DOI: 10.23868/201707031

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ СОВМЕСТИМОСТИ ПОЛИЛАКТИДНЫХ НАНОВОЛОКОННЫХ МАТРИКСОВ, ЗАСЕЛЕННЫХ ФИБРОБЛАСТАМИ СЕРДЦА, В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА МИНИ-СВИНЬЯХ

Е.В. Чепелева [1], В.А. Балашов [2], А.А. Докучаева [1], А.А. Коробейников [1], А.Г. Стрельников [1], С.О. Лепендин [1], С.В. Павлова [1], К.И. Агладзе [2], Д.С. Сергеевичев [1], Е.А. Покушалов [1]

[1] Национальный медицинский исследовательский центр им. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

[2] Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва, Россия

Analyis of biological compatibility of polylactide nanofibrous matrix vitalized with cardiac fibroblasts in a porcine model

E.V. Chepeleva [1], V.A. Balashov [2], A.A. Dokuchaeva [1], A.A. Korobejnikov [1], A.G. Strelnikov [1], S.O. Lependin [1], S.V. Pavlova [1], K. I. Agladze [2], D.S. Sergeevichev [1], E.A. Pokushalov [1]

[1] E.N. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russia

[2] Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow, Russia

На сегодняшний день использование синтетических биодеградируемых полимеров на основе полиуретана, поликапролактона, полилактидной кислоты, полигликолевой кислоты и их сополимеров является одним из перспективных направлений в тканевой инженерии. Один из распространённых методов создания подложек для культивирования клеток — электроспиннинг (метод электростатического формования растворов высокомолекулярных соединений, ЭСФ), позволяющий создавать матриксы из нановолокон различной конфигурации, способных к биодеградации и обладающих хорошей биосовместимостью.

Настоящая работа посвящена изучению выживаемости фибробластов сердца при культивировании на подложках из поликапролактона, полученных методом ЭСФ, in vitro и in vivo после трансплантации в миокард лабораторного животного (мини-свиньи). Готовые матриксы заселяли клетками, выделенными методом механического измельчения и ферментативного гидролиза из фрагментов предсердий мини-свиней. Выживаемость клеточной культуры оценивали с помощью XTT-теста.

Эксперименты проводили на 2 группах животных: первой группе в миокард трансплантировали образцы матриксов, заселенные культурой фибробластов сердца, второй группе имплантировали матриксы без клеток. Через 7 сут. после операции животных выводили из эксперимента и забирали участки миокарда с трансплантированным/имплантированным материалом. Состояние миокарда подопытного животного оценивали с помощью стандартного гистологического исследования, а также иммунофлюоресцентного окрашивания криосрезов сердца для выявления развития воспаления в зоне имплантации.

Было обнаружено, что созданные матриксы из полилактидных нановолокон обладают хорошей биосовместимостью и не влияют на жизнеспособность клеток при использовании в качестве подложки для культивирования. Полученные результаты помогут разработке новых типов полимерных подложек и применению их для изучения биофизических и электрофизиологических свойств кардиальных клеточных культур, что позволит расширить возможности регенеративной медицины и может стать стандартом развития аутогенной биологической терапии.

Ключевые слова: тканевая инженерия, клеточная культура, электроспиннинг, биоматериалы, регенеративная медицина.

Currently the use of synthetic biodegradable polymers based on polyurethane, polycaprolactone, polylactic and polyglycolic acids structures and their co-polymers is one of the most perspective directions of tissue engineering development.

Electrospinning was found as an optimal way to produce nanofibers suitable for building several types of biomaterial scaffolds that are used in cell therapy. This technology allows creating a stable biodegradable and highly biocompatible matrix.

In this study we investigate the viability of cardiac fibroblasts cultivated on polymeric nanofibrous scaffolds in vitro and in vivo after implantation in the myocardium of an experimental animal.

Polymeric nanofibers were produced on an electrospinning unit. Prepared matrixes were vitalized with cell cultures, received from atriums of several mini-pigs. Cell viability was estimated by the use of XTT based colorimetric assay.

Two groups of mini-pigs were selected for this research. The first group underwent a procedure of intramyocardial implantation of a matrix, grown with cardiac cell culture. In the second group a clear polymeric matrix was implanted.

Seven days after the procedure animals were sacrificed and fragments of myocardium containing implants were harvested. Frozen sections were prepared immediately, then a standard histological analysis and immunofluorescent staining were performed.

Current results can be significant for further development of polymeric scaffolds and for research of biophysical and electrophysiological features of cardiac cell cultures, what will help to expand the abilities of contemporary regenerative medicine and may become a standard of autological biological therapy.

Keywords: tissue engineering, cell culture, electrospinning, biomaterials, regenerative medicine.

e-mail: e_chepeleva@meshalkin.ru

Введение

По оценкам Всемирной Организации Здравоохранения сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности населения в большинстве стран мира (в 2015 г. от этих заболеваний умерли 15 млн человек). Одними из самых распространенных заболеваний сердца являются аритмии, причинами которых могут быть различные функциональные и органические поражения миокарда (прежде всего инфаркт, ишемическая болезнь сердца, врожденные или приобретенные пороки сердца и т.д.) [1]. Современные научные разработки позволяют получать новые проводящие кардиомиоциты из зрелых сократительных кардиомиоцитов in vitro и in vivo, а также придавать клеткам новые функциональные возможности (способность генерировать потенциал действия и контролировать работу сократительных кардиомиоцитов). В основе большей части разработанных методик лежит генная и (или) клеточная терапия. Однако данных о применении генной и (или) клеточной терапии для лечения и профилактики аритмий очень мало. Важным вкладом в реализацию концепции генной и клеточной антиаритмической терапии является создание генераторов сердечных импульсов — биологических пейсмейкеров [2].

В первых работах по созданию биопейсмейкеров путем активации генов, регулирующих эмбриональное развитие вентрикулярных, атриальных и проводящих кардиомиоцитов, использовали индукцию сверхэкспрессии ионных каналов на поверхности клеток через аденовирус-связанное встраивание нужного участка генома. В работе J. Miake и соавт. (2002) было обнаружено, что частота сокращения желудочков увеличилась после инъекции полученной генетической конструкции в полость левого желудочка морских свинок [3]. Но, несмотря на возможность повышения автоматизма, данная работа выявила ряд ограничений предлагаемой технологии — в частности, временный характер пейсмейкерной активности.

Технологии получения пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) и последующее развитие протоколов направленной дифференцировки в кардиальном направлении открыли новые подходы для разработки биологических пейсмейкеров. Кардиомиоциты, получаемые из стволовых клеток при направленной дифференцировке, схожи с кардиомиоцитами сердца по морфологии, экспрессии белковых маркеров, электрофизиологическим показателям и чувствительности к химическим веществам [4, 5]. Наряду с этим, современные технологии тканевой инженерии дают возможность получать органоспецифичные структуры для регенеративной медицины, такие как трансплантируемые заплатки [6, 7]. Но на данный момент нет адекватной модели для оценки электрофизиологических параметров и структурной организации имплантируемого материала в трёхмерном пространстве. За последние годы был опубликован ряд работ, продемонстрировавших возможность создания нановолоконных носителей для клеток путем электроспиннинга [8, 9]. Кроме того, было показано, что применение полимерных нановолоконных матриксов в качестве подложек для получения устойчивого биологического пейсмейкера позволяет контролировать процесс дифференцировки группы клеток в единую структуру с функциональными возможностями той ткани, которая требуется исследователю, а также обеспечивает её механическую прочность и функциональное электрофизиологическое единство [10].

Цель работы — изучение выживаемости фибробластов сердца при культивировании на подложках из поликапролактона, полученных методом ЭСФ, in vitro и in vivo после трансплантации в миокард лабораторного животного (мини-свиньи).

Материал и методы

Изготовление полимерных матриксов. Для получения волокон методом электроспиннинга использовали раствор полилактида (PLA, MW ~ 700 000 Да, Merck, Германия) в гексафторизопропаноле (HFP) в концентрации 25 мг/мл. Субстратом для напыления волокон служили кольца из полидиметилсилоксана (PDMS, Dow chemical, США) с внешним диаметром 9 мм, внутренним диаметром 7 мм, толщиной 2 мм. Электроспиннинг проводили при помощи установки Nanon (MECC Corporation, Япония). Раствор подавали шприцем объемом 3 мл, внутренний диаметр иглы 0,413 мм. Скорость подачи раствора полимера варьировала в пределах от 0,5 мл/ч. до 2,0 мл/ч., напряжение между иглой и коллектором — 4–7 кВ. Напыление волокон производили на плоском коллекторе, на который были положены кольца из PDMS. Расстояние от конца иглы до плоскости коллектора равнялось 10 см. Процесс электроспиннинга продолжался до получения плотного, стабильного слоя волокон. Среднее время напыления составляло 15 мин., средняя толщина волокон — 1,6 мкм.

Для исследования морфологии полученных нановолоконных субстратов использовали сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) JSM-6510LA (JEOL, Япония): волокна покрывали слоем золота толщиной 10 нм в автоматической напылительной установке Q150R (Quorum Technologies, Великобритания) методом магнетронного распыления.

Готовые образцы стерилизовали УФ излучением (длина волны 265 нм), не менее 30 мин. с каждой стороны. Стерилизованные матриксы помещали в культуральную чашку и хранили до внесения клеток в стерильных условиях не более 3 сут.

Получение GFP-позитивных фибробластов сердца мини-свиньи. Фибробласты получали из сердец мини-свиней селекции Института цитологии и генетики СО РАН по методике, описанной ранее [11]. Работа с животными проводилась в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами: «Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях: EST № 123» от 18 марта 1986 г., «Об утверждении правил лабораторной практики: приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации» № 267 от 19.06.2003 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России. После эвтаназии у животного извлекали сердце, правое предсердие механически измельчали до фрагментов размером 1–2 мм^3 и обрабатывали 0,2% раствором коллагеназы IV (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 15 мин. при 37°С. Супернатант отбирали в отдельную пробирку, активность коллагеназы

ингибировали добавлением равного объема фосфатно-солевого буфера (PBS), центрифугировали 5 мин. при 1000 об/мин., осадок аккуратно ресуспендировали в ростовой среде FD (50% DMEM, 50% F12, Invitrogen, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Autogene Bioclear, Великобритания), 100 ЕД/мл пенициллина (Gibco, США), 100 ЕД/мл стрептомицина (Gibco, США) и 2 ммоль/л L-глутамина (Invitrogen, США). Суспензию клеток переносили в культуральную посуду и культивировали в CO_2-инкубаторе при 37°С. Среду меняли через два дня с предварительным промыванием клеток PBS. До заселения фибробластами сердца полимерные матриксы обрабатывали 0,1% раствором желатина в PBS, затем на поверхность матрикса вносили суспензию клеток при стандартной плотности 150×10^3 кл/см^2, формирование монослоя клеток происходило на 2 сут.

Для маркирования клеточной культуры зеленым флюоресцентным белком GFP использовали лентивирусный вектор pGpur, несущий ген GFP, под контролем промотора CMV. Вирусные частицы нарабатывали в культуре клеток HEK293FT по описанному ранее протоколу [12]. За 1 сут. до трансдукции клетки высевали в покрытые желатином лунки площадью 4 см^2 культуральных планшетов в количестве 50×10^3 кл/лунку (плотность примерно 60%). За 1 ч. до трансдукции меняли ростовую среду на свежую (1 мл) и добавляли в нее гексадиметрина бромид (Polybrene, Sigma, США) до конечной концентрации 4 мкг/мл. Затем добавляли 100 мкл среды с вирусными частицами. Через 16 ч. после трансдукции меняли среду на свежую. Флюоресценцию GFP в клетках, трансдуцированных лентивирусом pGpur, наблюдали через 48 ч. после трансдукции.

Для прижизненной визуализации клеток митохондрии окрашивали 200 нМ красителем MitoTracker Red CMXRos (Life Technologies, США) в течение 30 мин. при 37^{0}С согласно инструкции фирмы-производителя.

Определение жизнеспособности клеток (XTT тест). Жизнеспособность фибробластов сердца мини-свиней при культивировании на полимерных матриксах определяли XTT-тестом с помощью Cell Proliferation Kit II (Roche Applied Science, Германия). Тест основан на спектрометрическом анализе уровня формазана, трансформированного живыми клетками из тетразолиевой соли XTT (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанилид). Во время проведения теста соль тетразолия расщепляется на ярко окрашенный формазан сукцинатдегидрогеназным комплексом дыхательной цепи митохондрий. Только живые клетки, обладающие интактной митохондриальной мембраной, а также интактной клеточной мембраной, обладают активной дегидрогеназой — чем больше таких клеток в лунке, тем активнее в ней митохондриальные ферменты и тем выше концентрация образовавшегося красителя.

Для проведения теста 5 образцов матриксов, заселенных фибробластами сердца (в количестве 100×10^3 клеток на один матрикс диаметром 9 мм), спустя 7 сут. после формирования монослоя помещали в отдельные лунки 96-луночного планшета и инкубировали в ростовой среде в течение 24 ч. при 37° С и 5% CO_2. Для построения стандартной кривой зависимости интенсивности поглощения от количества жизнеспособных клеток брали клеточную суспензию фибробластов сердца с исходной концентрацией 500×10^3 кл/мл, делали ряд последовательных разведений в 5 раз каждое, из полученных образцов отбирали аликвоты по 200 мкл, помещали в лунки 96-луночного планшета (от 32 кл./лунку до 100×10^3 кл./лунку) и инкубировали в ростовой среде в течение 24 ч. при 37° С и 5% CO_2. Далее проводили XTT-тест согласно инструкции производителя. Поглощение измеряли при длине волны 490 нм с помощью спектрофотометра Wallac 1420 Victor (PerkinElmer, США). Для построения графика зависимости интенсивности поглощения от количества жизнеспособных клеток в образце применяли метод регрессионного анализа.

Имплантация полимерных нановолоконных матриксов, заселенных фибробластами сердца, в миокард мини-свиней. Эксперименты проводили на мини-свиньях в возрасте 6—7 мес. (n = 6), разделенных на 2 группы: 1 группа (опыт, n = 3), 2 группа (контроль, n = 3). Животным первой группы в миокард трансплантировали образцы матриксов, заселенные культурой фибробластов сердца, маркированных GFP, животным 2 группы имплантировали матриксы без клеток.

Непосредственно перед операцией животным проводилась премедикация комбинацией препаратов: атропин (0,1 мг/кг) и Золетил-100 (6 мг/кг). Затем животное переносили на операционный стол и укладывали на спину. В краевую вену уха устанавливали периферический катетер, к грудной клетке прикреплялись датчики для электрокардиографии, к хвосту — плетизмографический датчик для контроля насыщения периферической крови кислородом. Для контроля артериального давления в левую бедренную артерию устанавливали пункционным способом артериальный катетер, через который присоединяли систему инвазивного контроля давления. На следующем этапе внутривенно вводили миорелаксант (ардуан 0,05 мг/кг) и выполняли интубацию трахеи трубкой соответствующего диаметра. Животное подключали к аппарату ИВЛ HPV760 (Puritan Bennett, США), принудительную вентиляцию легких проводили газовой смесью кислород-воздух в соотношении 1:1. Поддерживающий наркоз производили непрерывным внутривенным введением эмульсии пропофола в дозе 10 мк/кг/ч с помощью автоматического шприцевого насоса PerfusorCompact (B. Braun, Германия) через установленный ранее периферический катетер. ЭКГ, ЧСС, артериальное давление и температура тела фиксировались в режиме «реального времени» системой мониторинга IntelliVue MP40 (Philips, Германия). Динамика данных регистрировалась в наркозной карте экспериментального животного каждые 15 мин.

Доступ в грудную клетку осуществляли путем проведения боковой торакотомии в проекции 4-го межреберья слева. Линейный разрез кожных покровов выполняли по ходу межреберного пространства между 4 и 5 ребрами, поверхностные и межреберные мышцы разводили тупым путем, вскрывали плевральную полость, затем разводили ребра при помощи реечного ранорасширителя. Перикард рассекали и подшивали к краям операционной раны, обнажая сердце. На выбранный участок миокарда накладывали двойной кисетный шов, в окруженных швом тканях делали надрез глубиной 5 мм, внутрь помещали образец полилактидного матрикса, заселенного фибробластами сердца, (контрольной группе подшивали незаселенные матриксы), после

чего затягивали наложенный шов. Перикард ушивали отдельными узловыми швами рассасывающейся нитью диаметром 5/0, и устанавливали дренажную трубку. Держалки и ранорасширитель удаляли из раны, ребра стягивали синтетической нитью диаметром 1/0, аналогичной нитью ушивали мышцы и кожу. Операционное поле обрабатывали раствором Бетадина.

Мини-свиней выводили из наркоза путем прекращения введения анестезиологических препаратов. После появления стабильного спонтанного дыхания проводили экстубацию, затем переводили животное в чистый подготовленный вольер.

Через 7 сут. после операции животных выводили из эксперимента путем внутривенного введения тиопентала натрия в дозе 50 мг/кг. Сразу же после эвтаназии извлекали сердце, вырезали фрагменты миокарда с трансплантированными/имплантированными матриксами и замораживали в среде Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek, США) для изготовления криосрезов. Срезы толщиной 8 мкм изготавливали с использованием криостата HM-550 (Microm, Великобритания) и прикрепляли к стеклам SuperFrost Plus (Menzel-Gläser, Германия). Полученные препараты использовали для иммунофлуоресцентного анализа, а также окрашивали гематоксилин-эозином по общепринятой методике.

Иммунофлюоресцентное окрашивание. Препараты криосрезов тканей сердца фиксировали в 4% растворе параформальдегида, пермеабилизовали в течение 30 мин. в 0,5 % растворе Triton X-100 (Bio-Rad, США) в PBS, блокировали неспецифическое связывание 2,5% раствором бычьего сывороточного альбумина в PBS и далее инкубировали с антителами к белкам GFP, cTnT (Abcam, Великобритания) по стандартным протоколам. Для окрашивания ядер препаратов использовали DAPI в Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, США). Анализ препаратов проводили на флюоресцентном микроскопе NIKON Ti100 (Nikon, Япония) с помощью программного обеспечения Imstar.

Результаты и обсуждение

Фибробласты сердца, выделенные из фрагментов предсердий мини-свиньи, прикреплялись к культуральному пластику, образовывали монослой, имели вытянутую форму и отростки, сократительная активность в культуре не выявлялась (рис. 1А). Для возможности последующей визуализации клеток после их трансплантации в организм лабораторного животного культуры были маркированы GFP (рис. 1Б).

В качестве подложки для культивирования полученных клеток мы использовали матриксы из полилактидных нановолокон, изготовленные методом электроспиннинга (рис. 2). При культивировании на поверхности полимерного матрикса клетки сохраняли морфологические признаки фибробластов, экспрессию флюоресцентного белка, а монослой на поверхности матриксов формировался на 60–80% (рис. 3).

Для количественной оценки жизнеспособности клеток при культивировании их на поверхности полимерных матриксов применяли XTT-тест с последующим регрессионным анализом, используя график зависимости интенсивности поглощения от количества клеток в пробе (рис. 4).

В таблице представлены данные по количеству жизнеспособных клеток на образцах полимерных матриксов на 7 сут. культивирования после их заселения фибробластами сердца.

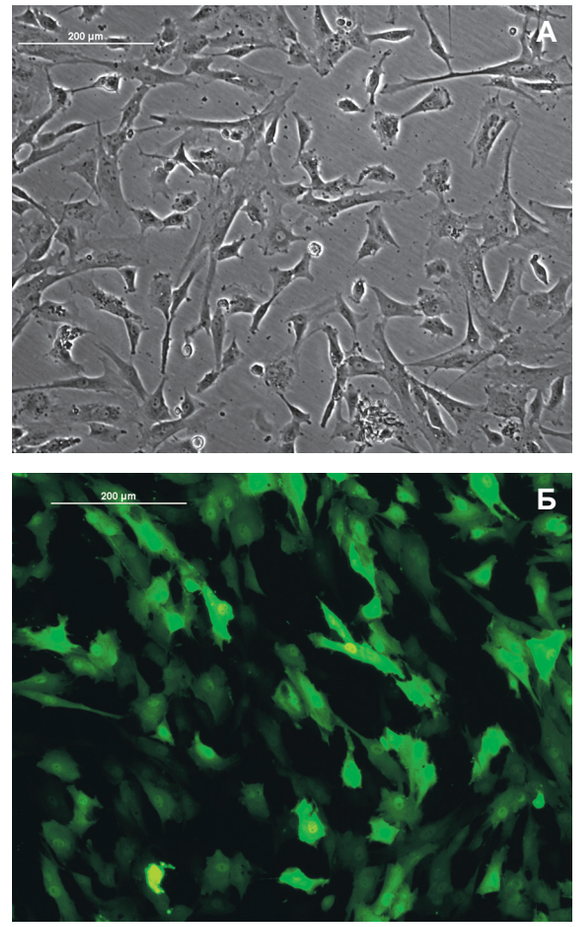

Рис. 1. Культура изолированных фибробластов сердца мини-свиньи:
А – клетки на культуральном пластике, фазовый контраст;
Б – визуализация кардиальных фибробластов, маркированных GFP

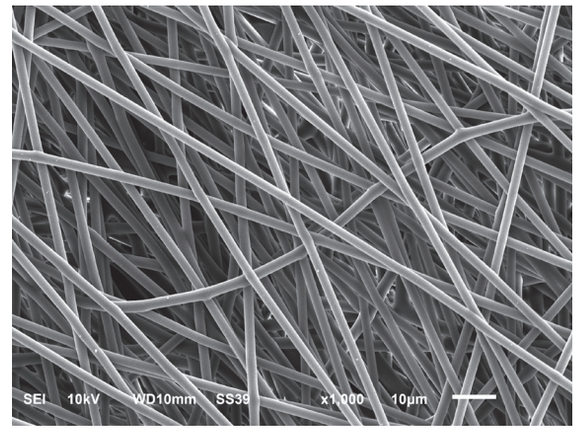

Рис. 2. Микрофотография нановолоконного субстрата. Сканирующая электронная микроскопия

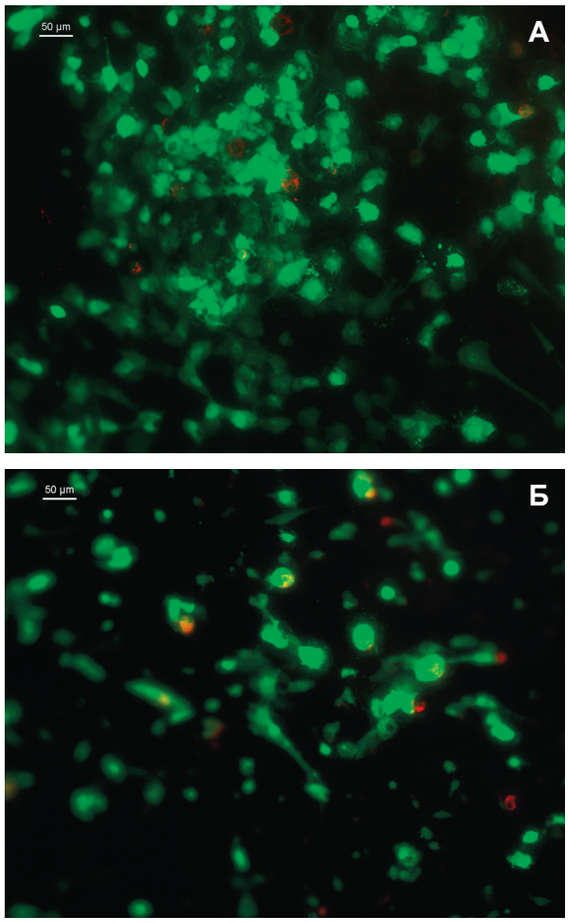

Рис. 3. Формирование клеточного слоя in vitro на поверхности матрикса из полилактидных нановолокон (зеленое свечение — GFP^{+}-клетки, красное — клетки, меченные MitoTracker Red):
А — через 2 сут. после заселения матрикса клетками;
Б — через 7 сут. после заселения

С помощью XTT-теста было показано, что большая часть фибробластов сердца (до 75%), по меньшей мере, в течение недели после заселения матрикса сохраняет жизнеспособность на поверхности полилактидных нановолокон. Таким образом, можно сделать вывод, что полученные образцы полимерного материала пригодны для создания синтетического матрикса, который можно заселять клетками для последующей трансплантации данной конструкции в организм лабораторного животного.

При оценке влияния на состояние миокарда трансплантации заселенных фибробластами сердца полимерных матриксов и анализе выживаемости трансплантируемых клеток в организме животного методом окрашивания гистологических препаратов гематоксилином и эозином (рис. 5) были отмечены небольшие отдельные участки формирующегося заместительного фиброза с очаговой лимфоцитарной инфильтрацией. Материал сердечной мышцы в основном представлен миокардом с сохраненными мышечными волокнами равномерной толщины. Внутримиокардиальные артерии сохраняют свое строение, просвет свободный, в мелких сосудах наблюдаются скопления эритроцитов. В препаратах встречаются отдельные микроскопические фрагменты инородного тела (полимерного матрикса), вокруг которых формируются очаги гранулематозной ткани с большим количеством многоядерных клеток, макрофагов, гистиоцитов и лимфоцитов. Трансплантированные клетки на окрашенных гематоксилином и эозином препаратах не идентифицируются. Качественных различий в морфо-гистохимических особенностях миокарда между контрольной и опытной группами животных выявлено не было.

С помощью иммунофлюоресцентного анализа криосрезов фрагментов сердца было показано наличие отдельных клеток, меченных GFP, в составе фиброзной ткани (рис. 6). Ввиду затруднительной визуализации отдельных фрагментов имплантированного матрикса на гистологических препаратах количественный анализ выживаемости трансплантированных клеток в миокарде в рамках данного эксперимента не проводился.

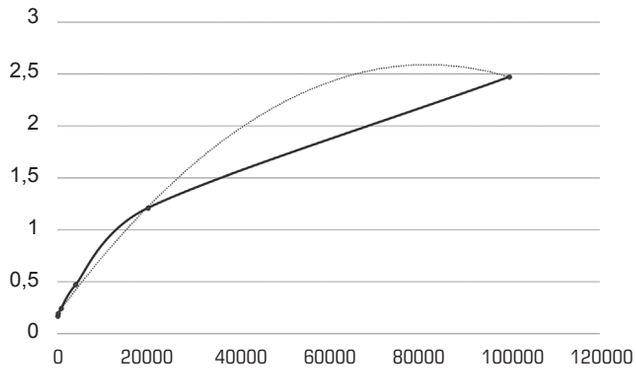

Рис. 4. Зависимость интенсивности окрашивания пробы от количества живых клеток в XTT-тесте

Таблица. Количество живых клеток на полимерных матриксах через 7 сут. культивирования

Образец	1	2	3	4	5
А 490 нм*	2,155	2,008	2,091	2,172	2,124
Количество клеток	72 000	61000	67000	73400	69500

* А 490 нм — интенсивность поглощения при длине волны 490 нм.

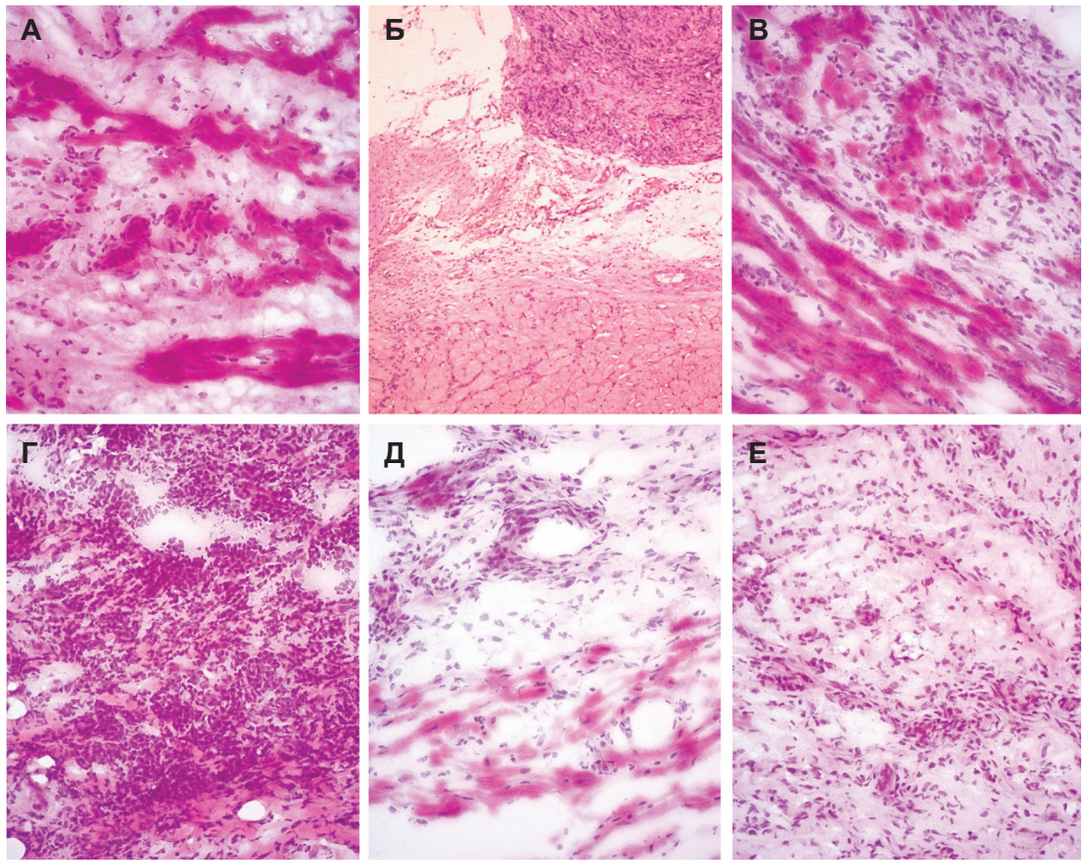

Рис. 5. Миокард: А, В, Д — после интрамиокардиальной трансплантации полимерного матрикса, заселенного фибробластами сердца; Б, Г, Е — после интрамиокардиальной имплантации контрольного полимерного матрикса. Криосрезы. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: А, В, Г, Д, Е — ×200; Б — ×5

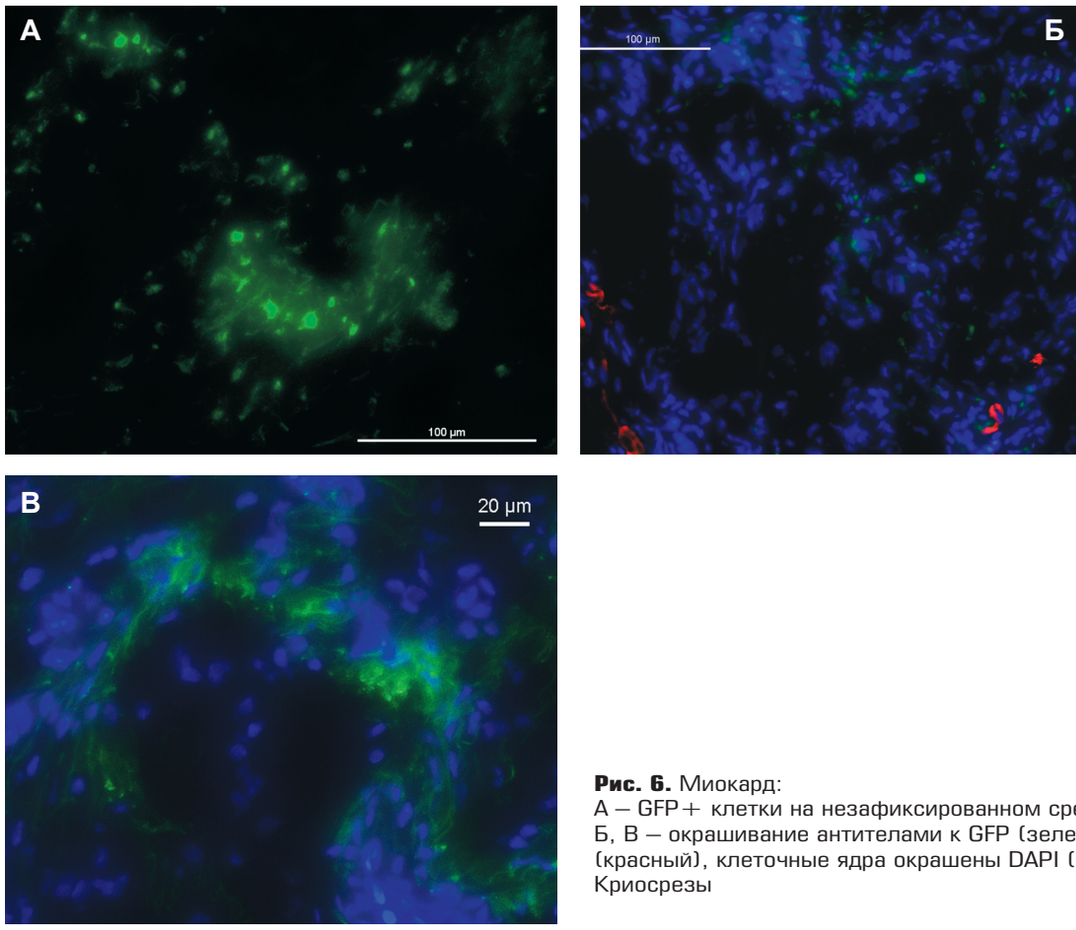

Рис. 6. Миокард:
А — GFP+ клетки на незафиксированном срезе;
Б, В — окрашивание антителами к GFP (зеленый) и тропонину Т (красный), клеточные ядра окрашены DAPI (синий).
Криосрезы

По результатам работы можно сделать заключение, что созданные матриксы из полилактидных нановолокон обладают хорошей биосовместимостью, эффективно адгезируют клетки на поверхности и не влияют на их жизнеспособность при использовании в качестве подложки для культивирования. Однако, после трансплантации заселенных клетками матриксов в миокард, происходит их деформация с образованием участков воспаления вокруг отдельных частиц полимерного материала, что усложняет исследование выживаемости трансплантированных клеток в организме. Для дальнейшего изучения in vivo биосовместимости носителей из полилактидных нановолокон необходимо доработать и усовершенствовать конструкцию полимерного матрикса, либо производить перед трансплантацией предварительную фиксацию клеток на волокнах с помощью биологических полимеров (фибриновый клей, BioGlue, BD Matrigel и т.д.).

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РНФ 16-15-10322 «Разработка научных подходов создания пейсмейкерных клеток человека с целью замещения функции проводящей системы сердца, используя матрицы из полимерного нановолокна».

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ибрагимова А.Г., Еремеева М.В. Современные технологии для создания биологического водителя ритма. Разработка и регистрация лекарственных средств 2015; 3(12): 180-6.
2. Бокерия Л.А., Бокерия О.Л., Меликулов А.Х. и др. Гены, стволовые клетки и биологические пейсмейкеры. Анналы аритмологии 2009; 4: 68-78.
3. Miake J., Marban E., Nuss H.B. Biological pacemaker created by gene transfer. Nature 2002; 419(6903): 132-3.
4. Zhang J., Wilson G.F., Soerens A.G. et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. Circ. Res. 2009; 104(4): 3041.
5. Zwi L., Caspi O., Arbel G. et al. Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. Circulation 2009; 20(15): 1513-23.
6. Vacanti C.A. History of tissue engineering and a glimpse into its future. Tissue Eng. 2006; 12(5): 1137-42.
7. Isenberg B.C., Wong J.Y. Building structure into engineered tissues. Mater. Today. 2006; 9(12): 54-60.
8. Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W.E. et al. An introduction to electrospinning and nanofibers. Hackensack [NJ]: World Scientific; 2005.
9. Sell S.A., McClure M.J., Garg K. et al. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. Adv. Drug Deliver Rev. 2009; 61(12): 1007-19.
10. Байрамова С.А., Стрельников А.Г., Романов А.Б. и др. Перспективы создания биологического пейсмейкера с использованием современных технологий. Гены и клетки 2017; 12(2): 29-36.
11. Павлова С.В., Сергеевичев Д.С., Чепелева Е.В. и др. Сравнение мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и региональных стволовых клеток сердца и фибробластов кожи человека. Патология кровообращения и кардиохирургия 2015; 19(4-2): 12-9.
12. Medvedev S.P., Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I. et al. Human induced pluripotent stem cells derived from fetal neural stem cells successfully undergo directed differentiation into cartilage. Stem Cells Dev. 2011; 20(6): 1099-112.

Поступила: 09.10.2017