

МАЛАШИЧЕВА А. Б.^{1, 2}, САБИРОВА А.А.¹,
КОЗЫРЕВ И. А.¹, ГОЛОВКИН А. С.¹,
ХУДЯКОВ А. А.^{1, 3}, КОСТАРЕВА А. А.¹

Сравнительная характеристика стволовых клеток сердца, полученных из миокарда детей и взрослых

¹ Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр, 197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

² Санкт-Петербургский Государственный университет, 199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

³ Институт цитологии РАН 194064, Россия, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
e-mail: amalashicheva@gmail.com

Реферат

Стволовые клетки миокарда человека являются перспективным источником для клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний и являются предметом активного изучения. Тем не менее стволовые клетки миокарда детей являются практически неизученными. Целью работы было получение стволовых клеток миокарда из небольших (1–3 мм) образцов тканей от пациентов детского возраста, характеристика этих клеток, сравнение их со стволовыми клетками миокарда взрослого в отношении их пролиферативного и дифференцировочного потенциала.

Из образцов детского миокарда, полученных в ходе коррекции врожденных пороков сердца, путем ферментативной диссоциации ткани получали линии пролиферирующих клеток; проводили их фенотипирование при помощи проточной цитометрии, методов полук количественной и количественной полимеразной цепной реакции; оценку их пролиферативного и дифференцировочного потенциала при помощи индукции дифференцировки в кардиогенном, направлениях. Было получено пять линий стволовых клеток сердца. Полученные линии интенсивно пролиферировали, экспрессировали маркеры кардиогенного происхождения и имели потенциал к дифференцировке в нескольких направлениях. Полученные клетки были сходны по характеристикам с описанными ранее клетками, получаемыми из миокарда взрослого человека.

Результаты проведенного исследования указывают на то, что существует возможность получения линий клеток из небольших образцов ткани детского миокарда, остающихся в ходе операций по коррекции врожденных пороков сердца. Эти клетки представляют собой гетерогенную популяцию, имеющую мультипотентные свойства, имеют фенотипические характеристики, сходные с клетками, получаемыми из миокарда взрослого, высокий регенеративный потенциал, способность к кардиогенной дифференцировке.

Ключевые слова: стволовые клетки, кардиомиоциты, миокард.

Введение

Возможности терапии сердечно-сосудистых заболеваний при помощи стволовых клеток различного происхождения в настоящее время являются предметом интенсивных исследований и нескольких клинических испытаний [3, 6, 9, 10]. Основной группой для клинических испытаний являются пациенты с ишемическим поражением миокарда, а источником клеток для терапии являются главным образом мезенхимные стволовые клетки костно-мозгового происхождения (КМ–МСК). Несмотря на неоднозначные результаты, полученные в клинических испытаниях, в настоящее время признается важность дальнейшего развития и исследования возможностей клеточной терапии КМ–МСК при терапии инфаркта миокарда [9]. Однако, помимо постинфарктной терапии, существует огромная потребность в развитии подходов клеточной терапии и для других сердечно-сосудистых заболеваний, в числе которых врожденные

пороки сердца. Первые попытки применения клеточной терапии с использованием КМ–МСК у детей с врожденной кардиомиопатией описаны недавно [5]. Пациентам с врожденными пороками сердца требуется проведение раннего и сложного хирургического вмешательства для коррекции дефекта. Как правило, проводятся этапные вмешательства, направленные на подготовку миокарда, его ремоделирование и активацию компенсаторных возможностей. В таких случаях представляется важной возможность клеточной терапии.

В качестве перспективного источника клеточной терапии, помимо КМ–МСК, рассматривают так называемые резидентные прогениторные клетки миокарда, или стволовые клетки сердца (СКС) [6]. Однако в настоящее время не существует единого маркера или их комбинации для определения этой популяции клеток.

Впервые стволовые клетки сердца (CSC — cardiac stem cells) были получены и охарактеризованы в 2003 г. [4]. Эти клетки несли поверхностный тирозинкиназный рецептор c-kit. В сердце эта популяция составляет 1:30 000 от общей популяции кардиомиоцитов. В c-kit⁺-клетках экспрессируются специфичные для кардиомиоцитарной линии дифференцировки гены NKX2.5 и GATA4, при этом отсутствует экспрессия генов, кодирующих саркомерные белки. Все это указывает на наличие у этих клеток признаков кардиомиоцитарной линии и в то же время на незрелость этих клеток. В условиях *in vivo* c-kit⁺-СПС могут дифференцироваться в эндотелиальные клетки, фибробласты, гладкомышечные клетки (ГМК) и кардиомиоцитоподобные клетки [4]. Описаны и другие маркеры резидентных стволовых клеток миокарда человека, такие как Sca-1, Islet-1, SSEA-1. Показано, что клетки, выделенные из миокарда и не-сущие один из этих маркеров, способны к некоторой дифференцировке в направлении кардиомиоцитов [6, 7, 9, 10, 14, 15].

Из эндокарда человека была выделена популяция, которая получила название CDS-(Cardioshere)-клетки [8, 16]. Они представляют собой гетерогенную популяцию, состоящую из недифференцированных клеток, экспрессирующих Sca-1, CD105, CD90 (Thy1), CD29 (b1-интегрин), а также маркеры мезенхимных стромальных клеток (МСК). Примерно 20 % клеток являются C-kit⁺. CDS человека и мыши способны при выведении в культуру к дифференцировке в кардиомиоцитарном, гладкомышечном и эндотелиальном направлениях [8].

Таким образом, описано несколько популяций клеток, которые могут потенциально являться предшественниками кардиомиоцитов и, по-видимому, участвовать в репаративных процессах, однако единого мнения о природе данных клеток не существует. Ясно, что все эти так называемые резидентные стволовые клетки, или СКС, имеют отличительные признаки, описанные в настоящее время в мировой литературе:

- 1) отсутствие терминальной дифференцировки;
- 2) способность к неограниченному делению;
- 3) способность к симметричному делению с воспроизведением двух идентичных клеток для поддержания стволовой ниши сердца, либо с уходом одной из дочерних клеток в терминальную дифференцировку.

Признание того, что СКС регулируют сердечный гомеостаз и имеют регенеративный потенциал, привело к разработке подходов клеточной терапии для регенерации поврежденных тканей сердца с использованием этих клеток [10, 12].

В последнее время интерес исследователей привлекают СКС неонатального происхождения как потенциальный источник терапии врожденных пороков сердца. Неонатальные СКС имеют несколько большую пластичность, по сравнению с СПС, выделенными из миокарда взрослого, однако исследования свойств этих клеток находятся еще в самой начальной стадии [17].

Ранее нами была показана возможность выделения популяции СПС-клеток из миокарда взрослого

человека. Эти клетки имеют высокий пролиферативный потенциал и способность поддержания в культуре, а также способность к дифференцировке в кардиомиоцитарном направлении [1, 2].

В целом в последние годы наблюдается всплеск интереса к СКС именно в связи с возможностями их использования при коррекции ВПС [17]. В связи с этим очевидно, что возможность получения и изучения этих клеток именно от пациентов детского возраста является чрезвычайно актуальной и требует продолжения исследований. Следует также упомянуть, что получение СПС от пациентов с ВПС важно для моделирования и изучения патогенетических процессов, потенциально ответственных за возникновение ВПС.

Целью работы было провести сравнительную оценку характеристик стволовых клеток сердца, полученных из миокарда взрослых и из детского миокарда.

Материал и методы исследования

Материалы от взрослых пациентов были получены из донорского сердца при трансплантации в ФГБУ СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова (Санкт-Петербург, Россия).

Материалы от пациентов детского возраста получали при операциях по коррекции ВПС — тетрады Фалло и дефекта межжелудочковой перегородки (ДМЖП).

Клетки выделяли по описанному ранее протоколу [18] с модификациями [1]; клетки получали из фрагмента ткани миокарда, полученного в ходе коррекции врожденных пороков сердца у детей, размер фрагмента составлял 1–5 мм³; либо из фрагмента левого предсердия донора при трансплантации, размер фрагмента составлял до 1 см³. Дифференцировку СКС проводили, как это описано ранее [2].

Анализ на проточном цитометре

Клетки окрашивали антителами, конъюгированными с флуорохромом против соответствующего поверхностного маркера (CD33, CD45, CD117, CD90, CD105, CD73, CD146, CD56, BD, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Анализ проводили на проточном лазерном цитометре Guava EasyCyte6 (Millipore, США) по стандартной методике с построением логарифмических шкал по прямому и боковому светорассеянию. Анализ проводили после достижения порогового значения целевых событий в 7000. Математический анализ и построение графиков проводили в программе «Kaluza™ v.1.2» (Beckman Coulter, USA).

Иммуноцитохимическое окрашивание

Клетки фиксировали 4 %-м параформальдегидом на предметных стеклах, окрашивали антителами против α-актина (1:200), тропонина I (1:200) (SantaCruz, США) и вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом (Alexa Fluor 488, Invitrogen, США). Препараты анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Observer.D1 (Carl Zeiss, Германия).

Анализ экспрессии генов

РНК выделяли набором реактивов ExtractRNA

Последовательность праймеров, использовавшихся для амплификации маркеров

Таблица 1

Маркер	Прямой праймер (5'–3')	Обратный праймер (5'–3')
<i>Праймеры для эндогенного контроля на ПЦР в реальном времени</i>		
GAPDH	AATGAAGGGGTCATTGATGG	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA
<i>Праймеры для эндогенного контроля на полуколичественную ПЦР</i>		
GAPDH	CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG	GTCCACCACCCCTGTTGCTGTAG
<i>Праймеры на гены кардиогенной дифференцировки на полуколичественную ПЦР</i>		
MEF2C	GAACAATCCCGGTGTGTCAGGA	CACCCAGTGGCAGCCTTTTACA
GATA-4	GACGGGTCACCTATCTGTGCAAC	AGACATCGCACTGACTGAGAAC
Nkx2.5	GGCCTCAATCCCTACGGTTA	CACGAGAGTCAGGGAGCTGT
тропонинТ	GGCAGCGGA GGATGCTGAA	GAGGCACCAAGTTGGGCATGAACGA
<i>Праймеры на гены кардиогенной дифференцировки на ПЦР в реальном времени</i>		
тропонинТ	TTCGACCTGCAGGAGAAGTT	GCGGGTCTTGGAGACTTTCT

(Евроген, Россия). Обратную транскрипцию РНК производили согласно рекомендациям производителя (Евроген). Для проведения полуколичественной ПЦР амплификацию проводили в установке Applied Biosystems (США) по следующей схеме: 95°C — 30с, затем повторяли 35 циклов (95°C — 30 с, далее 30 с GAPDH при 58°C, MEF2C при 62°C, Nkx 2.5b при 58°C, GATA4 при 62°C и 72°C — 40 с) и 72°C — 2 мин. Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

ПЦР в реальном времени осуществляли при помощи смеси qPCRmix-HSSYBR+ROX (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя. Амплификацию проводили на установке 7500 Real-TimePCRSytem (LifeTechnologies, США).

Для анализа данных в качестве метода представления относительной экспрессии гена использовали сравнительный Ct метод (2-ΔΔCT-метод). Уровень экспрессии исследуемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства GAPDH.

Результаты исследования

Клетки, полученные из биопсийного материала детского миокарда, проходили более 20 пассажей в культуре, имели клоногенные свойства и высокий

пролиферативный потенциал. Результаты фенотипирования клеток представлены на рис. 1. Различий в уровне экспрессии поверхностных маркеров на клетках, полученных из миокарда детей с врожденными пороками сердца и взрослых, выявлено не было.

В полученных культурах клеток детей индуцировали кардиогенную дифференцировку. Спустя 24 дня после запуска наблюдали морфологические изменения клеток, но спонтанных сокращений отмечено не было. Для подтверждения кардиогенного направления дифференцировки анализировали экспрессию специфических маркеров при помощи нескольких методов.

В дифференцированных клетках визуализировали саркомерные белки тропонин I и α-актинин (рис. 2) посредством иммуоцитохимического окрашивания. При помощи полуколичественной ПЦР детектировали повышение экспрессии тропонина Т и MEF2C (рис. 3). Небольшая экспрессия MEF2C выявлялась и в недифференцированных клетках. О кардиомиоцитарной природе полученных из миокарда клонов свидетельствует экспрессия маркера GATA4 (рис. 3) в недифференцированных и дифференцированных клетках. Однако специфические маркеры кардиомиоцитов, такие как сердечный актин, десмин и тяжелые цепи миозина, в клетках выявить не удалось.

Клиническая характеристика пациентов, от которых были получены СПС

Таблица 2

Возраст	Диагноз	Участок
6,5 года	ВПС. Дефект межжелудочковой перегородки, открытое овальное окно	Миокард правого предсердия
5 мес.	ВПС. Тетрада Фалло	Миокард выносящего тракта правого желудочка
1,5 мес.	ВПС. Дефект межжелудочковой перегородки, открытое овальное окно	Миокард правого предсердия
5 мес.	ВПС. Дефект межжелудочковой перегородки, открытое овальное окно	Миокард правого предсердия
5 мес.	ВПС. Тетрада Фалло	Миокард выносящего тракта правого желудочка

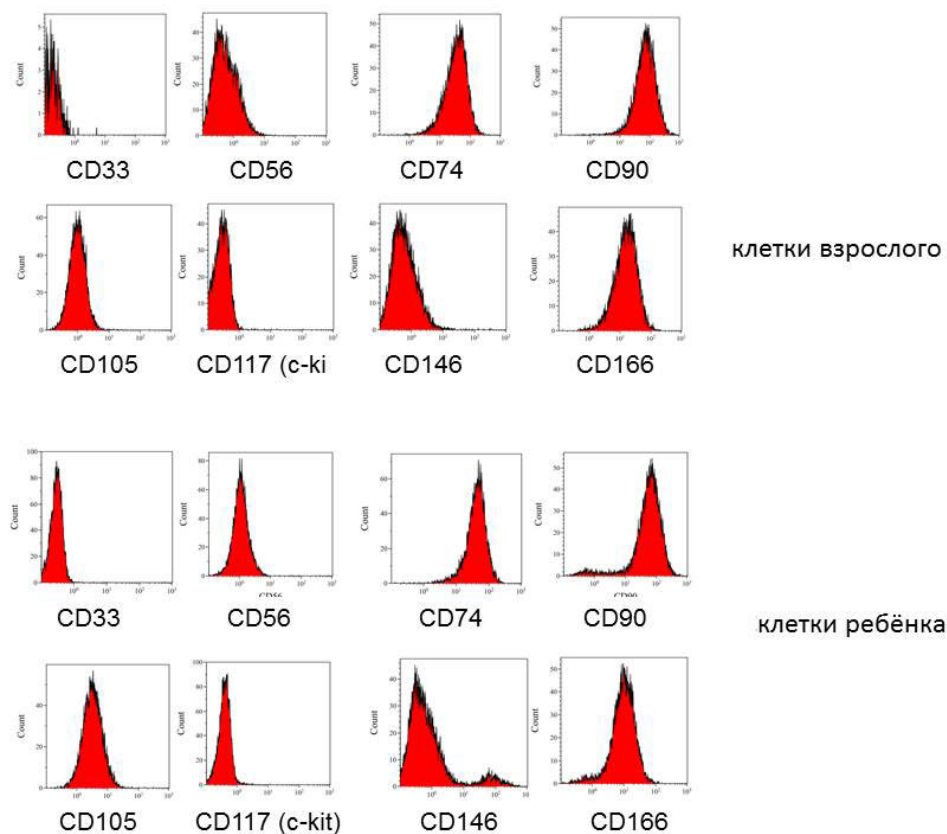


Рис. 1. Экспрессия поверхностных маркеров, оцененная методом проточной цитометрии в популяциях СПС, полученных из образца ткани миокарда взрослого (вверху), и в популяциях СПС, полученных из постоперационного фрагмента ткани миокарда ребенка (внизу). На гистограммах: по вертикали — число клеток, по горизонтали — интенсивность флуоресценции

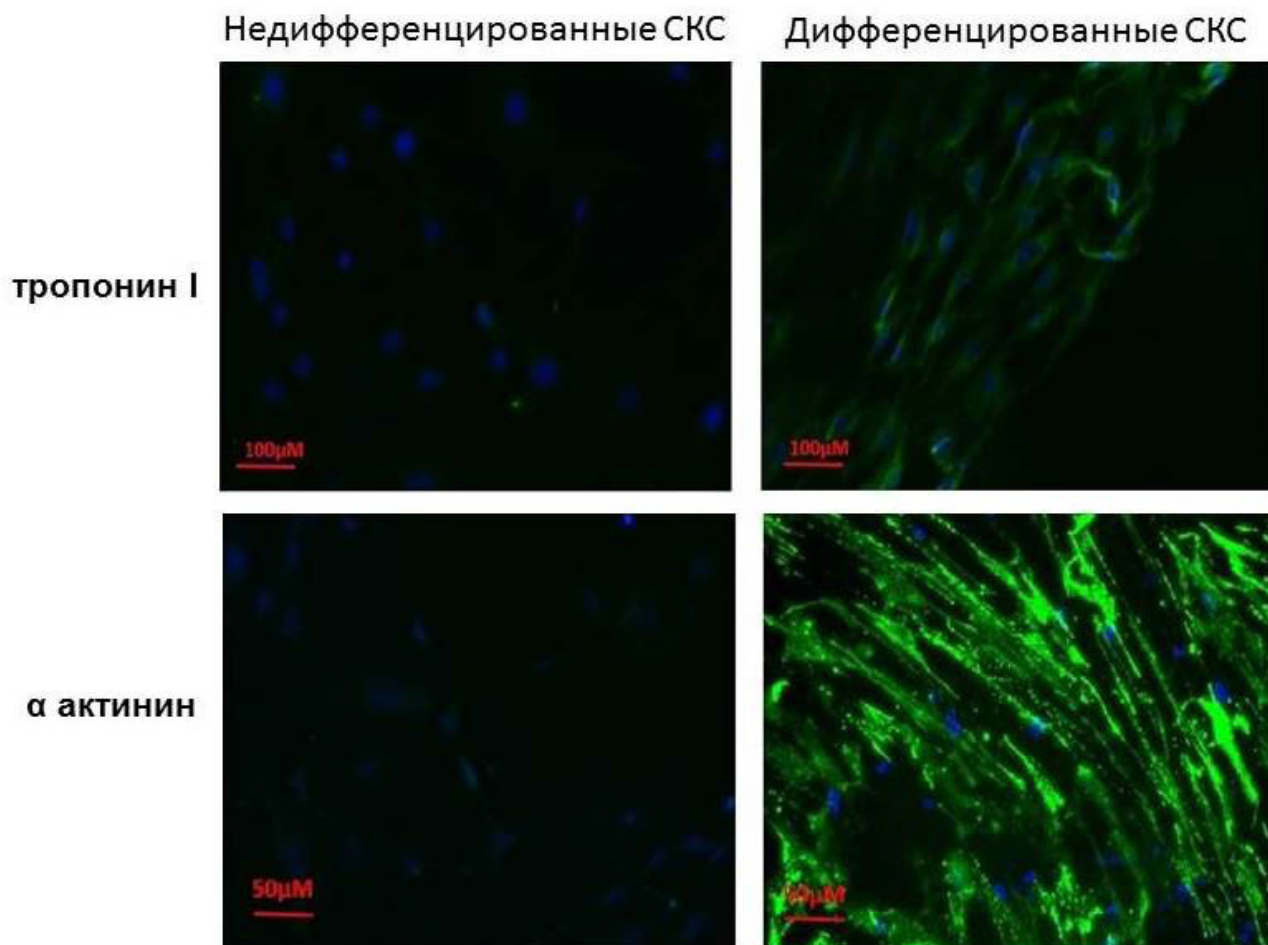


Рис. 2. Иммуноцитохимическая окраска недифференцированных и дифференцированных детских СПС на маркеры кардиомиоцитов: тропонин Т и α-актинин (зеленый цвет). Визуализация ядер DAPI (синий цвет)

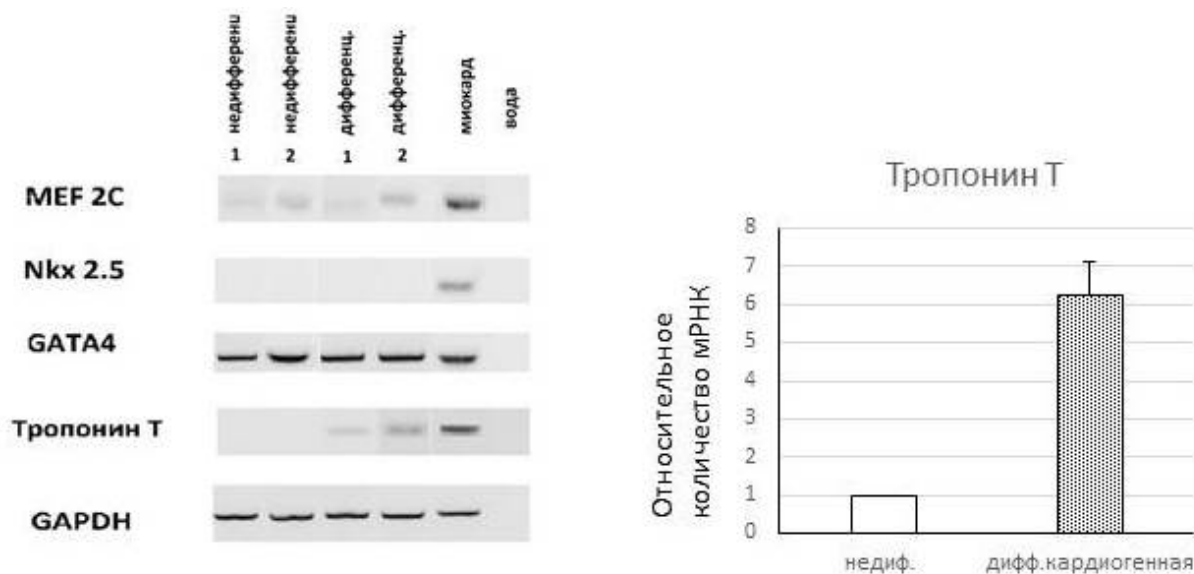


Рис. 3. Сравнение маркеров кардиогенной дифференцировки (MEF2C, Nkx2.5, GATA4, тропонин Т) на уровне мРНК (полуколичественная ПЦР) в недифференцированных СПС и в индуцированных к кардиогенной дифференцировке — А. По горизонтали: 1, 2 — две линии клеток, полученных от разных пациентов. Сравнение экспрессии маркера кардиогенной дифференцировки тропонина Т в недифференцированных и дифференцированных СПС методом количественной ПЦР, n=2 — Б. По вертикали — относительный уровень мРНК соответствующего маркера. Вертикальными отрезками обозначены величины ошибки среднего. Уровень экспрессии нормировался на соответствующий уровень в недифференцированных клетках

Обсуждение результатов

В представленной работе из фрагментов биопсийного материала детского миокарда были получены популяции клеток, имеющие характеристики стволовых, описанных ранее нами и другими авторами [2, 16] для взрослого миокарда.

Полученные клетки способны к активной пролиферации, несут фенотипические маркеры, характерные для описанных ранее популяций стволовых клеток, и маркеры кардиогенной линии; кроме того, они способны к дифференцировке в кардиогенном направлении с экспрессией ряда специфичных для кардиомиоцитов маркеров.

Несмотря на многообещающие результаты, полученные в последние годы разными группами исследователей, по-прежнему существует скептическое отношение к использованию стволовых клеток сердца в качестве потенциального средства терапии.

Одним из поводов для скептицизма является недостаточное доказательство того, что эндогенные или экзогенные резидентные СКС дифференцируются в соответствующее количество зрелых функциональных кардиомиоцитов [13].

Дифференцировка полученных нами клеток приводила к видимым изменениям в популяции, однако из функциональных белков кардиомиоцитов определялись лишь α -актинин и тропонин I, в то время как другие белки (сердечный актин и тяжелые цепи миозина), характерные для функциональных кардиомиоцитов, выявить не удалось.

Таким образом, можно говорить, скорее, о получении популяции клеток, подобных кардиомиоцитам. Эти результаты согласуются с опубликованными нами и другими авторами данными о том, что СКС имеют недостаточный потенциал для регенерации миокарда при его повреждении [2, 11]. На основании сравнительной оценки фенотипа, экспрессии кардиомиоцитарных маркеров (MEF2C, GATA4, Nkx2.5) стволовых клеток сердца, полученных из миокарда детей и от взрослых доноров, установлено отсутствие значимых различий между получаемыми клетками. По пролиферативному и дифференцировочному потенциалу клетки, в зависимости от источника материала, не различались.

Данные последних клинических исследований говорят о том, что введение аутологичных СПС пациентам с таким врожденным пороком, как гипоплазия левого желудочка, приводит к значимому повышению фракции выброса и указывает на вероятный терапевтический эффект этих клеток [12].

Наши данные, а также данные других авторов показывают возможность и относительную легкость получения таких клеток. Мы полагаем, что проведенное нами исследование послужит основанием для проведения последующих исследований, посвященных возможности использования СКС, в том числе и детских, в исследованиях, посвященных врожденным порокам сердца, а также в исследовании терапевтического потенциала СКС при клеточной терапии различных сердечно-сосудистых заболеваний.

Литература

1. Худяков А. А., Курапеев Д. И., Костарева А. А., Малашичева А. Б. Сравнение эффективности методов получения функционально активных кардиомиоцитов человека // *Гены и клетки*. 2013. Т. 8. № 2. С. 47–55.
2. Худяков А. А., Курапеев Д. И., Костарева А. А., Малашичева А. Б. Получение предшественников кардиомиоцитов человека из ткани миокарда // *Трансляцион. мед.* 2013. № 1. С. 17–20.
3. Головкин А. С., Великанова Е. А., Матвеева В. Г. и др. Динамика сывороточного уровня ростовых факторов при терапии инфаркта миокарда стволовыми мезенхимальными клетками в эксперименте // *Гены и клетки*. 2011. Т. 6. № 2. С. 43–47.
4. Beltrami A., Barlucchi L., Torella D. et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration // *Cell*. 2003. Vol. 114. P. 763–776. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00687-1.
5. Bergman I., Lacis A., Lubau I. et al. Follow-up of the patients after stem cell transplantation for pediatric dilated cardiomyopathy // *Pediatr Transplant*. 2013. Vol. 17. № 3. P. 266–270. doi: 10.1111/petr.12055.
6. Bollini, S., Smart, N., Riley, P. R. X Resident cardiac progenitor cells: At the heart of regeneration // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2009. Vol. 50. № 2. P. 296–303. URL: <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc> (дата обращения 07.06.2010).
7. Chen W., Baily J., Corselli M., Díaz M. et al. Human myocardial pericytes: multipotent mesodermal precursors exhibiting cardiac specificity // *Stem. Cells*. 2015. Vol. 33. № 2. P. 557–573. doi: 10.1002/stem.1868.
8. Davis D., Zhang Y., Smith, R et al. Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue // *PLoS ONE*. 2009. Vol. 4. № 9. URL: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0007195>
9. Delewi R., van der Laan A., Robbers L., Hirsch A. Long term outcome after mononuclear bone marrow or peripheral blood cells infusion after myocardial infarction // *Heart*. 2015. Vol. 101. № 5. P. 363–368. doi: 10.1136/heartjnl-2014-305892.
10. Goichberg P., Chang J., Liao R., Leri A. Cardiac stem cells: biology and clinical applications // *Antioxid Redox Signal*. 2014. Vol. 21. № 14. P. 2002–2017. doi: 10.1089/ars.2014.5875.
11. Gude, N., Joyo, E., Toko, H. et al. Notch activation enhances lineage commitment and protective signaling in cardiac progenitor cells // *Basic Research in Cardiology*. 2015. Vol. 110. P. 29. URL: <http://doi.org/10.1007/s00395-015-0488-3>.
12. Ishigami S., Ohtsuki S., Tarui S. et al. Intracoronary autologous cardiac progenitor cell transfer in patients with hypoplastic left heart syndrome: the TICAP prospective phase I controlled trial // *Circ Res*. 2015. Vol. 116. № 4. P. 653–664. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304671.
13. Kawaguchi N., Nakanishi T. Cardiomyocyte regeneration // *Cells*. № 2. P. 67–82. URL: <http://doi.org/10.3390/cells2010067>.
14. Keith M., Bolli R. “String Theory” of c-kitpos Cardiac Cells: A New Paradigm Regarding the Nature of These Cells That May Reconcile Apparently Discrepant Results // *Circulation Research*. 2015. Vol. 116. P. 1216–1230. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305557>.
15. Koudstaal S., Jansen Of Lorkeers S., Gaetan R. Concise review: heart regeneration and the role of cardiac stem cells // *Stem. Cells Transl. Med*. 2013. Vol. 2. № 6. P. 434–443.
16. Li T. S., Cheng K., Lee S. T. et al. Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair // *Stem Cells*. 2010. Vol. 28. № 11/ P. 2088–2098.
17. Peral S., Burkhardt H., Nelson T. Utilization of stem cells to treat congenital heart disease: hype and hope // *Curr Opin Pediatr*. 2014. Vol. 26. № 5. P. 553–560. URL: doi: 10.1097/MOP.0000000000000138.
18. Smits A. M., van Vliet P., Metz et al. Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology // *Nature Protocols*. 2009 Vol. 4. P. 232–243. URL: <http://doi.org/10.1038/nprot.2008.229>.

UDK 611.018.63–0.53

Malashicheva A. B.^{1, 2}, Sabirova A. A.², Kozyrev I. A.¹, Golovkin A. S.¹, Hudiakov A. A.^{1, 3}, Kostareva A. A.¹

Myocardial progenitor cells as an option for cell therapy for congenital heart disease

¹ Federal North-West Medical Research Centre, 197341, Akkuratova str. 2, St. Petersburg, Russia.

² Saint-Petersburg State University, 199034, Universitetskaya nab., 7-9, St. Petersburg, Russia

³ Institute of Cytology Russian Academy of Science, 194064, Tikhoretsky ave. 4, St-Petersburg, Russia.

e-mail: amalashicheva@gmail.com

Abstract

Myocardial progenitor cells represent a perspective source for cell therapy of cardiovascular disorders and are intensively studied. However, mainly the cells from adult patients are studied whereas the cells derived from children with congenital heart diseases remained poorly investigated. The aim of the present work was to obtain progenitor cells from intraoperatively obtained cardiac tissue from infants and children undergoing repair of congenital cardiac defects. Following isolation, the cells gave rise to a clonogenic, highly proliferative spindle-shaped cell population. The

cells expressed markers of cardiogenic origin and were shown to differentiate towards cardiogenic lineage. This resident myocardial progenitor cells obtained from infant myocardial tissue demonstrate similar characteristics to previously described cells derived from adult myocardial tissue. This study confirms the possibility of obtaining a pool of progenitor cells from tiny tissue fragments and opens a new perspective of using these cells in regenerative medicine and further research of congenital heart disease pathogenesis.

Keywords: progenitor cells, cardiomyocytes, myocardium.

References

1. Hudjakov A.A., Kurapeev D.I., Kostareva A.A., Malashicheva A.B. *Sravnienie jeffektivnosti metodov poluchenija funkcional'no aktivnyh kardiomiocitov cheloveka* [Comparison of methods efficiency in obtaining human functionally active cardiomyocytes] // *Geny i kletki* [Genes and cells]. 2013. V. 8. N. 2. P. 47-55. [In Russian].
2. Hudjakov A.A., Kurapeev D.I., Kostareva A.A., Malashicheva A.B. *Poluchenie predshestvennikov kardiomiocitov cheloveka iz tkani miokarda* [Cardiomyocytes precursors obtaining procedure from human myocardium tissue] // *Transljacionnaja medicina* [Transmitting medicine]. 2013. N. 1. P. 17-20. [In Russian].
3. Golovkin A.S., Velikanova E.A., Matveeva V.G., Savel'eva E.A., Ereemeev A.V., Sheina Ju.I., Svetlakov A.V. *Dinamika syvorotochnogo urovnya rostovykh faktorov pri terapii infarkta miokarda stvolovymi mezenhimal'nymi kletkami v jeksperimente* [Dynamics of serum level growth factors at therapy of myocardial infarction by stem mesenchymal cells in experiment] // *Geny i kletki* [Genes and cells]. 2011. V. 6. N. 2. P. 43-47. [In Russian].
4. Beltrami A., Barlucchi L., Torella D. et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration // *Cell*. 2003. V. 114. P. 763-776.
5. Bergmane I., Lacis A., Lubaua I., Jakobsons E., Erglis A. Follow-up of the patients after stem cell transplantation for pediatric dilated cardiomyopathy. *Pediatr Transplant*. 2013. V. 17. N. 3. P.266-270.
6. Bollini S., Smart N., Riley P. R. X Resident cardiac progenitor cells: At the heart of regeneration // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2009. V. 50. N. 2. P. 296-303.
7. Chen W., Baily J., Corselli M., Díaz M., et al. Human myocardial pericytes: multipotent mesodermal precursors exhibiting cardiac specificity // *Stem Cells*. 2015. V. 33. N. 2. P. 557-573.
8. Davis D., Zhang Y., Smith R. et al. Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue // *PLoS ONE*. 2009. V. 4. N. 9.
9. Delewi R., van der Laan A., Robbers L., Hirsch A. Long term outcome after mononuclear bone marrow or peripheral blood cells infusion after myocardial infarction // *Heart*. 2015. V.101. N.5. P.363-368.
10. Goichberg P., Chang J., Liao R., Leri A. Cardiac stem cells: biology and clinical applications // *Antioxid Redox Signal*. 2014. V. 21. N.14. P. 2002-2017.
11. Gude N., Joyo E., Toko H. et al. Notch activation enhances lineage commitment and protective signaling in cardiac progenitor cells // *Basic Research in Cardiology*. 2015.V. 110. P. 29.
12. Ishigami S., Ohtsuki S., Tarui S., Ousaka D. et al. Intracoronary autologous cardiac progenitor cell transfer in patients with hypoplastic left heart syndrome: the TICAP prospective phase 1 controlled trial // *Circ Res*. 2015. V. 116. N. 4. P. 653-664.
13. Kawaguchi N., Nakanishi T. Cardiomyocyte regeneration // *Cells*. V.2. P.67-82.
14. Keith M., Bolli R. "String Theory" of c-kitpos Cardiac Cells: A New Paradigm Regarding the Nature of These Cells That May Reconcile Apparently Discrepant Results // *Circulation Research* 2015. V.116. P. 1216-1230.
15. Koudstaal S., Jansen Lorkeers S., Gaetan R. Concise review: heart regeneration and the role of cardiac stem cells // *Stem Cells Transl Med*. 2013. V. 2. N.6. P. 434-43.
16. Li T.S., Cheng K., Lee S.T., et al. Cardiospheres recapitulate a niche like microenvironment rich in stemness and cell matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair // *Stem Cells*. 2010. V. 28. N. 11. P. 2088-2098.
17. Peral S., Burkhart H., Nelson T. Utilization of stem cells to treat congenital heart disease: hype and hope // *Curr Opin Pediatr*. 2014. V. 26. N. 5. P. 553-560.
18. Smits A. M., van Vliet P., Metz et al. Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology // *Nature Protocols*. 2009. V. 4. P. 232-243.