Материал поступил в редакцию: 30-07-2015
Материал принят к печати: 21-10-2015
УДК: 616.1; 616-089.843

Systemic administration of autologous mononuclear precultured bone marrow stem cells in heart failure

Aliya Dzholdasbekova, Galina Fedotovskikh, Manarbek Askarov, Bayan Komsabakova, Ainur Baigenzhina, Argul Kairatova, Gulden Abylkassymova
«National Scientific Medical Research Center» JSC, Astana, Kazakhstan

The Objective of Research: Heart failure (HF) is the major cause of death worldwide. Despite the available pharmacotherapy, prognosis is usually harsh. Here we assessed the safety and efficacy of autologous bone marrow-derivedmononuclear cell (BMMC) retransplantation in HF (left ventricular ejection fraction, LVEF <45%) at one-year follow-up.

Methods: A whole number of 104 patients were included to the study (male=84 and female=20), age 27 untill 65 with Heart failure. All patients underwent standard examination (12-lead ECG, echocardiography, 6-minute walking test and laboratory tests).

Results: These results suggest BMMC transplantation is safe and well tolerated. BMMC infusion has improved systolic myocardial function, and a consequence has delayed the progression of HF, which is confirmed by recovering proBNP. Moreover, BMMC transplantation might favor by preliminarycell cultivation due to enhanced mitochondrial function.

Key words: Stem cells - bone marrow - ischemic heart disease - dilated cardiomyopathy - interleukins.

J Clin Med Kaz 2015; 3(37):14-18.

Автор для корреспонденции: Комсабакова Баян, центр инновационных технологии в кардиологии и кардиохирургии, АО Национальный научный медицинский центр. Тел.: +7 777 1303981. E-mail: bayanak@mail.ru.

ЖҮРЕК ЖЕТІСПЕУШІЛІГІ КЕЗІНДЕГІ АУТОЛОГИЯЛЫҚ МОНОНУКЛЕАРЛЫ ҚОРЕКТІК ОРТАДА ӨСІРІЛГЕН СҮЙЕК МИЫНЫҢ КЛЕТКАСЫН ЖҮЙЕЛІ ТҮРДЕ ЕНГІЗУ

Джолдасбекова А.У., Федотовских Г.В., Асқаров М.Б., Қомсабақова Б.А., Байгенжина А.Б., Қайратова А.К., Абылкасымова Г.У.
«Ұлттық ғылыми медициналық орталық» АҚ, Астана қ., Қазақстан

Зерттеу мақсаты. Созылмалы жүрек жеткіліксіздігі (EF<45%) бар науқастарға сүйек миының аутологиялық мононуклеарлы клеткасын (МККМ) жүйелі және қайталамалы түрде енгізудің қауіпсіздігі мен эффективтілігін оқып үйрену.

Әдістері. Созылмалы жүрек жеткіліксіздік (СЖЖ) II-IIIФК (NYHA) синдромы бар 27-65 жас шамасындағы 104 науқас зерттелінді (оның ішінде ер - 84, әйел - 20). Клиникалық, қанның биохимиялық анализдері, онкомаркерге зерттеу, электрокардиография (ЭКГ), эхокардиография (ЭХОКГ) жасалынды. Талапқа сәйкес келген барлық науқастарға сүйек мықынынан алынған миелоэксфузия жүргізілді, әрі қарай биотехнология арқылы алынған гемопоэтикалық бағаналы клеткалар алынып, қайта аутогенді трансплантация арқылы көктамыр ішіне кондиционирленген ортадан алынған клеткалар 60-90 мин көлемінде шынтақ венасына 140 х 106 көлемінде енгізілді.

Нәтижелер. Сүйек миынан алынған аутологиялық клеткаларды көк тамрішіне және қайта енгізу тәсілі науқастарға қауыпсыз және оны жақсы көтереді, снымен қатар сол жақ қарынша қуысы кішірейіп миокардтың систолиялық функциясы жақсарды, созылмалы жүрек жеткіліксіздік функциональдық классы төмендеді.

Маңызды сөздер: Бағаналы жасушалар - сүйек миы –жүректің ишемиялық ауруы – дилатациялық кардиомиопатия - интерлейкиндер.

СИСТЕМНОЕ ВВЕДЕНИЕ АУТОЛОГИЧНЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ПРЕКУЛЬТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Джолдасбекова А.У., Федотовских Г.В., Аскаров М.Б., Комсабакова Б.А., Байгенжина А.Б., Кайратова А.К., Абылкасымова Г.У.
АО «Национальный научный медицинский центр», г. Астана, Казахстан

Цель исследования. Изучить безопасность и эффективность системного и повторного введения аутологичных мононуклеарных клеток костного мозга (МККМ), у пациентов с хронической сердечной недостаточностью (EF<45%).

Методы. Обследовано 104 пациента (84 мужчин и 20 женщин) в возрасте от 27 до 65 лет с синдромом хронической сердечной недостаточности (ХСН) II-IIIФК (NYHA). Выполнены клинические, биохимические анализы крови, исследование на онкомаркеры, электрокардиография, эхокардиография. Всем пациентам проведена миелоэксфузия из подвздошной кости с последующей биотехнологией получения гемопоэтических стволовых клеток и аутогенной трансплантацией внутривенно.

Результаты. Установлено, что методика повторного и внутривенного введения аутологичных мононуклеарных клеток костного мозга безопасна и хорошо переносится пациентами, уменьшается полости левого желудочка, улучшается систолическая функция миокарда, снижется функциональный класс хронической сердечной недостаточности.

Ключевые слова: Стволовые клетки - костный мозг – ишемическая болезнь сердца – дилатационная кардиомиопатия - интерлейкины.

Введение

Использование традиционных методов лечения больных с хронической сердечной недостаточностью современными лекарственными препаратами носит временный клинический эффект. Идея регенеративной терапии с использованием стволовых клеток костного мозга, а также специфических факторов роста, стимулирующих выход стволовых клеток в периферический кровоток, уже стала реальностью [1-4]. Однако, использование клеточной терапии при хронической сердечной недостаточности (ХСН), являющейся самым распространенным осложнением у больных, перенесших инфаркт миокарда, а также кардиомиопатии, весьма недостаточен. Актуальными остаются и вопросы безопасности, способов введения и оценки оптимального состояния культуральных клеток.

Известно, что в условиях хронического стресса (длительной хронической патологии) аутологичные клетки костного мозга утрачивают свою биорегуляторную активность и становятся мало пригодными для клеточной терапии [5]. Поэтому, в дополнительную задачу нашей работы входило оценить морфо-функциональное состояние культуральных клеток костного мозга до и после прекультивирования на ультраструктурном уровне, как без, так и при добавлении в культуральную среду ряда фармакологических препаратов; фосфокреатинина «Неотон», фруктозо-1,6-дифосфата «FDP».

Учитывая, что в научной литературе мало клинических работ, посвященных данным вопросам, в Национальном научном медицинском центре г.Астаны в рамках длительного наблюдения изучалась эффективность системного повторного (каждые 3 месяца до 5ти раз) введения аутологичных мононуклеарных прекультивированных клеток костного мозга (МККМ), полученных у пациентов с выраженной хронической сердечной недостаточностью (EF<45%). В качестве модели был использован дизайн открытого неконтролируемого клинического исследования («до-после»).

Материалы и методы

Обследовано 104 пациента (84 мужчин и 20 женщин) в возрасте от 27 до 65 лет, находившихся на стационарном лечении в кардиологическом отделении АО «Национальный научный медицинский центр» с фракцией выброса левого желудочка (EF<45%), с синдромом хронической сердечной недостаточности (ХСН) II-IIIФК (NYHA). Из-них с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) было 46 пациентов, ишемической кардиомиопатией (ИКМП) – 53 пациента, перипортальной кардиомиопатией – 5 пациентов. Последние из-за небольшого количества в дальнейшем объединены с группой ДКМП. На этапе отбора у всех больных было получено информированное согласие на участие в проекте, и выполнены следующие исследования: клинические, биохимические анализы крови, исследование на онкомаркеры (РЭА, NSE, CYFRA, CA72-4, PCA, α-фетопротеин), электрокардиография (ЭКГ), эхокардиография (ЭХОКГ).

После клинико-лабораторного обследования и отбора по критериям включения пациентам проведена аспирация костного мозга из гребня подвздошной кости в количестве 400 мл. Биотехнологическим методом выделена гемопоэтическая фракция стволовых клеток (ГСК) с последующим прекультивированием их в течение 72 часов. Трансплантация ГСК проводилась системно (внутривенно) в среднем в количестве до 140×106 клеток.

Для электронно-микроскопического исследования культуральные клетки фиксировали в 2,5% растворе глютаральдегида с постфиксацией в 1% растворе четырехокиси осмия, проводили по общепринятой методике и заключали в эпон. Полутонкие и ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Leica. Полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим, азуром 2 и основным фуксином [6]. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу и изучали в электронном микроскопе Libra-120 (C.Zeiss).

Трансплантацию МККМ провели путем внутривенного капельного введения в течение 60-90 минут в локтевую вену под контролем измерений артериального давления, частоты сердечных сокращений и термометрии. Повторное введение клеток проводилосьчерез 3-6-9-12 месяцев. Все пациенты получали базовую терапию ХСН (ингибиторы АПФ, В-блокаторы, антагонисты альдостерона, мочегонные). Качество жизни больных с ХСН определяли по Миннессотскому опроснику (MLHFQ) [10-11].

Данное исследование одобрено Локальной комиссией по биоэтике АО «Национальный научный медицинский центр», протокол №004/СТ-14 от 24 апреля 2014 г. Все исследуемые ознакомлены информацией для пациентов, получены информированные согласия. Все протокола исследования соответствуют основным положениям Хельсинкской Декларации. Статистический анализ проводился с помощью программных пакетов SPSS версии 18.0.

Результаты

Электронномикроскопически аутологичные клетки костного мозга, исследованные до культивирования, были представленны гетерогенной популяцией стволовых, прогениторных и дифференцированных клеток с выраженным полиморфизмом субмикроскопического строения и характерными особенностями ультраструктуры различных морфологических классов клеток костного мозга. Митохондрии в основном имели конденсированный тип строения - с электроннoплотным матриксом и частыми кристами с электроннопрозрачными внутрикристными пространствами. По данным литературы конденсированные митохондрии характеризуются высоким уровнем макроэргических соединений и находятся в клетках с активными биоэнергетическими и биосинтетическими процессами [7]. Однако, в митохондриях большинства клеток костного мозга на фоне резко уплотненного матрикса было отмечено резкое расширение, разволокнение и деструкция митохондриальных крист, свидетельствующие о митохондриальной дисфункции данных клеток (рис.1).

Повреждение системы развитых митохондриальных крист с локализованными в них дыхательными ферментами приводит к снижению продукции АТФ и недостаточности энергоснабжения клеток. В настоящее время вторичная митохондриальная недостаточность расценивается, как патогенетическое звено многих хронических заболеваний. [8,9]. На месте измененных митохондрий формировались вторичные лизосомы. Дисфункция митохондрий отражалась и на снижении белкового синтеза, что проявлялось в расширении и дегрануляции эндоплазматического ретикулума, незрелости секреторных гранул. Отдельные

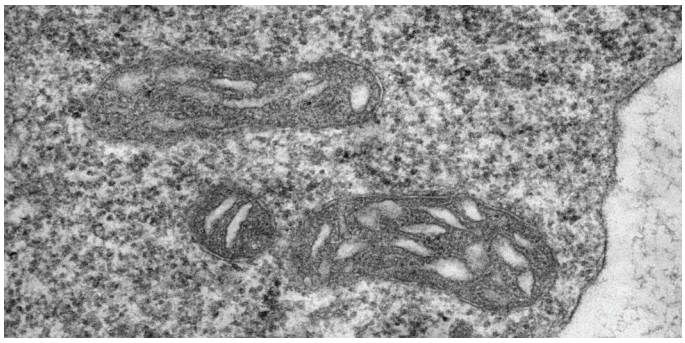

Рисунок 1 - Клетка костного мозга до культивирования. Митохондрии с электронноплотным матриксом и резко расширенными кристами. Электроннограмма

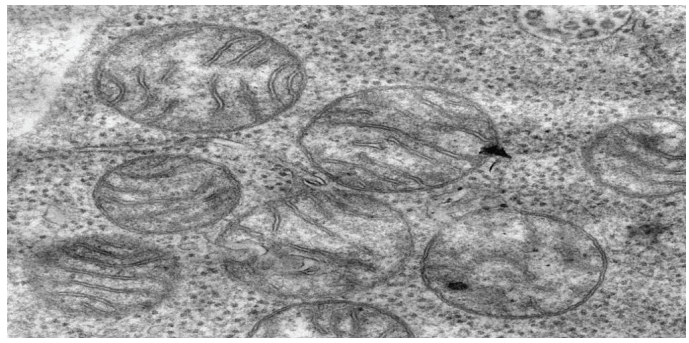

Рисунок 2 - Клетки костного мозга после культивирования. Многочисленные митохондрии и обилие свободных рибосом. Электроннограмма

клетки костного мозга подвергались отеку, некрозу и апоптозу. Известно, что признаки повреждения мембран и цитоскелета соответствуют интенсивности окислительного стресса в костном мозге и объясняются истощением митохондриального пула, как сигнального пути апоптоза.

Светооптическое исследование клеток костного мозга после культивирования выявило наличие крупных клеток со светлым ядром и менее крупных с гиперхромным ядром подковообразной формы и цитоплазматическими включениями – вакуолями и плотными гранулами. Электронномикроскопически цитоплазма клеток бластной формы характеризовалась обилием свободных рибосом, слабым развитием органелл и наличием митохондрий с матриксом пониженной электронной плотности и четкими кристами, что отражало высокий коэффициент фосфорилирования и низкий уровень макроэргических соединений (рис.2). Клетки с подковообразными ядрами имели более сложное строение. В цитоплазме располагались мелкие и гипертрофированные полости агранулярного эндоплазматического ретикулума с хлопьевидным и микровезикулярным материалом в просвете, расширенные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, заполненные белковым содержимым. Многие клетки содержали плотные секреторные гранулы. Митохондрии были полиморфны и не имели признаков деструкции. Таким образом, прекультивирование клеток костного мозга устраняло дисфункцию митохондриального состояния культуральных клеток костного мозга больных с хронической сердечной недостаточностью.

Однако, наряду с митохондриями промежуточного и конденсированного типа строения, в отдельных случаях нами были отмечены митохондрии с признаками набухания, а также с зернисто дезорганизованными кристами на фоне уплотненного матрикса, что отражало усиление процессов окислительного фосфорилирования, обеспечивающих высокую биосинтетическую активность данных клеток. Деструкция отдельных митохондрий свидетельствовала о функциональном истощении данных органелл.

При введении фруктозо-1,6-дифосфата (FDP) в цитоплазме культуральных клеток электронно-микроскопически выявлены целые скопления электронно-плотных гранул гликогена. Как известно, введение FDP при гипоксии обеспечивает запасы гликогена, связанные с адекватным течением анаэробного гликолиза [12]. Особого влияния FDP на структуру митохондрий мы не отметили. При добавлении в питательную среду антигипоксантных веществ («Неотона») ультраструктура митохондрий с матриксом умеренной электронной плотности и четкими кристами отражала энергизированное состояние данных органелл. Таким образом, добавление в процессе прекультивирования в питательную среду энерготропных средств уменьшало деструктивные изменения митохондрий, повышая энергетический статус культуральных клеток.

Оценка острых эффектов процедуры клеточной терапии показала, что внутривенное введение клеток не вызывало каких-либо серьезных осложнений, гемодинамика оставалась стабильной, не выявлено аллергической реакции. В общем анализе крови, который исследовался в день трансплантации (утром) и через 2 часа после трансплантации, у больных отмечено умеренное повышение лейкоцитов, которое уже не регистрировалось в анализе крови, взятом на следующий день после процедуры. Субъективное улучшение качества жизни по данным Миннесотского опросника после пятикратного введения аутологичных клеток костного мозга отмечали все 101 (97,1%) пациента. Толерантность к физической нагрузке при проведении теста с 6-минутной ходьбы статистически значимо увеличилась через 3 месяца после введения МККМ ($P<0,01$) по сравнению с исходным значением во всех исследуемых группах.

Таблица 1 Динамика параметров после клеточной терапии при ИКМП

	Исходно	после 1-й трансплант.	после 2-й трансплант.	после 3-й трансплант.	после 4-й трансплант.
ФВ(%)	32,2±1,2	33,1±1,3	34,2±1,24	35,9±1,3	39,3±2,6*
КДО(ml)	218,6±8,1	215,3±9,9	214,6±12,6	215,1±14,1	201,5±24,9
КСО(ml)	148,3±7,1	150,6±9,3	154,1±11,6	147,1±14,1	141,33±20,47
Pro-BNP (ng/ml)	3266±344,4	1622±315,7	1505±461,2	1005±54,6	361±35,9*
IL-6 (pg/ml)	9,51±3,1	6,04±4,1	2,05±1,41	2,51±3,1	2,58±1,01*
IL-10 (pg/ml)	3,98±2,7	4,34±3,5	6,38±2,1	10,9±3,6	13,8±3,8*

*достоверность в сравнении с исходными данными

При ишемической кардиомиопатии (таблица 1) на фоне повторного введения аутологичных клеток костного мозга отмечалось достоверное увеличение ФВ от исходных (32,2±1,2%) данных к году (39,3±2,6%) P<0,05. При этом КДО и КСО имеют тенденции к уменьшению, но не достоверно (P>0,05). Также на фоне клеточной терапии отмечается высоко достоверное снижение предсердного натрийуретического пептида Pro-BNP в 2 раза уже к 3-ему месяцу после однократного введения стволовых клеток (3266±344,4 ng/ml и 1622±315,7 ng/ml; P<0,05). А к году после 4-х кратной трансплантации СК отмечается снижение Pro-BNP в 10 раз (361±35,9 ng/ml, P<0,0001), что подтверждает улучшение толерантности к физической нагрузке по данным теста 6-минутной ходьбы уже через 3 месяца. На фоне 4-х кратного введения аутологичных клеток костного мозга отмечается значительное увеличение противовоспалительного интерлейкина IL-10 (3,98±2,7; 13,8±3,8; соответственно, P<0,001) и снижение провоспалительного интерлейкина IL-6 (9,51±3,1 и 2,58±1,01; соответственно P<0,001).

Таблица 2 Динамика параметров после клеточной терапии при ДКМП

	Исходно	после 1-й трансплант.	после 2-й трансплант.	после 3-й трансплант.	после 4-й трансплант.
ФВ(%)	32,1±1,3	34,1±1,5	32,8±2,08	30,9±1,3	41,3±1,6*
КДО(ml)	212,6±10,1	208,3±10,9	204±9,81	192,1±14,1	155,5±24,9*
КСО(ml)	145,9±8,5	140,6±9,4	143,1±9,6	147,1±14,1	141,33±20,47
Pro-BNP (ng/ml)	4618±267	1876±392	1154±365	1005±54,6	286±35,9*
IL-6 (pg/ml)	6,6±2,1	3,2±6,7	2,4±0,95	2,51±3,1	1,76±0,63*
IL-10 (pg/ml)	5,84±4,7	8,3±1,2	19,6±4,1	19,9±3,6	19,8±4,8*

*достоверность в сравнении с исходными данными

У пациентов с дилатационной кардиомиопатией на фоне повторной трансплантации аутологичных клеток КМ анализ параметров сердечной функции по данным ЭХОКГ выявил увеличение фракции выброса левого желудочка с 32,1±1,3% до 41,3±1,6%,(P<0,001). Достоверное уменьшение конечно диастолического объема с 212,6±10,1 мл до 155,5±24,9 мл, (P<0,05) и снижение конечно-систолического объема, но недостоверно (P>0,05), что свидетельствует об улучшении систолической функции левого желудочка с уменьшением полости сердца и регрессом клиники хронической сердечной недостаточности.

Динамика раннего маркера сердечной недостаточности Pro-BNP после трансплантации МККМ показал, что после первой же трансплантации снижается в 2 раза и к концу 4-х кратного введения приходит в норму (4618±267 ng/ml и 286±35,9 ng/ml, соответственно P<0,0001). Также нами установлено, значимое повышение противовоспалительного интерлейкина- 10 (5,84±4,7 до 19,8±4,8; P<0,001) и снижение провоспалительного интерлейкина – 6 (6,6±2,1 до 1,76±0,63 соответственно, P<0,001).

Обсуждение

Проведенное исследование позволяет нам прийти к заключению, что ХСН биологически представляет собой хронический стресс. Этот стресс развивается в результате уменьшения массы функционирующих структур миокарда и развивается компенсаторная гипертрофия сохранившихся кардиомиоцитов. Для пролонгирования стадии компенсаторной гипертрофии, торможения дистрофии и гибели оставшихся в миокарде сократительных структур (из-за дефицита энергии на пластические и регуляторные процессы) организм переходит на новый, менее интенсивный уровень жизнедеятельности. На этой стадии развивается иммунная дисрегуляция – снижается индукционная и информационная активность лимфоцитов и других мононуклеарных клеток, нарушается спектр продуцируемых ими цитокинов и регуляторных пептидов, резко ослабляется или прекращается миграция гемопоэтических клеток из костного мозга в кровоток, нарушается популяционный состав клеток периферической крови, а также снижается реактивность клеток [13].

По данным Iso et al. (2007) также было показано, что внутривенное введение мезенхимальных стволовых клеток позволяет улучшить функциональные показатели сердца через 3 недели после инфаркта миокарда, что объясняется транзиторным паракринным воздействием введенных клеток, способствующим защите кардиомиоцитов и эндотелиальных клеток от гибели и стимуляции ангиогенеза [14]. Общий регенераторный эффект трансплантации стволовых клеток может быть обусловлен также и их противовоспалительным влиянием. В работе Lee et al.(2009) было показано, что стволовые клетки, осевшие после внутривенной трансплантации в легких, способны активироваться и начать секрецию противовоспалительного белка TSG-6 [15]. Учитывая, что хронический воспалительный процесс считается важным аспектом прогрессирования атеросклероза, противовоспалительное воздействие стволовых клеток представляется эффективным для улучшения сердечно-сосудистого прогноза.

Таким образом, полученные нами результаты комплексного лечения больных с хронической сердечной недостаточностью системным введением прекультивированных аутологичных клеток костного мозга показали, что системное повторное введение данных клеток безопасно и хорошо переносится пациентами. Ни у одного больного не было отмечено развития онкологических заболеваний (онкомаркеры перед каждым введением МККМ были в пределах нормы), иммунных реакций, обострения воспалительных заболеваний, угрожающих нарушений ритма сердца, ухудшения течения ишемической болезни сердца, развития или прогрессирования хронической сердечной недостаточности. На фоне клеточной терапии, аутологичными МККМ уменьшалась полость левого желудочка, улучшалась систолическая функция миокарда, снижалась ФК ХСН по NYHA, что подтверждалось достоверным снижением раннего биологического маркера сердечной недостаточности - натрийуретического пептида. Также установлена возможность улучшения морфо-функционального состояния деэнергезированных

культуральных клеток путем прекультивирования и введения ряда энерготропных фармакологических препаратов.

Выводы

Трансплантация аутологичных прекультивированных мононуклеарных клеток костного мозга при хронической сердечной недостаточности является безопасной процедурой.

Повторное введением прекультивированных МККМ в сочетании с оптимальной медикаментозной терапии ХСН приводит к улучшению общей и локальной сократительной функции миокарда, а также нормализации систолического и диастолического функции левого желудочка.

Путем прекультивирования и введения ряда энерготропных фармакологических препаратов выявлено улучшение морфо-функционального состояния деэнергезированных стволовых клеток, включая усиление мощности митохондриального аппарата и синтеза защитных адаптивных белков.

Литература

1. Repin B.S., Suhih G.T. Medical Stem Biology, *M., RAMS:M*., 1998, pp.56-58.
2. Maslov L.N., Rjbov N.N., Sazonova C.N.Cellular transplantation is in treatment of myocardial infarction: problems and prospects, *Vestn.transplantol. and artificial organs*, 2003, Vol.4, pp.78-86.
3. Maslov C.N., Rjbov N.N., Sazonova C.N. Regeneration of myocardium// Successes of physiological sciences.- 2004.-Vol.3.-pp.50-60.
4. Karpov V.C., Markov V.A., Rjbov N.N. Theoretical aspects of cellular technologies in a cardiology and results of own research, *Collection of labours to the 80year of academician E.I.Chazova*, 2009, pp.104-115.
5. Stepanov O.D., Chadin A.V., Masutin A.G. and all. Miosin activating proteinkinases are possible regulators of not myscle miosin in the developing heart of man, *Bulletin of eksperimental biologii and medicines*, 2011, Vol.152 No.152, pp.158-161.
6. Humphrey C, Pittman F. A simple methylene blue-azure II-basic fuchsin stain for epoxy-embedded tissue sections, *Stain Technol*, 1974, No.49, pp.9–14.
7. Sekamova S.N., Beketova T.P. About the functional value of dark and light cages, *Archive of pathology*, 1975, No. 5, pp.57-64.
8. Klembovski A.N., Suhorukov V.S. Problem of power disfunction of cages at pathology of man (pathogeny and correction), *Ann. of the Russian academy of natural sciences*, 2007, No.4, pp.62-69.
9. Postnov U.V. About the energydependent link of pathogeny of chronic gipertenzii, *Archiv pathologies*, 2009, No.4, pp.3-11.
10. Rector T.S., Francis G.S., Cohn J.N. Patients self-assessment of their congestive heart failure. Part 1: Patient perceived dysfunction and its poor correlation with maximal exercise tests, *Heart Failure*, 1987, Vol.3, pp. 192-196.
11. Rector T.S., Kubo S.H., Cohn J.N. Patients self-assessament of their congestive heart failure. Part 2: Content, realibility and validity of a new measure, the Minnessota Living with Heart failure Questionnaire, *Heart Failure*, 1987, Vol. 3, pp.198-209.
12. FDP. Metabolic support at the extreme states. General description of preparation. *Consortium «Medexport Italiya». «Fisiofarma*», 2006, 12 p.
13. Karra R.S., Vemullapalli C., Dong C. et al.Stem cells of aging donors-insufficient capacity to repair causes progression of atherosclerosis in the recipient: molecular evidence for arterial repair in atherosclerosis, *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 2005, Vol.102, pp.16789-16794.
14. Iso Y., Spees J.L., Serano C.et al. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2007, No.354(3), pp.700-6.
15. Lee R.H., Pulin A.A., Seo M.J. et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti inflommatory protein TSG-6, Cell.Stem.Cell, 2009, No.5(1), pp.54-63.