

КАРПОВ А. А.<sup>1,2</sup>, ПУЗАНОВ М. В.<sup>1</sup>,  
АЛЬМУХАМЕТОВА Ф. Р.<sup>2</sup>, УКИН А. А.<sup>2</sup>,  
ЛОМАКИНА А. М.<sup>2</sup>, ЧЕРЕПАНОВ Д. Е.<sup>2</sup>,  
ИВКИН Д. Ю.<sup>3</sup>, ВАУЛИНА Д. Д.<sup>4</sup>, ЭЙВАЗОВА  
Ш. Д.<sup>1</sup>, МОИСЕЕВА О. М.<sup>1</sup>, ГАЛАГУДЗА М. М.<sup>1, 2</sup>

## Микроинкапсулирование мезенхимных стволовых клеток как инструмент для изучения механизмов клеточной терапии при инфаркте миокарда

<sup>1</sup> Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова 194156, Россия, Санкт-Петербург, пр. Пархоменко, д. 15Б

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8

<sup>3</sup> Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14

<sup>4</sup> Институт мозга человека им. Н. П. Бехтерева РАН 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 9

e-mail: karpovmed@gmail.com

### Реферат

**Введение.** В литературе обсуждаются такие механизмы положительного эффекта клеточной терапии при ишемии миокарда, как прямая дифференцировка трансплантированных стволовых клеток в клетки миокарда, а также стимуляция ангиогенеза и дифференцировки резидентных стволовых клеток сердца паракринными факторами, секретлируемыми аутологичными или аллогенными стволовыми клетками при интрамиокардиальном введении. Решению вопроса о вкладе указанных механизмов в итоговый эффект клеточной терапии может способствовать применение такого методического приема, как микроинкапсулирование стволовых клеток.

**Цель исследования** – оценка жизнеспособности и функции мезенхимных стволовых клеток (МСК) после инкапсуляции *in vitro* и оценка безопасности интрамиокардиальной трансплантации микроинкапсулированных МСК *in vivo*.

**Материал и методы.** Для создания микрокапсул, содержащих МСК красного костного мозга крыс, использовалась система магнитно-механического микроинкапсулирования. В качестве полимерной основы микрокапсулы использовали альгинат натрия в сочетании с различными координирующими агентами (2,2 %-й и 1,2 %-й раствор  $BaCl_2$ , а также 1,5 %-й раствор  $CaCl_2$ ). Стабильность полученных микрокапсул оценивалась в динамике при их инкубации в фосфатном буфере. Жизнеспособность клеток *in vitro* оценивалась через 30 мин и 5 дней после микроинкапсулирования с помощью витального красителя LIVE/DEAD Kit. Оценка безопасности интрамиокардиальной трансплантации микроинкапсулированных МСК проводилась в экспериментах на самцах крыс стока Wistar массой 225±25 г. Выраженность системной воспалительной реакции оценивалась по изменению уровня лейкоцитов периферической крови. Морфофункциональные показатели сердца оценивались через 5 дней после трансплантации с помощью эхокардиографии.

**Результаты исследования.** В ходе работы были получены альгинатные капсулы с диаметром 225±25 мкм. Использование в качестве координирующего агента 2,2 %-го раствора  $BaCl_2$  продемонстрировало лучшие показатели стабильности микрокапсул ( $CaCl_2$ : набухание – 1-й день, полное разрушение – 5-й день;  $BaCl_2$ : набухание – 14-й день, полное разрушение – более 21 дня), а также выживаемости инкапсулированных клеток ( $CaCl_2$ : через 30 мин – 48±4 %, через 5 дней – 18±2 %;  $BaCl_2$ : через 30 мин – 63±6 %, через 5 дней – 71±5 %). Уровень лейкоцитов периферической крови и морфофункциональные показатели сердца после интрамиокардиального введения микрокапсул не отличались от таковых в группе введения фосфатного буфера.

**Выводы.** Разработана методика микроинкапсулирования МСК с их последующей трансплантацией в миокард. Микроинкапсулирование МСК может быть использовано для оценки роли паракринных факторов в механизме действия клеточной терапии на ремоделирование миокарда. Методика микроинкапсулирования может также быть использована для защиты стволовых клеток от воздействия иммунной системы реципиента и увеличения их выживаемости в ранние сроки после интрамиокардиальной трансплантации.

**Ключевые слова:** микрокапсулы, альгинат, мезенхимные стволовые клетки

**Введение**

Инфаркт миокарда и постинфарктная хроническая сердечная недостаточность, несмотря на широкий спектр терапевтических подходов, до сих пор являются одной из основных проблем мирового здравоохранения [15]. Во время длительной ишемии происходит необратимая гибель кардиомиоцитов, что приводит к уменьшению объема рабочего миокарда, нарушению систолической функции и ремоделированию сердца. В этой связи регенеративные технологии, нацеленные на воссоздание поврежденной ткани миокарда, в первую очередь, клеточная терапия, приобретают особую актуальность [4]. При этом среди стволовых клеток и клеток-предшественников наибольший интерес представляют мезенхимные стволовые клетки (МСК) различного происхождения [2, 7]. Несмотря на уникальные характеристики этих клеток (биологическая доступность, безопасность и мультипотентность), эффективность клеточной терапии на сегодняшний день далека от максимальной. Не вызывает сомнения необходимость разработки и апробации эффективных методик, основанных на использовании клеточной терапии, и дальнейшей трансляции лабораторных протоколов в клиническую практику.

Основной проблемой клеточной терапии остается массовая гибель стволовых клеток в ранние сроки после трансплантации под воздействием неблагоприятных факторов микроокружения, таких как гипоксия и воздействие иммунной системы реципиента. Учитывая это, несомненный интерес вызывают попытки модификации стволовых клеток [9], открывающие перспективы контроля и изменения механизмов действия, повышения выживаемости клеток в условиях ишемии и получения принципиально новых кардиопротективных свойств МСК. Одним из наиболее перспективных направлений в области модификации МСК является создание многоклеточных единиц трансплантации на основе стволовых клеток. Микроинкапсуляция МСК – новая стратегия модификации протокола клеточной терапии, позволяющая не только увеличить ее эффективность и безопасность, но и приблизиться к пониманию механизма действия стволовых клеток, который остается недостаточно изученным. Принцип инкапсуляции клеток известен уже более 30 лет и доказал свою безопасность и эффективность в терапии широкого круга заболеваний, в первую очередь, сахарного диабета 1 типа [13].

Стратегия микроинкапсуляции предполагает заключение клеток в полупроницаемую мембрану из полимерного материала, через которую свободно проходят газы, нутриенты и сигнальные молекулы, но не проникают антитела и иммунные клетки, что защищает МСК от повреждения иммунной системой реципиента. Таким образом, заключенные в капсулу МСК способны свободно выделять в интерстициальное пространство цитокины и факторы роста, стимулируя ангиогенез и подавляя апоптоз клеток ишемизированной ткани (рис. 1), но лишены способности к контактному взаимодействию с клетками миокарда реципиента и прямой дифференцировке, что позволяет изолированно оценить паракринный эффект трансплантированных клеток.

**Цель работы** – оценка жизнеспособности и функции мезенхимных стволовых клеток (МСК) после инкапсуляции *in vitro* и оценка безопасности интрамиокардиальной трансплантации микроинкапсулированных МСК *in vivo*.

**Материал и методы исследования**

**Выделение и культивирование МСК** проводилось по протоколу, описанному ранее [10]. Получение красного костного мозга (ККМ) производилось из большеберцовых, плечевых и бедренных костей крысы путем промывания полости диафиза кости фосфатным буфером (PBS). Затем ККМ помещался в питательную среду, состоящую из  $\alpha$ -MEM (PanEco, Russia) с добавлением 10 %-й фетальной бычьей сыворотки (HyClone, USA), L-глутамина и антибиотиков, и культивировался в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при стандартных условиях. В популяции МСК полная замена питательной среды и удаление неадгезированных клеток производились через 48 ч. Впоследствии питательная среда заменялась один раз в 2–3 дня. Пассирование субконфлюэнтных культур производилось ферментативным путем с использованием раствора трипсина – этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА).

**Методика микроинкапсуляции.** Для получения микрокапсул была использована установка Encapsulator B-390 (BUCHI, Швейцария), технология работы которой основана на разбиении ламинарного потока жидкости на капли одинакового размера за счет вибрации с последующим их рассеиванием в электромагнитном поле. В качестве полимерного агента использовался Poly-G-альгинат натрия (Sigma-Aldrich, США) – линейный полисахарид, состоящий из остатков бета-D-маннуроносовой (M) и альфа-L-гиалуроносовой (G) кислот, соединенных бета-1-4-гликозидными связями с формированием M-M-, M-G- и G-G-блоков. Суспензия, содержащая  $1 \times 10^6$  МСК в 1 мл 1 %-го раствора альгината натрия, подавалась на вход установки Encapsulator B-390 с заданными параметрами работы: частота вибрации – 3000 Гц, напряжение электродов – 2000 В, давление – 450–500 мБар, диаметр используемой форсунки – 120 мкм. Указанные параметры обеспечивают образование микрокапсул с диаметром  $250 \pm 50$  мкм.

В качестве стабилизирующего раствора для формирования поверхностной оболочки микрокапсулы был выбран 2,2 %-й р-р хлорида бария (BaCl<sub>2</sub>). Концентрация раствора определялась по формуле расчета изотонических концентраций растворов электролитов:

$$M = (0,29M) \cdot i,$$

где  $m$  – масса вещества, г; 0,29 – фактор изотоничности неэлектролита;  $M$  – молекулярная масса вещества;  $i$  – изотонический коэффициент.

Для оценки эффективности применения данного стабилизирующего раствора производилось его сравнение с применявшимися ранее для этой цели растворами, а именно – 1,5 %-м раствором хлорида

кальция ( $\text{CaCl}_2$ ) [17, 18] и 1,2 %-м раствором хлорида бария ( $\text{BaCl}_2$ ) [12]. Сравнение производилось по следующим параметрам: 1) изотоничность раствора; 2) стабильность капсул, полученных при использовании исследуемых растворов; 3) жизнеспособность инкапсулированных клеток на разных сроках после стабилизации капсулы.

*Оценка изотоничности стабилизирующих растворов.* Оценка осмоляльности стабилизирующих растворов производилась с помощью осмометра OSMOMAT 030 (GONOTEC, Германия).

*Оценка стабильности микрокапсул, полученных при использовании исследуемых растворов.* Стабильность микрокапсул, полученных с помощью исследуемых стабилизирующих растворов, оценивалась визуально при помещении микрокапсул в фосфатный буфер в динамике через фиксированные промежутки времени: 1, 5, 10, 14 и 21 день. Критериями стабильности являлись отсутствие выраженной деформации микрокапсулы, изменения размеров, наличие разрывов на ее поверхности.

*Оценка жизнеспособности инкапсулированных клеток.* Для оценки жизнеспособности клеток в микрокапсуле был использован витальный краситель LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen, США), содержащий бромистый этидий для окраски погибших клеток и кальцеин АМ для окраски жизнеспособных клеток. Результаты окрашивания визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа. Количественная оценка жизнеспособных клеток производилась через 30 мин и 5 суток после окрашивания путем вычисления процентного соотношения жизнеспособных клеток по отношению к общему количеству клеток внутри микрокапсулы.

*Влияние интрамиокардиальной трансплантации микроинкапсулированных МСК на уровень лейкоцитов и морфофункциональные показатели левого желудочка.* Эксперименты проводились на самцах крыс стока Wistar массой  $225 \pm 25$  г. Животные были наркотизированы с помощью однократного внутрибрюшинного введения хлоралгидрата (*Acros Organics*, США в дозе 450 мг/кг. После обработки гортани 2 %-м раствором лидокаина производилась интубация трахеи и подключение животного к аппарату искусственной вентиляции легких (*SAR-830P*, США) со следующими параметрами работы: частота дыхания – 60/мин, дыхательный объем – 3 мл/100 г массы тела. В ходе эксперимента у животных выполнялась запись электрокардиограммы (Кардиотехника-8, ЗАО «Инкарт», СПб.) в стандартных отведениях.

Доступ к сердцу осуществлялся через четвертое межреберье слева с предварительным L-образным разрезом кожи от верхнего края тела грудины до мечевидного отростка по средней линии и далее по ходу 7-го ребра до средней аксиллярной линии

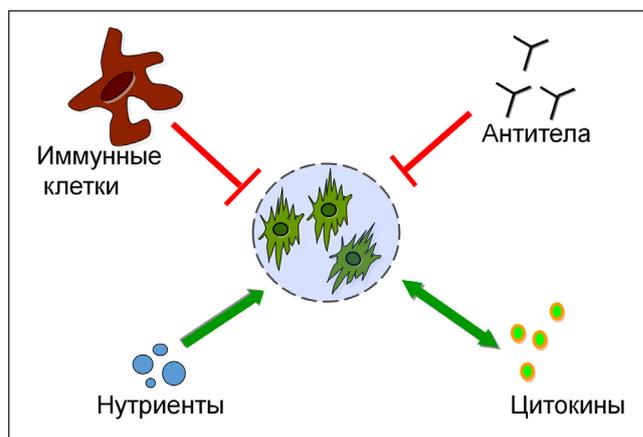


Рис. 1. Принцип действия микроинкапсулирования МСК как подхода к увеличению выживаемости клеток после интрамиокардиальной трансплантации

и разведением грудных мышц. Далее производилось вскрытие перикарда.

Все животные были случайным образом разделены на две группы:

1) контроль ( $n=7$ ): производилась интрамиокардиальная инъекция фосфатного буфера в объеме 100 мкл в 3–4 точки передней стенки левого желудочка (ЛЖ);

2) микроинкапсулированные МСК ( $n=8$ ): производилась интрамиокардиальная инъекция суспензии микрокапсулированных МСК.

Рана послойно ушивалась викрилом 4–0 (*Ethicon*, Германия). Шов на коже обрабатывался настойкой йода (5 %). После операции внутрибрюшинно вводили цефтриаксон (50 мг/кг) для профилактики послеоперационных инфекционных осложнений.

Для оценки выраженности системной воспалительной реакции после трансплантации производилось определение уровня лейкоцитов периферической крови на 3-и и 7-е сутки после введения с помощью автоматического ветеринарного гематологического анализатора (*Abacus Junior 5 (Vet)*, *Diatron*, Венгрия)

Морфофункциональные показатели ЛЖ оценивались через 7 дней после операции с помощью

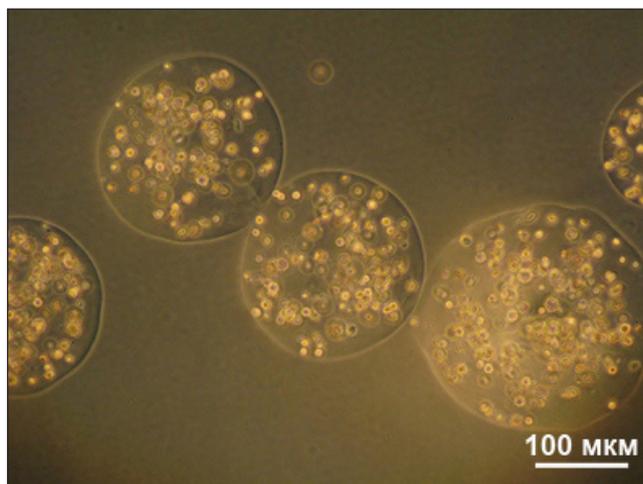


Рис. 2. Микрофотография инкапсулированных МСК. Увеличение  $\times 100$

Осмоляльность растворов для стабилизации микрокапсул

Таблица 1	
Раствор	Осмоляльность, осмоль/кг
Бидистиллированная вода	0,001
0,9 % NaCl	0,290
1,5 % CaCl <sub>2</sub>	0,248
1,2 % BaCl <sub>2</sub>	0,132
2,2 % BaCl <sub>2</sub>	0,230

трансторакальной эхокардиографии (MyLabTouchSL 3116; *Essaot*, Италия) [1]. Животных наркотизировали с помощью однократного внутривенного введения хлоралгидрата (*Acros Organics*, США) в дозе 350 мг/кг и регистрировали следующие параметры: фракция выброса, конечный диастолический размер (КДР ЛЖ), конечный систолический размер ЛЖ (КСР ЛЖ), толщина передней стенки ЛЖ (ПСЛЖд), толщина задней стенки ЛЖ (ПЗЛЖд), нарушения локальной сократимости ЛЖ.

**Результаты исследования**

В ходе исследования были получены капсулы заданного размера – 225±25 мкм. При этом среднее количество клеток в одной капсуле составило 50±8 (рис. 2).

По результатам оценки осмоляльности стабилизирующих растворов изотоническими свойствами обладали растворы 1,5 %-й р-р хлорида кальция (CaCl<sub>2</sub>); 2,2 %-й р-р хлорид бария (BaCl<sub>2</sub>) (табл. 1). В дальнейшем именно эти растворы использовались для стабилизации внешней оболочки микрокапсулы.

Показатели устойчивости микрокапсул, изготовленных с использованием различных стабилизирующих

растворов, приведены в табл. 2. Из данных табл. 2 следует, что при использовании 1,5 % раствора CaCl<sub>2</sub> набухание капсул происходило уже на первый день, а полное разрушение на 5 день наблюдения. При использовании 2,2 % раствора BaCl<sub>2</sub> срок биодеградации микрокапсул значительно увеличивался: легкое набухание происходило к 14 дню наблюдения, полного разрушения микрокапсул не было зафиксировано во весь срок наблюдения.

Исследование жизнеспособности микроинкапсулированных клеток показало большую выживаемость МСК внутри микрокапсул, стабилизированных 2,2 % раствором BaCl<sub>2</sub> по сравнению с 1,5 % раствором CaCl<sub>2</sub> в динамике: через 30 минут – 71±5 % и 48±4 %, соответственно; через 5 дней – 63±6 % и 18±2 %, соответственно (рис. 3).

В экспериментах *in vivo* уровень лейкоцитов периферической крови на 3 день после операции в группе введения микрокапсул достоверно не отличался от группы контроля (15,9±1,2 (×10<sup>9</sup>/л) и 15,6±2,3 (×10<sup>9</sup>/л) соответственно) и был значимо выше, чем у неоперированных животных (3,9±0,7 (×10<sup>9</sup>/л)). На 7 день после трансплантации уровень лейкоцитов в обеих группах снизился до значений, характерных для неоперированных животных (4,2±0,8 (×10<sup>9</sup>/л) и 4,9±0,5 (×10<sup>9</sup>/л) соответственно) (рис. 4).

Эхокардиографические показатели в обеих группах на 7 день после операции значимо не отличались от неоперированных животных (табл. 3). Глобальная систолическая функция в группе контроля и группе введения микрокапсул была сохранена, локальных нарушений сократимости после интрамиокардиальных инъекций выявлено не было.

Стабильность микрокапсул на разных сроках наблюдения при использовании различных стабилизирующих растворов

Таблица 2		
День	1,5 % CaCl <sub>2</sub>	2,2 % BaCl <sub>2</sub>
1-й	Набухание	Стабильны
5-й	Полное разрушение	Стабильны
10-й	Полное разрушение	Стабильны
14-й	Полное разрушение	Легкое набухание
21-й	Полное разрушение	Легкое набухание

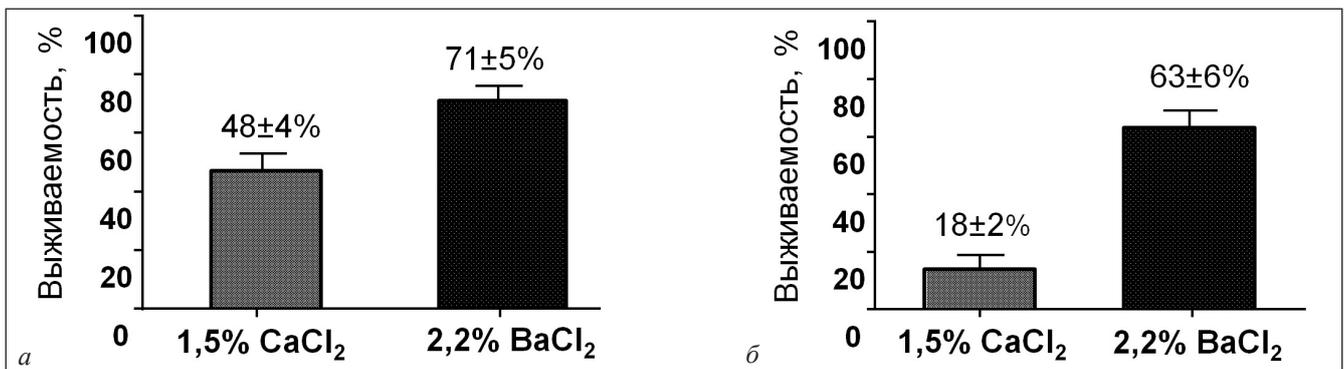


Рис. 3. Выживаемость инкапсулированных МСК при использовании различных стабилизирующих растворов: а – через 30 мин после микроинкапсуляции; б – через 5 дней после микроинкапсулирования

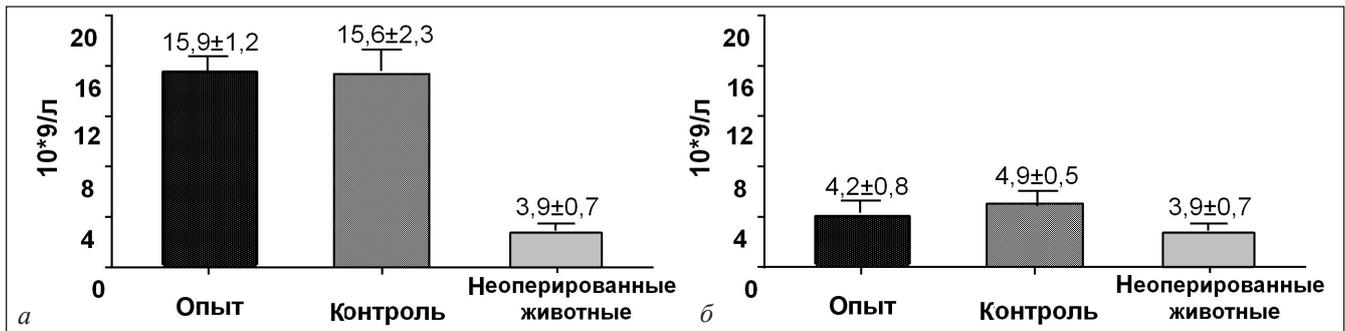


Рис. 4. Уровень лейкоцитов в периферической крови на разных сроках после интрамиокардиального введения: а – через 3 дня; б – через 7 дней

### Обсуждение результатов

В результате проведенной работы были получены микрокапсулы заданного размера и параметров устойчивости. В ходе работы был предложен и апробирован новый стабилизирующий раствор для формирования внешней оболочки микрокапсулы. Сравнительный анализ предложенного и ранее известных растворов показал преимущества нового стабилизирующего раствора для микроинкапсуляции МСК по параметрам как устойчивости капсулы, так и выживаемости инкапсулированных МСК в разные сроки наблюдения. Необходимо отметить, что в ранее проводимых работах [12, 17] основное внимание при подборе стабилизирующего раствора уделялось оптимальным параметрам прочности и проницаемости образующейся капсулы. Данных об осмоляльности стабилизирующего раствора не приводилось. Не вызывает сомнений, что растворы с неоптимальной осмотической силой, контактирующие с клетками, негативно влияют как на функциональную активность, так и на жизнеспособность инкапсулируемых клеток. Более того, важно учесть значительную биологическую роль высоких концентраций ионов кальция, которые могут вмешиваться во внутриклеточный метаболизм, в том числе способствовать запуску апоптоза [5].

В экспериментах на животных была показана безопасность интрамиокардиального введения микрокапсул из альгината натрия диаметром  $225 \pm 25$  мкм, как со стороны возможного развития системной воспалительной реакции в ответ на инъекцию, так и

со стороны возможных изменений морфофункциональных показателей сердца.

Данное исследование приобретает особую актуальность, так как, несмотря на то, что последние годы были отмечены бурным развитием методов клеточной терапии с использованием МСК [11] и удалось достичь заметных успехов в исследовании биологических свойств МСК, эффективность клеточной терапии остается недостаточной [3], а клиническое использование этих клеток в настоящее время затрудняется рядом серьезных биологических и технологических проблем [8, 14]. Наиболее важными вопросами остаются низкая выживаемость клеток после трансплантации [6] и отсутствие четкого понимания главенствующих механизмов кардиопротективного действия стволовых клеток на ишемизированный миокард [16]. Без решения этих проблем не представляется возможным дальнейшее раскрытие потенциала клеточной терапии инфаркта миокарда и ее перехода на принципиально новый клинический уровень [9].

Одним из первых удачных примеров использования методики инкапсулирования для увеличения эффективности клеточной терапии является работа F. Lim et al. [13], в которой производилось заключение в полупроницаемую мембрану клеток островков Лангерганса для пролонгирования сахароснижающего эффекта трансплантированных бета-клеток у животных со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом.

За последние несколько лет были исследованы несколько протоколов создания многоклеточ-

Сравнительный анализ морфофункциональных показателей сердца крысы через 7 дней после интрамиокардиальной инъекции в сравнении с неоперированными животными по данным эхокардиографии

Таблица 3

Показатель	Неоперированные животные	Группа контроля	Группа введения микрокапсул
ПСЛЖд, мм	$1,8 \pm 0,12$	$1,7 \pm 0,21$	$1,8 \pm 0,17$
ЗСЛЖд, мм	$1,8 \pm 0,11$	$1,8 \pm 0,13$	$1,9 \pm 0,14$
КДР, мм	$4,9 \pm 0,13$	$5,0 \pm 0,11$	$5,0 \pm 0,15$
КСР, мм	$1,2 \pm 0,06$	$1,4 \pm 0,05$	$1,3 \pm 0,04$
Нарушения локальной сократимости	нет	нет	нет
ФВ, %	$71,3 \pm 5,21$	$72,1 \pm 2,61$	$68,9 \pm 4,55$

Примечание: ПСЛЖд – передняя стенка левого желудочка в диастолу; ЗСЛЖд – задняя стенка левого желудочка в диастолу; КДР – конечный диастолический размер; КСР – конечный систолический размер; ФВ – фракция выброса.

ных единиц трансплантации на основе МСК. Так, в статье R. Levit et al. [12] было продемонстрировано увеличение эффективности клеточной терапии ишемического повреждения сердца с помощью МСК при инкапсулировании этих клеток в полупроницаемую мембрану.

Предложенная в данной работе модификация метода инкапсулирования может быть с успехом использована для защиты стволовых клеток различного происхождения от воздействия иммунной системы реципиента и, тем самым, увеличения их выживаемости в ранние сроки после интрамиокардиальной трансплантации. Заключение в микрокапсулы клетки лишены возможности мигрировать из зоны введения, но при этом в полной мере могут реализовывать паракринную активность. Таким образом, данная методика может приблизить нас к пониманию механизмов кардиопротективного эффекта, оказываемого МСК. Более того, эта стратегия позволяет увеличить безопасность клеточной терапии, снижая до минимума риск развития опухолей и иммунных реакций на трансплантацию. Таким образом, рассмотренный подход вносит свой вклад в раскрытие широчайшего потенциала клеточной регенерационной терапии ишемического повреждения миокарда.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-08138.

### Литература

1. Карпов А. А., Ивкин Д. Ю., Драчева А. В., и др. Моделирование постинфарктной сердечной недостаточности путем окклюзии левой коронарной артерии у крыс: техника и методы морфофункциональной оценки // *Биомедицина*. 2014. Т. 1. № 3. С. 32–48.
2. Карпов А. А., Успенская Ю. К., Ваулина Д. Д. Роль мезенхимных стволовых клеток в терапии ишемического повреждения сердца // *Трансляционная мед.* 2012. Т. 5. № 16. С. 30–37.
3. Afzal M. R., Samanta A., Shah Z. I. et al. Adult Bone Marrow Cell Therapy for Ischemic Heart Disease: Evidence and Insights From Randomized Controlled Trials // *Circ. Res.* 2015. Vol. 117. № 6. P. 558–575. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.304792
4. Alpert J. S., Thygesen K., Antman E. et al. Myocardial infarction redefined a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000. Vol. 36. № 3. P. 959–969.

5. Duke R. C., Witter R. Z., Nash P. B. et al. Cytolysis mediated by ionophores and pore-forming agents: role of intracellular calcium in apoptosis // *FASEB J.* 1994. Vol. 8. № 2. P. 237–246.

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

7. Gnechchi M., Danieli P., Cervio E. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease // *Vascul. Pharmacol.* 2012. Vol. 57. № 1. P. 48–55.

8. de Jong R., Houtgraaf J. H., Samiei S. et al. Intracoronary stem cell infusion after acute myocardial infarction: a meta-analysis and update on clinical trials // *Circ. Cardiovasc. Interv.* 2014. Vol. 7. № 2. P. 156–167.

9. Karpov A. A., Drahova A. V., Buslova D. V. et al. Modification of Mesenchymal Stem Cells as a Way to Improve the Effectiveness of Cell Therapy of Ischemic Myocardial Injury // *Ross. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova*. 2015. Vol. 101. № 9. P. 985–998.

10. Karpov A. A., Uspenskaya Y. K., Minasian S. M. et al. The effect of bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation on myocardial remodeling in the rat model of ischaemic heart failure // *Int. J. Exp. Pathol.* 2013. Vol. 94. № 3. P. 169–177.

11. Lee S., Choi E., Cha M. J. et al. Cell adhesion and long-term survival of transplanted mesenchymal stem cells: a prerequisite for cell therapy // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015. doi: 10.1155/2015/632902

12. Levit R. D., Landazuri N., Phelps E. A. et al. Cellular encapsulation enhances cardiac repair // *J. Am. Heart Assoc.* 2013. Vol. 2. № 5.

13. Lim F., Sun A. M. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas // *Science*. 1980. Vol. 210. № 4472. P. 908–910.

14. Liu B., Duan C. Y., Luo C. F. Effectiveness and safety of selected bone marrow stem cells on left ventricular function in patients with acute myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled trials // *Int. J. Cardiol.* 2014. Vol. 177. № 3. P. 764–770.

15. Mozaffarian D., Benjamin E. J., Go A. S. et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association // *Circulation*. 2015.

16. Peng L., Jia Z., Yin X. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue // *Stem Cells Dev.* 2008. Vol. 17. № 4. P. 761–773.

17. Shoichet M. S., Li R. H., White M. L. et al. Stability of hydrogels used in cell encapsulation: An in vitro comparison of alginate and agarose // *Biotechnol Bioeng.* 1996. Vol. 50. № 4. P. 374–381.

18. Tai I. T., Sun A. M. Microencapsulation of recombinant cells: a new delivery system for gene therapy // *FASEB J.* 1993. Vol. 7. № 11. P. 1061–1069.

Karpov A. A.<sup>1,2</sup>, Puzanov M. V.<sup>1</sup>, Almukhametova F. R.<sup>2</sup>, Ukin A. A.<sup>2</sup>, Lomakina A. M.<sup>2</sup>, Cherepanov D. E.<sup>2</sup>, Ivkin D. Y.<sup>3</sup>, Vaulina D. D.<sup>4</sup>, Eyvazova Sh. D.<sup>1</sup>, Moiseeva O. M.<sup>1</sup>, Galagudza M. M.<sup>1,2</sup>

## Microencapsulation of mesenchymal stem cells as a tool for studying the mechanisms of stem cell therapy of myocardial infarction

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov Medical Research Centre  
194156, Russian Federation, Saint-Petersburg, Parhomenko street, 15B

<sup>2</sup> Academician I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University  
197022, Russian Federation, Saint-Petersburg, Lev Tolstoy street 6/8

<sup>3</sup> St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy  
197022, Russian Federation, Saint-Petersburg, Professor Popov street, 14

<sup>4</sup> N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences  
197376, Russian Federation, Saint-Petersburg, Academician Pavlov street, 9  
e-mail: karpovmed@gmail.com

### Abstract

**Introduction.** Potential mechanisms of cell therapy benefit in myocardial ischemia include direct differentiation of stem cells into myocardial cells, stimulation of angiogenesis and differentiation of resident stem cells by paracrine factors secreted by autologous or allogeneic stem cells after intramyocardial injection. Dissection of the exact role of these mechanisms in the net effect of cell therapy can be aided by use of stem cell microencapsulation.

**Purpose.** This work was aimed at: (i) evaluation of mesenchymal stem cells (MSC) viability and function after encapsulation *in vitro* and (ii) *in vivo* safety assessment of microencapsulated mesenchymal stem cells after intramyocardial transplantation.

**Methods.** In order to encapsulate MSC from the rat bone marrow, the magneto-mechanical encapsulator was used. Sodium alginate in combination with a variety of coordinating agents (2,2 % BaCl<sub>2</sub>, 1,2 % BaCl<sub>2</sub>, and 1,5 % CaCl<sub>2</sub>) was used as polymer for capsule formation. Stability assessment of capsules was made by incubation in phosphate buffer. The viability of encapsulated cells was evaluated *in vitro* by fluorescent staining by LIVE/DEAD Kit. Safety assessment of the intramyocardial transplantation of microencapsulated MSC was made in male Wistar rats weighing 225±25 g. Severity of systemic inflammation was assessed by leukocyte count in peripheral blood. Morphological and functional parameters of the heart were evaluated by echocardiography 5 days after transplantation.

**Results.** In the result of this study standardized capsules were designed. The average diameter of the capsules was 225±25 µm. Capsule stabilization in 2,2 % barium chloride solution resulted in best stability (CaCl<sub>2</sub>: swelling – 1 day, complete destruction – 5 days; BaCl<sub>2</sub>: swelling – 14 days, complete destruction – more than 21 days), and viability of encapsulated cells (CaCl<sub>2</sub>: after 30 min – 48±4 %, after 5 days – 18±2 %; BaCl<sub>2</sub>: after 30 min – 63±6 %, after 5 days – 71±5 %). Intramyocardial injection of microcapsules had no effect on leukocyte count and morphofunctional parameters of the heart in comparison with control solution.

**Conclusion.** The technique of MSC microencapsulation was designed with subsequent intramyocardial transplantation. Microencapsulation of MSC can be used to assess the role of paracrine factors in the mechanism of action of cell therapy on myocardial remodeling. Microencapsulation technique can also be used to protect stem cells from the effects of the host immune system and increase their survival early after intramyocardial transplantation.

**Keywords:** microcapsules, alginate, mesenchymal stem cells

### References

1. Karpov A. A., Ivkin D. U., Dracheva A. V. et al. Modelirovanie postinfarktnoj serdechnoj nedostatochnosti putem okklyuzii levoj koronarnoj arterii u krysa: Tekhnika i metody morfofunkcionalnoj ocenki // *Biomedicina*. 2014. Vol. 1. № 3. P. 32-48.

2. Karpov A. A., Uspenskay U. K., Vaulina D. D. Rol mezenhimnykh stvolovykh kletok v terapii ishemicheskogo povrezhdeniya serdca // *Translyacionnaya medicina*. 2012. Vol. 5. № 16. P. 30-37.

3. Afzal M. R., Samanta A., Shah Z. I. et al. Adult Bone Marrow Cell Therapy for Ischemic Heart Disease: Evidence and Insights From Randomized Controlled Trials // *Circ. Res.* 2015. Vol. 117. № 6. P. 558-575. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.304792

4. Alpert J. S., Thygesen K., Antman E. et al. Myocardial infarction redefined a consensus document of The Joint Euro-

pean Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000. Vol. 36. № 3. P. 959-969.

5. Duke R. C., Witter R. Z., Nash P. B. et al. Cytolysis mediated by ionophores and pore-forming agents: role of intracellular calcium in apoptosis // *FASEB J.* 1994. Vol. 8. № 2. P. 237-246.

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

7. Gnechchi M., Danielli P., Cervio E. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease // *Vascul. Pharmacol.* 2012. Vol. 57. № 1. P. 48-55.

8. de Jong R., Houtgraaf J. H., Samiei S. et al. Intracoronary stem cell infusion after acute myocardial infarction: a meta-analysis and update on clinical trials // *Circ. Cardiovasc. Interv.* 2014. Vol. 7. № 2. P. 156-167.

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ)

9. Karpov A. A., Drahova A. V., Buslova D. V. et al. *Modification of Mesenchymal Stem Cells as a Way to Improve the Effectiveness of Cell Therapy of Ischemic Myocardial Injury* // *Russ. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova*. 2015. Vol. 101. № 9. P. 985-998.
10. Karpov A. A., Uspenskaya Y. K., Minasian S. M. et al. *The effect of bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation on myocardial remodelling in the rat model of ischaemic heart failure* // *Int. J. Exp. Pathol.* 2013. Vol. 94. № 3. P. 169-177.
11. Lee S., Choi E., Cha M. J. et al. *Cell adhesion and long-term survival of transplanted mesenchymal stem cells: a prerequisite for cell therapy* // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015. doi: 10.1155/2015/632902
12. Levit R. D., Landazuri N., Phelps E. A. et al. *Cellular encapsulation enhances cardiac repair* // *J. Am. Heart Assoc.* 2013. Vol. 2. № 5.
13. Lim F., Sun A. M. *Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas* // *Science*. 1980. Vol. 210. № 4472. P. 908-910.
14. Liu B., Duan C. Y., Luo C. F. *Effectiveness and safety of selected bone marrow stem cells on left ventricular function in patients with acute myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled trials* // *Int. J. Cardiol.* 2014. Vol. 177. № 3. P. 764-770.
15. Mozaffarian D., Benjamin E. J., Go A. S. et al. *Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association* // *Circulation*. 2015.
16. Peng L., Jia Z., Yin X. et al. *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue* // *Stem Cells Dev.* 2008. Vol. 17. № 4. P. 761-773.
17. Shoichet M. S., Li R. H., White M. L. et al. *Stability of hydrogels used in cell encapsulation: An in vitro comparison of alginate and agarose* // *Biotechnol Bioeng.* 1996. Vol. 50. № 4. P. 374-381.
18. Tai I. T., Sun A. M. *Microencapsulation of recombinant cells: a new delivery system for gene therapy* // *FASEB J.* 1993. Vol. 7. № 11. P. 1061-1069.