, а также исследованы возможности снижения зависимости свойств клеточного материала от индивидуальных характеристик донора.

ММСК были получены из образцов костного мозга 10 здоровых доноров, 16 пациентов с изолированной ХСН, 21 пациента с ХСН и ожирением, 3 пациентов с ХСН и сахарным диабетом, и 9 пациентов с ХСН, ожирением и диабетом. Свойства полученных образцов исследовали на последовательных пассажах при различной плотности посева в условиях гипоксии и нормоксии: иммунофенотип, пролиферативная активность, дифференцировочный потенциал.

У пациентов с ХСН и коморбидностями пролиферативная активность клеток существенно снижалась по сравнению с полученными от здоровых доноров уже на ранних пассажах и сопровождалось развитием признаков репликативного старения, снижением доли клоногенных мультипотентных клеток. При уменьшении плотности посева до 100 кл/см² наблюдалось существенное увеличение числа удвоенной клеточной популяции при сохранении стабильной пролиферативной активности, а гипоксия дополнительно увеличивала продолжительность поддержания высокой пролиферативной активности образца без развития признаков репликативного старения.

Показано, что изменение тактики *in vitro* экспансии существенно снижает влияние индивидуальных особенностей донора на функциональные свойства ММСК костного мозга.

Ключевые слова: хроническая сердечная недостаточность, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, пролиферация, дифференцировка, клеточное старение.

Autologous transplantation of bone marrow derived multipotent mesenchymal stromal cells is considered as a promising treatment for cardiovascular diseases including heart failure. The phenotype of patient with heart failure changed over the last two decades: the percentage of very old individuals, and number of comorbidities increased markedly. These factors could affect the functional properties of mesenchymal stromal cells intended for autologous transplantation. In this study for a first time the functional properties of cell samples from patients with heart failure and co-morbidities (obesity and diabetes mellitus) were investigated and the possibilities to compensate for the effects of patient factors on stromal cell properties by correcting *ex vivo* expansion strategies were studied.

10 healthy donors, 16 with isolated heart failure, 21 with comorbid obesity, 3 with diabetes and 9 with obesity and diabetes were enrolled. Cultures were evaluated in successive passages for immunophenotype, proliferative activity (population doubling time), frequency of colony-forming units, frequency of adipo- and osteo-progenitors at different seeding density under hypoxia/normoxia.

The proliferation rate of mesenchymal stromal cells from patients with heart failure and co-morbidities decreased at early passages while seeded at 3000 cells/cm². The cultures with low proliferation rate demonstrated senescence-associated features and low frequency of clonogenic multipotent cells. At seeding density 100 cells/cm² cultures maintained high proliferation rate, hypoxia enhanced this effect even further up to 17–28 *in vitro* population doublings.

Some of the donor-specific alterations in cell sample properties could be corrected by changing of culturing strategies.

Key words: chronic heart failure, multipotent mesenchymal stromal cells, proliferation, differentiation, cell aging.

e-mail: renata.i.dmitrieva@gmail.com

Большинство заболеваний сердечно-сосудистой системы, занимающих ведущее место среди причин смерти во всем мире, приводят к развитию хронической сердечной недостаточности (ХСН). При этом доступные в настоящее время терапевтические методы могут лишь уменьшить выраженность её симптомов и замедлить прогрессию. В терминальной стадии ХСН единственным радикальным методом лечения становится трансплантация сердца — операция, которая не может стать массовой из-за отсутствия достаточного количества доноров, высокой стоимости и проблем, связанных с иммуносупрессией [1]. Поэтому для снижения смертности от ХСН, а также для предупреждения развития стойкой декомпенсации необходимы новые терапевтические подходы, направленные на восстановление структуры и функции сердечной мышцы. В качестве одного из наиболее перспективных уже на протяжении нескольких десятков лет рассматривают клеточную терапию. Результаты экспериментов как *in vitro*, так и на моделях у животных, а также результаты недавних клинических исследований подтверждают эффективность данного направления биотехнологий [1–8].

Клетки, пригодные для клеточной терапии ХСН, должны обладать определенными характеристиками, как то: доступность в необходимом количестве, безопасность применения, эффективность с точки зрения выживаемости *in vivo* и обеспечения репаративной регенерации миокарда [8]. В качестве материала для клеточной терапии рассматривают различные типы клеток: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК), гетерогенная популяция мононуклеарных клеток костного мозга, миобласты скелетных мышц, резидентные стволовые клетки миокарда и скелетной мышцы, фетальные кардиомиоциты, фибробласты [2, 8–10, 11]. Результаты клинических исследований, проведенных с использованием разных типов клеток, являются противоречивыми и не позволяют сделать однозначные выводы о том, какие клетки являются наиболее эффективными для терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Однако признано, что ММСК костного мозга являются одними из наиболее удобоваримых для клинического использования благодаря возможности их быстрой и эффективной экспансии *in vitro* и их иммуноприлегированному статусу, что указывает на потенциальную возможность аллогенной трансплантации [12–16]. Несмотря на то, что многие исследователи полагают, что ММСК костного мозга могут быть успешно трансплантированы в аллогенном варианте, большинство авторов считают, что идеальной является аутологичная трансплантация [8, 17]. Тем не менее, при рассмотрении возможности использования аутогенных клеток всегда необходимо учитывать тот факт, что донор-реципиент для этого вида лечения будет пожилым, с широким спектром сопутствующей патологии и получающим определенное лечение. Недавние исследования когорты пациентов с ХСН в США показали, что в течение двух последних десятилетий доля пациентов старше 80 лет среди больных ХСН выросла в два раза. Существенно возросло число пациентов с такими коморбидностями, как ожирение, сахарный диабет, остеопороз, заболевания почек и щитовидной железы, гиперхолестеринемия. Употребление лекарственных препаратов выросло более чем на 50% [18]. Все эти факторы могут оказывать существенное влияние на свойства

ММСК, полученных из тканей больного ХСН, и ограничивать возможности аутологичной трансплантации. Влияние возраста донора на свойства ММСК активно изучалось в последние годы во многих лабораториях [19, 20], однако исследование характеристик ММСК, полученных от пациентов с ХСН и сопутствующей патологией (ожирение и сахарный диабет) ранее не проводилось. В нашей работе впервые на большой группе доноров было исследовано влияние ХСН и таких коморбидностей, как ожирение и сахарный диабет на свойства ММСК костного мозга. Также были оценены возможности улучшения качества образцов ММСК костного мозга, полученных от таких пациентов.

Материал и методы

Характеристика пациентов

В исследование было включено 49 доноров, в том числе 10 здоровых доноров, 16 пациентов с изолированной ХСН, 21 пациент с сердечной недостаточностью и ожирением (ХСН+О), 3 с сердечной недостаточностью и диабетом (ХСН+Д) и 9 с сердечной недостаточностью, ожирением и диабетом (ХСН+О+Д). Исследование проводилось в соответствии со стандартами Хельсинской Декларации (1989), всеми пациентами было подписано информированное согласие.

Получение культур ММСК костного мозга

Аспират костного мозга получали из подвздошной кости донора. Культуру ММСК получали стандартным методом [21]. Выделенные в градиенте плотности фиколла мононуклеарные клетки костного мозга высевали в культуральные флаконы (2×10^5 кл/см²) и культивировали в среде α -MEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% сыворотки плодовых коровы (HyClone, США), 2 mM L-глутамин и 1% смеси пенициллин/стрептомицин (Invitrogen, США) в стандартных условиях до получения конфлюэнтной культуры. Этому пассажу присваивали нулевой номер (P0). Часть мононуклеаров отбиралась для определения содержания клоногенных клеток (CFU) в исходном образце (описание метода см. ниже).

Определение времени удвоения популяции (PD) и числа кумулятивных делений

Хотя при изучении клеток, полученных путем экспансии исходного образца, наиболее удобным методом документирования и систематизации результатов является подсчет пассажей, нормализация результатов по номеру пассажа может оказаться некорректной и привести к неверным выводам. С этой точки зрения более корректным является подсчет числа удвоений популяции клеток *in vitro* [22]. Культуру ММСК получали методом селекции по адгезии. Начальное количество ММСК в исходном образце мононуклеаров костного мозга определялось при подсчете CFU в каждом образце. Подсчет CFU производился, исходя из предположения, что каждая колония ММСК была образована из одной «родительской» клоногенной клетки. Метод хорошо описан ранее [23], в его основе лежит принцип последовательных разведений: суспензию клеток последовательно разводили в два раза в шести рядах 96-луночного культурального планшета таким образом, чтобы в первом ряду было 2×10^4 клеток на лунку,

в шестом ряду — 625 клеток на лунку. Через 10 сут. культивирования в стандартных условиях подсчитывали лунки, в которых образовались и не образовались колонии ММСК, исходя из чего вычисляли содержание клоногенных клеток в исходном образце. После этого на каждом пассаже подсчитывали количество клеток и определяли время удвоения популяции и число кумулятивных удвоений популяции *in vitro*.

Определение числа CFU и дифференцировочного потенциала ММСК

Суспензию ММСК костного мозга последовательно разводили в два раза в восьми рядах двух 96-луночных культуральных планшетов таким образом, чтобы в первом ряду было 50 клеток на лунку, в последнем ряду — 0,39 клеток на лунку.

Через 10 сут. культивирования подсчитывали в каждом ряду положительные и отрицательные лунки и вычисляли содержание CFU в культуре ММСК. После этого в одном планшете полученные колонии индуцировали к дифференцировке в адипогенном, а во втором планшете — в остеогенном направлении. Клоногенные клетки с адипогенным потенциалом (CFU-Ad) определяли через 14 сут. реакцией с OilRedO, с остеогенным потенциалом (CFU-Ost) через 21 сут. после окраски Alizarin Red. Адипогенная среда содержала 1 мкМ инсулина, 1 мкМ дексаметазона, 0,5 мМ изобутил-ментил-ксантина, остеогенная — 10 мМ β-глицерофосфата, 10 нМ дексаметазона, 50 мкг/мл натрий-L-аскорбил-2-фосфата [23].

Определение клеточного старения

В качестве биомаркера клеточного старения ММСК использовали активность β-галактозидазы. Окрашивание проводили согласно инструкции производителя (Senescence Cells Histochemical Staining Kit, SIGMA, США).

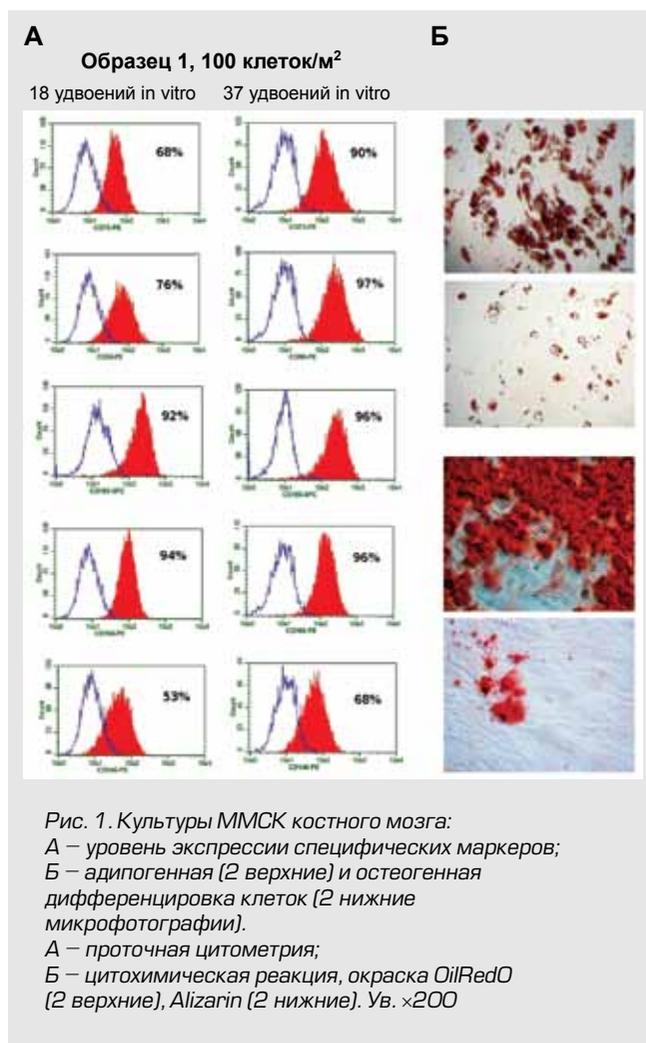
Иммунофенотип клеток

Международным Обществом Клеточной Терапии (ISCT) в 2006 году было предложено применять термин ММСК к популяциям клеток, экспрессирующих определенный набор поверхностных маркеров: CD105⁺; CD73⁺; CD90⁺; CD45⁻; CD34⁻; CD14⁻ или CD11b⁻; CD19⁻ или CD79α⁻ [11]. ММСК были проанализированы на экспрессию этих маркеров с использованием антител, конъюгированных с фикоэритрином (PE), флуоресцеин изоцианатом (FITC) и аллофикоцианином (APC) (Becton-Dickinson BioSciences, США). Использовали прибор Guava EasyCyte 8 и программное обеспечение ExpressPro.

Результаты

Характеристика первичных культур ММСК

В ходе исследования все образцы ММСК костного мозга рутинно тестировались на соответствие минимальным критериям Международного Общества Клеточной Терапии (ISCT) [11]: клетки были выделены селекцией по адгезии к пластику, экспрессировали поверхностные маркеры CD105, CD73, CD90, CD166, CD146 и не экспрессировали маркеры гемопозитических клеток CD45, CD34, CD14 и CD19; были способны к дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлениях (репрезентативные результаты показаны на рис. 1).



Пролиферативная активность, репликативное старение

Для каждого образца мононуклеарных клеток костного мозга определяли количество CFU, после чего на 3–4 последовательных пассажах определяли время удвоения популяции и число кумулятивных делений. CFU в образцах мононуклеарных клеток костного мозга колебалось в пределах от 1 до 8 клеток на миллион и не зависело от статуса донора, что согласуется с литературными данными [21, 24]. Время удвоения популяции является удобным индикатором пролиферативной активности образца, снижение которой указывает на начало развития процессов клеточного старения [25]. На ранних этапах экспансии время удвоения популяции ММСК составляло около 1 сут., а затем увеличивалось от пассажа к пассажи, и на третьем пассаже достигало 7 и более сут. При этом динамика снижения пролиферативной активности отличалась для разных групп доноров. Результаты анализа времени удвоения в разных группах доноров на третьем пассаже представлены на рис. 2. Из графика следует, что у доноров с ХСН и коморбидностями вероятность существенного снижения пролиферативной активности повышалась по сравнению со здоровыми донорами уже на втором пассаже (после приблизительно 14 удвоений *in vitro*). Снижение пролиферативной активности указывает на начало процессов репликативного старения популяции ММСК [25], что

подтверждается результатами исследования активности β-галактозидазы и свидетельствует о низкой перспективности использования таких образцов в клинических протоколах.

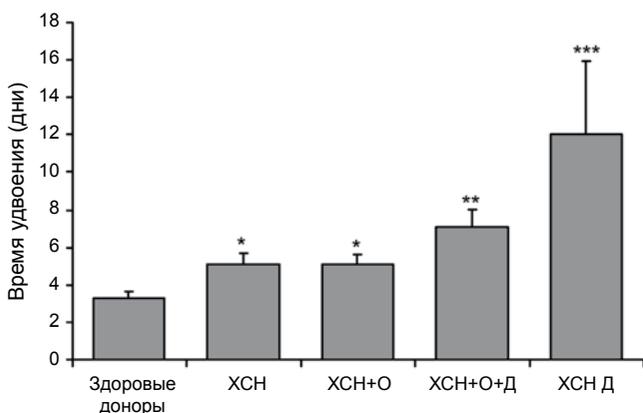


Рис. 2. Время удвоения популяции ММСК, полученных от различных пациентов, 3 пассажа культивирования в условиях нормоксии и высокой плотности посева: ХСН – пациенты с хронической сердечной недостаточностью; ХСН+О – пациенты с хронической сердечной недостаточностью и ожирением; ХСН+О+Д – пациенты с хронической сердечной недостаточностью, ожирением и сахарным диабетом; ХСН+Д – пациенты с хронической сердечной недостаточностью и сахарным диабетом. * $p < 0,02$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Клоногенность и мультипотентность

Следующим этапом нашего исследования являлось выявление возможных связей между развитием признаков репликативного старения в популяции ММСК и изменением функциональных свойств клеток. Главными свойствами ММСК являются клоногенность и мультипотентность. Доля CFU в культуре ММСК является основным фактором, определяющим время удвоения популяции ММСК, а репрезентативным индикатором мультипотентности является доля клоногенных клеток с потенциалом к адипогенной (CFU-AD) и остеогенной (CFU-OST) дифференцировке. Эти показатели определялись нами на

нескольких последовательных пассажах, результаты показаны на рис. 3. Как и ожидалось, доля CFU в образцах ММСК существенно снижалась от пассажа к пассажи, достигая в некоторых образцах значений ниже 1%. Увеличение времени удвоения коррелировало с уменьшением числа CFU в культуре (рис. 3А). При этом доля CFU, способных дифференцироваться (CFU-AD, CFU-OST), оставалась практически неизменной при переходе от второго пассажа к четвертому (рис. 3Б). Это позволяет сделать вывод о том, что даже в «стареющей» культуре сохраняется клоногенная фракция, в которой способность к дифференцировке поддерживается на неизменном уровне, а изоляция и экспансия субпопуляции клоногенных клеток из «стареющей» культуры ММСК могла бы привести к получению более однородных образцов с высоким содержанием митотически активных мультипотентных клеток без признаков старения.

Влияние условий культивирования на изменение свойств ММСК

Далее нами было проведено исследование возможности обогащения образца ММСК клоногенной фракцией путем изменения условий экспансии клеточного материала. В основе экспериментального подхода к решению этой проблемы лежала классическая идея о том, что истинно клоногенная клетка способна образовывать колонии фибробластоподобных клеток при так называемом «клональном» высевании на пластик, то есть при очень низкой плотности посадки. Неклоногенные клетки в таких условиях, как правило, погибают [26]. Большинство протоколов культивирования ММСК предлагают для экспансии высевать от 2000 до 5000 клеток на см² культурального флакона, однако недавние исследования свидетельствуют о том, что при посеве с низкой плотностью (25–200 кл./см²) можно получать культуры ММСК с высокой пролиферативной активностью, что позволяет сделать экспансию более эффективной [27, 28]. В нашей работе мы исследовали возможность повышения эффективности экспансии ММСК, снизив плотность посева на последовательных пассажах до 100 кл./см² и культивируя их в условиях гипоксии (мультигазовый инкубатор MCO-18M (SANYO, Япония), концентрация CO₂ и O₂ по 5%). Для этой цели были выбраны пять

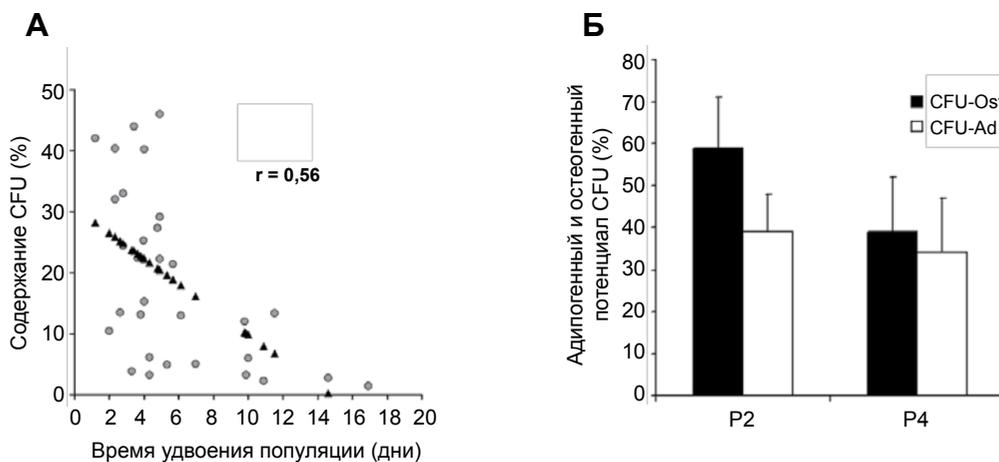


Рис. 3. Морфофункциональная активность ММСК: А – корреляция времени удвоения и содержания клоногенных клеток (CFU) в культуре ММСК; Б – доля CFU, способных дифференцироваться в остеогенном (CFU-OST) и адипогенном (CFU-AD) направлениях

образцов ММСК с разной динамикой увеличения времени удвоения и развития признаков клеточного старения при культивировании в обычных условиях: образец 1 (здоровый донор, стабильная пролиферативная активность на протяжении 24 удвоений *in vitro*), образец 2 (ХСН, небольшое увеличение PD после 18 удвоений *in vitro*), образец 3 (ХСН+О, существенное увеличение PD после 13 удвоений *in vitro*), образцы 4 и 5 (ХСН, существенное увеличение PD после 11–14 удвоений *in vitro*). Во всех образцах ММСК снижение плотности посева на последовательных пассажах сопровождалось существенным увеличением числа удвоений клеточной популяции при сохранении стабильной пролиферативной актив-

ности, а умеренная гипоксия (концентрация O_2 5%) дополнительно увеличивала продолжительность поддержания высокой пролиферативной активности образца (рис. 4). Так, например, в образце 2 пролиферативная активность ММСК, полученных при плотности посева 3000 клеток на cm^2 , снижалась после 14,5 удвоений *in vitro*, в то время как для ММСК, полученных при плотности посева 100 клеток на cm^2 , снижение пролиферативной активности наблюдалось лишь после 21 удвоения *in vitro*. Таким образом, изменение условий получения культуры ММСК повышало эффективность экспансии каждого образца ММСК и увеличение эффективности варьировало от 2^3 до 2^7 раз.

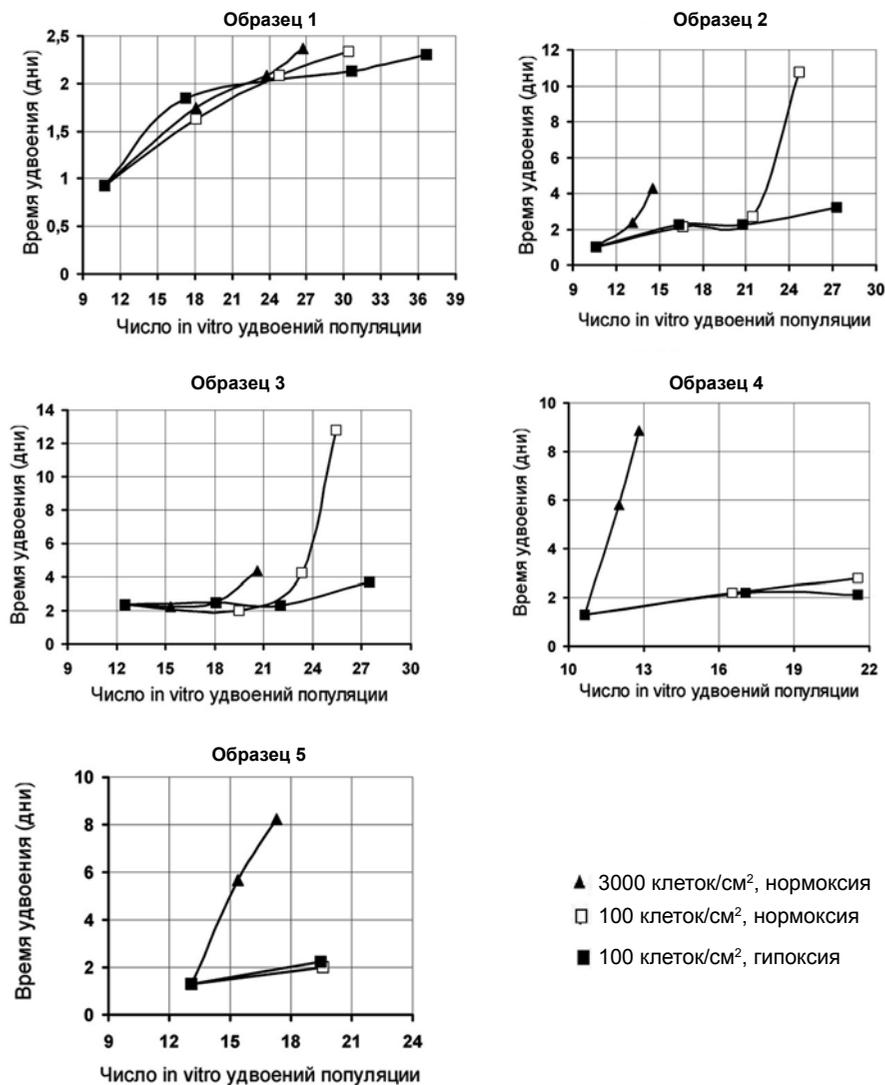


Рис. 4. Изменения динамики пролиферативной активности ММСК костного мозга в различных условиях культивирования

Обсуждение

Трансплантация аутогенных ММСК все чаще рассматривается в качестве наиболее перспективного терапевтического подхода к лечению сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе ХСН. Разработка протоколов эффективной экспансии ММСК костного мозга *in vitro* при сохранении функциональных свойств клеточного материала является важной технологической задачей, без решения которой

невозможно развитие протоколов клеточной терапии. В нашем исследовании было впервые показано, что для образцов ММСК, полученных из костного мозга значительной группы пациентов с ХСН, при *in vitro* экспансии характерно раннее снижение пролиферативной активности и появление признаков репликативного старения по сравнению с образцами, полученными от здоровых доноров. Также нами показано, что наличие сахарного диабета

у таких пациентов являлось фактором, повышающим вероятность получения образцов ММСК низкого качества. Кроме того, нами было установлено, что изменение условий культивирования позволяет повысить эффективность *ex vivo* экспансии и улучшить качество клеточных культур, полученных от пациентов с ХСН и коморбидностями. Так, для всех исследованных образцов из одного и того же объема костного мозга при снижении плотности высева ММСК с 3000 клеток/см² до 100 кл./см² были получены образцы ММСК в 2³–2⁷ большего объема, с высокой пролиферативной активностью и без признаков репликативного старения. Положительный эффект гипоксии (5% O₂) также наблюдался, но был не всегда ярко выражен (рис. 4 А–Д). Молекулярные механизмы, лежащие в основе этих эффектов, остаются не изученными до конца. Существуют литературные данные, свидетельствующие о том, что плотность высева ММСК костного мозга влияет на пролиферативную активность образца [27, 29–31], и соответственно, низкая плотность посева способствует увеличению скорости экспансии ММСК, однако, однозначных выводов о том, какие сигнальные пути участвуют в регуляции контроля пролиферации ММСК, сделано не было. Литературные данные часто противоречивы и указывают на то, что поддержание функциональных свойств ММСК при *ex vivo* экспансии регулируется на разных уровнях; роль плотности посева и гипоксии в запуске регуляции этих механизмов остается неясной. Например, было показано, что посеянные в низкой плотности клетки в течение нескольких дней находятся в латентной фазе, перед выходом из которой они начинают активно секретировать белок DKK-1, ингибитор сигнального пути Wnt [31]. Высокая концентрация DKK-1 стимулирует вступление ММСК в клеточный цикл и способствует, таким образом, быстрому росту популяции. В другом исследовании [32], напротив, было показано, что стимуляция сигнального пути Wnt литием также стимулировала быстрый рост популяции ММСК при низкой плотности посева. Результаты исследований влияния гипоксии на функциональные свойства ММСК также можно назвать противоречивыми. Так, недавно были опубликованы данные, свидетельствующие о том, что комбинирование клонального высева и гипоксии при экспансии ММСК предотвращает раннее развитие признаков репликативного старения [33]. Регуляция гипоксией клеточных процессов и сигнальных каскадов опосредована транскрипционным фактором

HIF-1, который способен активироваться в ответ на изменение концентрации O₂. Авторы показали, что механизм эффекта гипоксии может быть связан со стимуляцией экспрессии сигнального пути «HIF-1 – TWIST» (TWIST – фактор, который экспрессируется в ММСК и участвует в индукции эпителиально-мезенхимального перехода), что в свою очередь предотвращает активацию циклин-зависимого ингибитора киназы 1A (p21) и, соответственно, развитие признаков апоптоза и репликативного старения. Также, недавно было показано, что прекодиционирование ММСК в условиях гипоксии способствует увеличению адипогенного и остеогенного потенциала клеток [34], если индукция дифференцировки проводится в условиях нормоксии; однако при стимуляции дифференцировки при гипоксии (5% O₂) наблюдалось небольшое снижение способности ММСК к минерализации внеклеточного матрикса и накоплению липидных капель, по сравнению дифференцировкой при 20% O₂, а при 1% O₂ ММСК практически полностью теряли способность к минерализации матрикса и не могли успешно дифференцироваться в адипоцитарном направлении [35]. В заключение следует ещё раз отметить, что полученные нами результаты свидетельствуют о низкой перспективности использования ММСК костного мозга, полученных от больных ХСН с коморбидностями, при использовании стандартных условий культивирования *in vitro*. Для снижения зависимости качества клеточного материала от индивидуальных характеристик донора и/или пациента необходима разработка воспроизводимых и надежных протоколов *in vitro* экспансии клеточного материала: изменение плотности посева клеток и снижение уровня кислорода в культуральных инкубаторах могут оказаться перспективными подходами в решении этой задачи.

Благодарности

Работа поддержана Министерством здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Госконтракт № К-32-НИР/111-3) в рамках программы Союзного государства «Стволовые клетки» (З.А.Ю.) и Министерством образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 8799) в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (Д.Р.И.). Авторы выражают благодарность сотрудникам клинических подразделений Центра Гудковой А.Я., Ю.В. Сазоновой и Д.В. Моторину за организацию сбора клинического материала.

ЛИТЕРАТУРА:

- Shabbir A., Zisa D., Suzuki G. et al. Am heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2009; 296: H1888–97.
- Trachtenberg B., Velazquez R.N., Williams A.R. et al. Rationale and design of the transendocardial injection of autologous human cells (bone marrow or mesenchymal) in chronic ischemic left ventricular dysfunction and heart failure secondary to myocardial infarction (TAC-HFT) trial: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of safety and efficacy. *American Heart Journal* 2011; 161(3): 487–93.
- Kumar M.P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of heart failure: is it all paracrine actions and immunomodulation? *Cardiovascular Medicine* 2008; 9(2): 122–8.
- Hatzistergos K.E., Quevedo H., Oskouei B.N. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ. Res.* 2010; 107: 913–22.
- Miyahara Y., Nagaya N., Kataoka M. et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nature Medicine* 2006; 12: 459–65.

- Quevedo H.C., Hatzistergosa R.E., Oskouei B.N. et al. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *PNAS USA* 2009; 106(33): 14022–7.
- Hare J.M., Traverse J.H., Timothy D. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) after acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 54(24): 2277–86.
- Heldman A.W., Zambrano J.P., Hare J.M. Cell therapy for heart disease: where are we in 2011? *Am. Coll. Cardiol.* 2011; 57: 466–8.
- Segers V.F.M., Richard T., Lee R.T. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature* 2008; 451: 937–42.
- Angert D., Houser S.R. Stem cell therapy for heart failure. *Curr. Treat. Opt. Cardiovas. Med.* 2009; 11: 316–27.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315–27.

12. Giordano A., Galderisi U., Marino I.R. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J. Cell Physiol.* 2007; 211: 27–35.
13. Preda M.B., Valen G. Evaluation of gene and cell-based therapies for cardiac regeneration. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2013; Epub ahead of print.
14. Amado L.C., Saliaris A.P., Schuleri K.H. et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *PNAS USA* 2005; 102: 11474–9.
15. Shabbir A., Zisa D., Leiker M. et al. Muscular dystrophy therapy by non-autologous mesenchymal stem cells: muscle regeneration without immunosuppression and inflammation. *Transplantation* 2009; 87(9): 1275–82.
16. Tyndall A., Walker U.A., Cope A. et al. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: a review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology Division, London, UK. *Arthritis Res. Ther.* 2007; 9: 301.
17. Hare J.M., Traverse J.H., Henry T.D. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 54: 2277–86.
18. Wong C.Y., Sarwat I., Chaudhry S.I., Desai M.M. et al. Trends in comorbidity, disability, and polypharmacy in heart failure. *Am. J. Med.* 2011; 124: 136–43.
19. Stolzing A., Jones E., McGonagle D. et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mechanisms of Ageing and Development* 2008; 129: 163–73.
20. Bork S., Pfister S., Witt H. et al., DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. *Aging Cell* 2010; 9(1): 54–63.
21. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 1999; 284: 143–7.
22. Cristofalo V.J., Allen R.G., Pignolo R.J. et al. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: A reevaluation. *PNAS USA* 1998; 95(18): 10614–9.
23. Mitchell J.B., McIntosh K., Zvonic S. et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006; 24: 376–85.
24. Bianco P., Robey, P.G. Skeletal stem cells. In: R.P. Lanza, editor. *Handbook of adult and fetal stem cells.* San Diego, CA: Academic Press, 2004: 415–24.
25. Wagner W., Horn P., Castoldi M. et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS ONE* 2008; 3(5): e2213.
26. Bianco P., Robey P.G., Simmons P.J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008; 2(4): 313–9.
27. Fossett E., W. S. Khan W.S. Optimising human mesenchymal stem cell numbers for clinical application: a literature review. *Stem Cells International* 2012; Article ID 465259, 5 pages. Published online 2012 January 31.
28. Fossett E., Khan W.S., Longo U.G. et al. Effect of age and gender on cell proliferation and cell surface characterization of synovial fat pad derived mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 2012; 30(7): 1013–8.
29. Tsai C.C., Chen Y.J., Yew T.L. et al. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood* 2011; 117(2): 459–69.
30. Both S.K., Van der Muijsenberg A.J., van Blitterswijk C.A. et al. A rapid and efficient method for expansion of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 2007; 13: 3–9.
31. Colter D.C., Class R., DiGirolamo C.M. et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *PNAS USA* 2000; 97: 3213.
32. Gregory C.A., Singh H., Perry, A.S. et al. The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 28067.
33. De Boer J., Wang H.J., Van Blitterswijk C. Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 2004; 10: 393.
34. Valorani M.G., Montelatici E., Germani A. et al. Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials. *Cell Prolif.* 2012; 45; 225–38.
35. Жамбалова А.П., Гершович Ю.Г., Буравкова Л.Б. и др. Влияние пониженного содержания кислорода на дифференцировку мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека *in vitro*. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2009; IV(3): 47–51.

Поступила 29.03.2013