ОБЗОРЫ

Резидентные клетки–предшественники в сердце и регенерация миокарда

К.А. Рубина, В.С. Мелихова, Е.В. Парфенова*
Факультет фундаментальной медицины МГУ им. Ломоносова
Российский кардиологический научно–производственный комплекс
Институт экспериментальной кардиологии
ООО «Генная и клеточная терапия»

Resident Cardiomyocyte Precursors and Myocardium Regeneration

K.A. Rubina, V.S. Melikhova, E.V. Parfenova
Moscow State University, Faculty of Medicine
Russian Cardiology Research and Production Center
Institute of Experimental Cardiology
«Gene and Cellular Therapy» Ltd

В обзоре представлена история развития взглядов на возможности регенерации сердечной мышечной ткани. Обсуждены современные данные о существовании и функционировании резидентных клеток–предшественников кардиомиоцитов.

Ключевые слова: сердце, миокард, стволовые клетки сердца.

The review represents development of different views on the potential of cardial muscle tissue regeneration as well as up–to–date data on existence and functioning of resident precursors of cardiomyocytes.

Key words: heart, myocardium, cardiac stem cells.

Введение

Сердечно–сосудистые заболевания продолжают лидировать в списке по количеству смертельных исходов во всех промышленно развитых странах. Сердечная недостаточность, вызываемая ишемической болезнью сердца (ИБС) или кардиомиопатиями (КМП), является одной из главных проблем здоровья взрослого населения. Поэтому для пациентов с тяжелой сердечной недостаточностью, у которых традиционное лечение неэффективно или имеет противопоказания, разрабатываются альтернативные лечебные подходы. В связи с этим в медицине появился ряд новых методов, стимулирующих регенеративные процессы, которые сегодня можно условно разделить на 3 большие группы: введение рекомбинантных белков и пептидов (факторов роста); генная терапия (введение плазмидных или вирусных генных конструктов, кодирующих терапевтические белки); и введение клеток различного происхождения (как системно, так и локально).

Наиболее часто сердечная недостаточность возникает в результате острого инфаркта миокарда. При инфаркте миокарда (ИМ) последовательно происходят процессы воспаления, некротической и апоптотической гибели кардиомиоцитов (КМЦ), гиперплазии и ремоделирования как инфарцированного, так и здорового участка миокарда. Инфарктная зона представлена вначале некротическими массами по центру очага инфаркта и апоптотической массой гибнущих кардиомиоцитов по периферии. Постепенно пораженная зона растягивается и подвергается рубцеванию, а непораженные участки гипертрофируются и затем дилатируются, адаптируясь к новым условиям функционирования. Микроскопически наблюдается удлинение и истончение КМЦ, увеличение расстояния между кардиомиоцитами, миокардиофиброз [1]. Отсутствие выраженной способности КМЦ взрослых млекопитающих к самообновлению до недавнего времени являлось общепризнанным фактом: КМЦ не пролиферируют, а замещение дефекта сердечной мышцы происходит без их участия, в основном за счет пролиферации клеток стромы (фибробластов) [2]. Через 1–2 месяца зона инфаркта полностью замещается ригидной фиброзной тканью, лишенной сократительных элементов, с преобладанием белков внеклеточного матрикса – коллагена и эластина.

Целью восстановительной терапии после ИМ, как правило, служит стимуляция регенерации сердечной мышцы, частичное или полное восстановление способности к сокращению, стимуляции ангиогенеза в поврежденном участке и периинфарктной зоне, предотвращение повторных случаев инфаркта или других нарушений деятельности сердца.

Долгое время считалось, что клеточная репаративная регенерация миокарда невозможна, именно поэтому сердце не восстанавливает нормальную функцию после ишемического состояния. Известно, что практически все органы во взрослом организме имеют популяцию клеток–предшественников, способных к самообновлению и отвечающих за тканевый гомеостаз в норме и репарацию органа при повреждении. Существование таких групп клеток показано в костном мозге [3, 4], печени [5], подкожной жировой ткани [6], эпителии кишечника [7], эпидермисе [8] и т. д.

Взрослое сердце млекопитающих рассматривалось как орган, построенный преимущественно из КМЦ, находящихся в пост–митотическом состоянии и не имеющий эндогенной популяции стволовых клеток. В миокарде находится относительно постоянное число КМЦ, прекращающих деление после рождения. Считается, что этот жизненно необходимый орган не может восстанавливать потери функционально

* *Адрес для корреспонденции:*
Varvara Melikhova zv20@yandex.ru

активной клеточной массы, которая сопровождает инфаркт миокарда, другие повреждения миокарда и нарушения кровообращения. В ответ на функциональный стресс сердце может лишь увеличивать свою мышечную массу (миокард) за счет клеточной гипертрофии, но не гиперплазии.

Если в сердце не происходит восстановление своей структуры из-за отсутствия сколько-нибудь значимой популяции клеток-предшественников, то каким же образом сердце выполняет свою сократительную функцию десятилетиями?

В литературе имеются указания на две гипотезы, объясняющие длительное поддержание миокардом нормальной сократительной функции, посредством не внутриклеточных, а клеточных механизмов, каждая из которых имеет экспериментальные подтверждения (рис. 1):

1 – вероятно, регенеративные процессы все-таки происходят в миокарде за счет резидентных клеток, которые могут вступать в митотический цикл уже во взрослом организме при повреждении, или слияния клеток-предшественников (из КМ) с существующими КМЦ [32, 34];

2 – за счет хоуминга циркулирующих прогениторных клеток из КМ, что было показано при пересадке женского донорского сердца мужчине с последующим выявлением локализации КМЦ, несущих Y-хромосому, и этих же клеток в коронарных сосудах в пересаженном сердце [9, 10]. Т.е. клетки реципиента мигрировали и приживались в донорской ткани, формируя эндотелий и гладкомышечные клетки (ГМК) сосудов.

Таким образом, клетки, способные дифференцироваться в КМЦ во взрослом сердце предположительно могут брать свое начало из:

– циркулирующих в крови клеток-предшественников, коммитированных в соответствующем кардиомиоцитарном направлении;

– реплицирующихся предсуществующих КМЦ (предшественников КМЦ, оставшихся в миокарде после эмбриогенеза, или стволовых клеток сердца);

– сочетанием двух вышеуказанных механизмов, а также слиянием клеток-предшественников с миоцитами сердца.

Способы клеточной и генной терапии инфаркта миокарда

За последние 20 лет было разработано несколько способов терапии сердечно-сосудистых заболеваний с использованием генных и клеточных технологий. Основными целями новых методик были: улучшение сократительной функции сердца, уменьшение размеров постинфарктного рубца и предшествующего некроза, улучшение трофики миокарда путем стимуляции неоангиогенеза, предотвращения повторных инфарктов. Для достижения этих целей были использованы различные типы клеток и генных конструкций: собственные изолированные клетки костного мозга (мезенхимальные негемопоэтические) [11–13], гемапоэтические [14], а также эндотелиальные клетки-предшественники [15, 16], клетки-предшественники, циркулирующие в кровотоке, стромально-сосудистая фракция из подкожной жировой клетчатки [17], скелетные миобласты (миосателлитоциты) [18, 19]. Кроме того, использовали факторы роста, стимулирующие выход предшественников из костного мозга [20]; генные конструкции и факторы, стимулирующие ангиогенез, а также трансформированные клетки, несущие гены ангиогенеза [21]. В данный момент некоторые из описанных

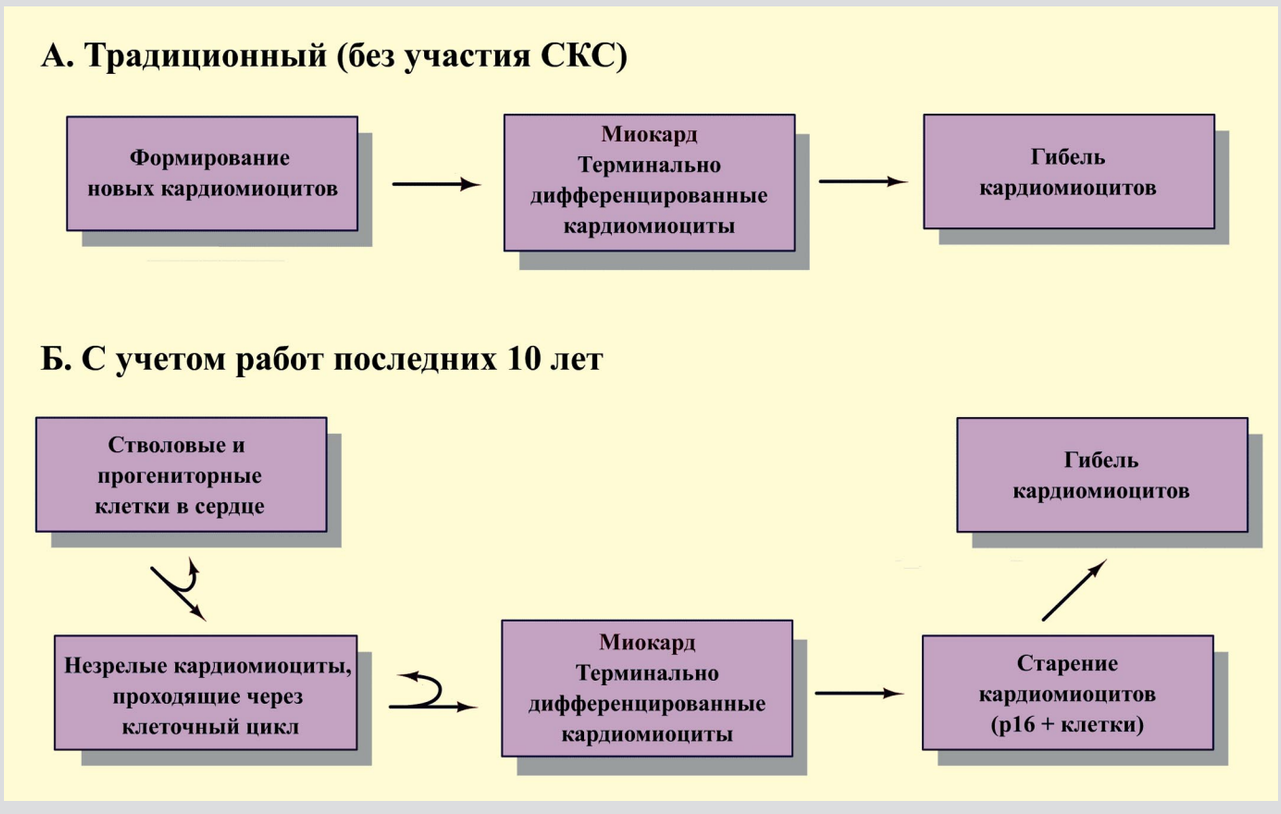

Рис. 1. Взгляды на репаративную регенерацию миокарда

способов применения СК в кардиологии находятся на I–II стадиях клинических испытаний.

Также есть сообщения о том, что сам процесс развития ишемии и формирования рубца в миокарде способствует выходу эндотелиальных предшественников в кровоток в соответствии с повышением уровня G–CSF в крови. На этом основаны первые клинические испытания этого фактора, демонстрирующие его безопасность, однако не свидетельствующие о его эффективности [22], в исследовании также описываются возможные побочные эффекты такой терапии. В процессе также участвует стромальный фактор роста (Stromal–derived factor–1), отвечающий за рекрутирование эндотелиальных предшественников в область ишемии [23].

Пересадка ген–модифицированных клеток и генных конструкций

Основной целью генотерапевтических подходов является стимуляция ангиогенеза и ограничение зоны постинфарктного рубца. В основном, работы в этом направлении были посвящены введению генных конструкций (плазмид) с последовательностями, кодирующими VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста и VEGF–R – рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста, а также снижение экспрессии TGFβ–трансформирующего ростового фактора–β, стимулирующего формирование рубца [24, 25].

Трансплантация $CD34^+$ клеток, трансфицированных плазмидой, несущей ген, кодирующий VEGF2, через неделю после экспериментального инфаркта у крыс, вызывала выход ЭПК из КМ и способствовала улучшению васкуляризации пораженного участка. Кроме того, продукт активности гена способствовал выживанию самих клеток, подавляя каспазный путь апоптоза [26].

Однако введение плазмидного вектора не слишком эффективно, т.к. степень трансфекции клеток миокарда, как правило, не превышает 10% [27]. Одним из выходов можно считать использование аденоассоциированных вирусных переносчиков [28]. Основным препятствием, ограничивающим применение вирусных переносчиков, является частое развитие иммунного ответа на вирусные белки.

Репаративная регенерация миокарда

Известно, что миокард человека не обладает достаточной способностью к восстановлению, однако существует несколько групп животных, способных после различных нарушений восстанавливать миокард естественным способом без формирования рубца.

Прежде всего, речь идет об амфибиях. Тритоны обладают удивительной способностью к регенерации поврежденной ткани сердца. Так, без формирования рубца происходит восстановление поврежденного миокарда за счет активной пролиферации собственных КМЦ животного [29].

Аквариумная рыба *Danio rerio* (zebrafish), характеризуется тем, что регенерация их сердца представляет собой наиболее удобную модель для изучения молекулярных и генетических механизмов, лежащих в основе нормальной регенерации. После хирургического удаления верхушки желудочка сердца и быстрого образования тромба было зафиксировано деление кардиомиоцитов, замещение ими дефекта и вытеснение тромбинового сгустка при минимальном рубцевании [30]. Вероятней всего, этот процесс происходит по сценарию, частично повторяющему эмбриогенез, для которого характерна последовательная экспрессия генов кардиомиоцитарной дифференцировки (Nkx–2,5, GATA–4,GATA–5, Tbx–5).

Наконец, существует линия мышей MRL (модель для изучения аутоиммунных реакций), способных восстанавливать миокард без рубцевания. КМЦ этих млекопитающих способны вступать в S–фазу и замещать участок поврежденной ткани в результате криодеструкции [31]. Считается, что эта наследуемая способность связана с измененной, по сравнению с диким типом, экспрессией матриксных металлопротеиназ, а также их ингибиторов.

Для человека подобные явления нехарактерны, однако еще в прошлом веке у биологов существовали предположения о присутствии популяции клеток, способных вносить вклад в регенеративный потенциал сердечной мышцы.

П.П. Румянцев в своей фундаментальной монографии [32] описывает несколько примеров того, что вопреки распространенным взглядам, ни одна из разновидностей КМЦ (желудочковые, предсердные, проводящей системы) даже у взрослых млекопитающих не является чистой популяцией статических или необратимых постмитотических клеток. В предсердиях млекопитающих клеток, способных вступать в митоз, ниже, чем в желудочках, но все же может доходить до 60% при обширных ИМ левого желудочка (ИМЛЖ) или до 40% при стенозе аорты у крыс (дистантная или реперфузионная пролиферация предсердных миоцитов). Напротив, периинфарктная зона желудочкового миокарда содержит не более 10% возвращающихся в митотический цикл КМЦ [32].

Как правило, реактивная репродукция КМЦ взрослых животных осуществляется согласно закономерностям их пролиферации в нормальном кардиомиогенезе. Образование миобластов, лишенных миофибрилл, путем дедифференцировки не происходит. Расположение участвующих в реактивной пролиферации КМЦ зафиксировано в составе мышечных трабекул десмосомами и вставочными дисками. Митотические циклы по продолжительности соизмеримы с самыми длинными циклами в постнатальном кардиомиогенезе [32]. Способные возвращаться в митоз КМЦ пролиферируют в основном по периферии некротических очагов или диффузно, как в предсердиях при ИМ ЛЖ (регенерационная гипертрофия).

Однако, все эти данные получены П.П. Румянцевым и коллегами с помощью метода радиоавтографии, который, без сомнения, может определить наличие делящихся клеток в образце, но не несет информации об их происхождении и функциональной значимости. Проще говоря, когда речь идет о 40% митозов в постинфарктном сердце, то, вероятно, делятся прежде всего, фибробласты стромы миокарда.

Между тем, согласно общепринятой точке зрения, КМЦ желудочков человека являются терминально дифференцированными. Их количество является фиксированным и достигает оптимума в течение нескольких месяцев после рождения. Однако в последнее время возросло количество работ, посвященных исследованию клеток–предшественников во взрослом сердце человека [33].

В одной из последних работ группы американских ученых под руководством P. Anversa показано присутствие в миокарде «стволовых клеток», которые обеспечивают его регенерацию после инфаркта. В исследование были включены сердца от пациентов, умерших в результате острого инфаркта, после трансплантации сердца, а также по причине хронических инфарктов.

Стволовые клетки сердца (СКС) выявляли по наличию на их поверхности маркеров c–kit, MDR–1, Sca–1–подобного эпитопа человека. Кроме того, эти клетки не экспрессировали факторы транскрипции и структурные белки КМЦ и ГСК. Рост СКС, их старение и смерть оценивали по длине теломерных участков хромосом с помощью метода FISH–гибридизации [34]. Пролиферацию оценивали по экспрессии белков Ki–67, MCM5 и фосфорилированной формы гистона H3 (рис. 2).

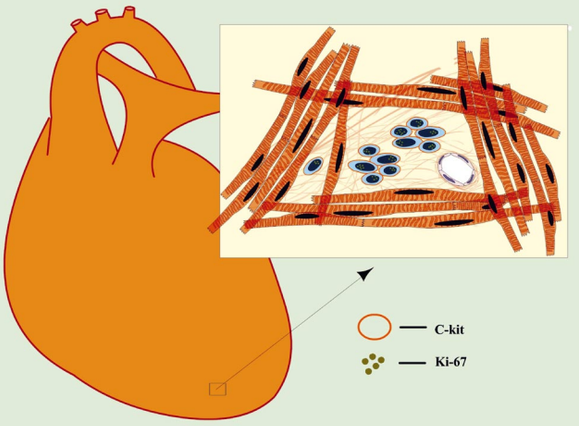

Рис. 2. Локализация СКС и исследованные антигены

Таблица. **Характеристика СКС по данным литературы**

Характеристика	c-kit	Sca-1	MDR-1	IsL-1
Кардиомиогенная дифференцировка	+	+	+	+
Клоногенность	+	+	+	Нет данных
Способность к самообновлению	+	+	+	+
Мультипотентность	+	+	+	Нет данных
Формирование кардиосфер	+	+	+	Нет данных
Присутствие в фетальном/ взрослом сердце	+	+	+	+

Остановимся подробнее на использованных маркерах. Ki–67 – ядерный антиген, экспрессирующийся в большинстве пролиферирующих клеток организма человека на всех стадиях клеточного цикла (кроме Go) [35]. Наиболее явно антиген выявляется в S–фазе. Авторы работы сравнивают коэкспрессию Ki–67 и саркомерного α–актина (одновременное окрашивание) в нормальном миокарде и постинфарктном сердце. В работе [36] проанализирован материал 20 человеческих сердец после острого инфаркта, 20 – на последней стадии постинфарктной кардиомиопатии и 12 контрольных сердец. Повышенное количество делящихся клеток было достоверно зафиксировано при остром и хроническом инфарктах по сравнению с контролем. Количество СКС возрастало с 1,5% в контроле до 28% в остром инфаркте и до 14% в случае хронического инфаркта (по уровню активности теломеразы). Митотический индекс СКС возрастал в 29 раз при остром инфаркте, в 14 раз – при хроническом. Количество СКС, коммитированных в КМЦ, гладкомышечные клетки и эндотелий возрастало в 85 раз в случае острого инфаркта, в 25 раз – при хроническом инфаркте. Однако количество апоптотических $p16^{INK4a}$ и p53–позитивных СКС также возрастало и составило 10, 18, 40% в контроле, хроническом и остром инфарктах соответственно [37]. По результатам экспериментов, размеры lin(–) клеток, а точнее, их объем, составил 203±50 μм^3. Т.е. это были достаточно мелкие клетки, по сравнению с другими типами клеток в сердце.

Стареющие СКС имели короткие теломеры и 0,3%, 3,8%, 9,6% клеток гибли апоптотическим путем в контроле, при хроническом и остром инфарктах соответственно. Эти параметры значительно сокращали количество функционально компетентных СКС с 26 тысяч на см^3 в жизнеспособном миокарде в случае острого инфаркта, до 7 тыс. на см^3 при хроническом инфаркте. В семи случаях острых инфарктов были обнаружены кластеры спонтанной регенерации миокарда без видимого слияния клеток.

Во всех исследованных сердцах около 60% СКС коэкспрессировали c–kit, MDR–1, Sca–1–подобный эпитоп, и лишь незначительный процент клеток демонстрировал присутствие одного или двух из этих антигенов. Количество СКС в жизнеспособном миокарде возрастало при остром инфаркте до 40 тыс. на 1 см^3 ткани в пограничной зоне и 20 тыс. на 1 см^3 в отдаленных участках. В случае хронического инфаркта, где сложно четко выделить пограничную зону, количество СКС в целом было снижено (табл.).

Таким образом, ученые заключили, что во взрослом сердце присутствует пул СКС, а их активация происходит преимущественно при ишемических состояниях, как ответ на ишемию (гипоксию) ткани. Потеря функционально значимых СКС при хронических ишемических кардиомиопатиях может лежать в основе прогрессивного изнашивания ткани и ее гибели.

В семи сердцах с острым инфарктом были обнаружены зоны интенсивной спонтанной регенерации миокарда. Они представляли собой кластеры размером от 500 μм^3 до 5 мм^3. Похожее явление не было обнаружено в случаях хронических инфарктов. Отсутствие слияния исследователи доказывали наличием в ядрах мужских сердец одной Х– и одной У–хромосом, и двух Х–хромосом – в женских сердцах. Незрелые клетки были обнаружены и в стенке сосудов.

Таким образом, главным результатом этой работы является то, что исследователи показали присутствие незрелой популяции клеток в ткани взрослого сердца, способных к делению и дифференцировке в КМЦ, ГМК, эндотелий, организующиеся в сосудоподобные структуры.

Закономерным вопросом является происхождение этой популяции СКС. На данный момент в источниках литературы называют два возможных пути попадания таких клеток в миокард. Первый – СКС – это клетки, сохранившиеся с эмбриогенеза и не прошедшие все стадии дифференцировки. Известно, что сердце, кровеносные сосуды, клетки крови и гладкая мускулатура развиваются из несегментированной мезодермы боковых пластинок [38]. Система кровообращения является первой функциональной единицей зародыша, а сердце – его первым функциональным органом. Презумптивные клетки сердца мигрируют из боковых участков мезодермы. Когда же клетки достигают передней области зародыша, миграция прекращается. Клетки будущего сердца, двигаясь между эктодермой и энтодермой к середине зародыша, сохраняют тесный контакт с поверхностью энтодермы посредством участия кадгеринов. Причем миграция осуществляется путем хемотаксиса на факторы, секретируемые энтодермой – BMPs, IGF, TGF–β, FGF, LIF, запуская кардиомиогенную дифференцировку примитивных клеток. Введение BMP–2 и BMP–4 *in vivo* вызывает эктопическую экспрессию транскрипционных факторов кардиомиогенеза: Nkx–2.5; GATA–4; GATA–5; GATA–6; MEF2; eHAND; и dHAND, а также структурных и сократительных белков кардиомиоцитов, например, тяжелых цепей сердечного миозина (ventricular myosin heavy chain, vMHC) и тропонина С [39].

Показано также, что Nkx–2.5 вызывает дифференцировку мигрирующих клеток мезодермы в зрелые КМЦ [40, 41]. Nkx–2.5 активирует синтез и других транскрипционных факторов, в особенности – семейства GATA и MEF2. При правильной временной и пространственной организации экспрессии всех этих факторов начинается сборка специфических полимеров сердечных белков (сердечные изоформы актинина, β–миозина, предсердного натрий–уретического пептида и т.д.), созревание органелл и сократительного аппарата. Активность энтодермы в отношении клеток–предшественниц сердечной мышцы, проявляющаяся в секреции BMPs, может однако, эффективно подавляться сигнальными молекулами–антагонистами, такими как Noggin, который, связываясь с BMP, полностью блокирует кардиомиогенез. Кроме того, естественными антагонистами генов кардиомиогенной дифференцировки являются Wingless (Wg) у дрозофилы и Wnt у человека [42]. Дифференцировка клеток различных сердечных отделов происходит последовательно: сначала дифференцируются клетки желудочков, а уже затем – клетки предсердий [43]. Таким образом, кардиомиогенез является многоступенчатым процессом, который регулируется иерархией растворимых факторов (роста), определяющих каждую стадию морфогенеза сердца. Можно предположить, что на всех ступенях этого процесса в тканях сердца будут оставаться клетки, в которых была заблокирована терминальная дифференцировка.

Другой гипотезой возникновения СКС в миокарде взрослых млекопитающих является их миграция с участием специфических медиаторов из костного мозга в процессе воспаления. Такие клетки в последствии приживаются в миокарде и могут способствовать его регенерации, дифференцируясь в КМЦ, эндотелий, ГМК или сливаясь с существующими КМЦ. Предположительно, в этих процессах могут активно участвовать лиганд–рецепторные оси типа SDF–1/CXCR–4 [44].

Выделение, характеристика и локализация СКС в миокарде

Во многих работах исследователи выделяли клетки из взрослого сердца на основе присутствия маркеров стволовых клеток, которые не только экспрессировали их, но также вели себя как истинные предшественники кардиомиоцитов, давая клоны *in vitro*, экспрессирующие биохимические маркеры КМЦ, ГМК и эндотелия [45].

Другой характеристикой «стволовости» таких клеток является поддержание целостности структур теломер хромосом вследствие нормального (активного) функционирования теломеразы – фермента, осуществляющего пострепликативное достраивание ДНК теломерных участков.

Уровень этого фермента в сердце снижается вскоре после рождения животного и выхода КМЦ из клеточного цикла. Интересно, что активность теломеразы во взрослом миокарде обнаруживается лишь в маленькой популяции клеток сердца, экспрессирующих Sca–1, но не демонстрирующих присутствия каких либо маркеров гемопоэтических стволовых клеток (c–kit, CD45, CD34) и эндотелиальных предшественников (CD45, CD34, Flk–1,Flt–1) [45].

Выделенные и очищенные сердечные Sca–1–позитивные клетки специфически мигрируют в ишемизированный миокард при их системном введении и активируют кардиомиогенную программу дифференцировки в СК миокарда. Их значительное количество сливается с присутствующими там КМЦ.

Sca–1–позитивные клетки способны дифференцироваться в КМЦ в культуре. Так, в работе [46] показана дифференцировка Sca–1–позитивных клеток грызунов (популяция отбиралась с помощью сортинга на магнитных бусах) в сокращающиеся кардиомиоциты в культуре. Кроме того, эти клетки отличало высокое значение соотношения объема цитоплазмы к объему ядра. Эти клетки также дифференцировались в КМЦ, ГМК и эндотелий и положительно влияли на сердечную функцию у крыс, перенесших инфаркт. Использование конфокального микроскопа позволило воссоздать трехмерную картину поврежденного миокарда с делящимися кластерами клеток на толстых срезах сердца (ранее рассматривались лишь тонкие и полутонкие). Пока не ясна связь этих клеток с малочисленными кардиомиогенными предшественниками КМЦ, которые поддерживают способность пролиферировать в ответ на поражение миокарда и постоянно обновляются за счет дифференцировки клеток, подобных стволовым [42, 45, 46].

Происхождение этих клеток попытались объяснить в работе [46] – это $Lin^-/c–kit^+$ клетки, выделенные из взрослого сердца крыс. По своим характеристикам это самообновляющаяся, $Lin^-/c–kit^+$, клоногенная популяция клеток, мультипотентная, дающая *in vitro* и *in vivo* начало КМЦ, ГМК, эндотелиальным клеткам. При локальном инициировании в поврежденный крысиный миокард они способствуют восстановлению до 70% пораженной ткани [46].

E. Messina с соавт. (2004) сообщают о выделении предшественников кардиомиоцитов из взрослого сердца мышей и человека и показывают также клоногенность этих клеток, малый размер, их способность к образованию клеточных кластеров в культуре («кардиосфер»), экспрессирующих маркеры стволовых клеток, эндотелия и КМЦ. В предыдущих работах отмечалось, что регенерировавший миокард, также содержит именно эти клетки – малые кардиомиоциты [47]. Эти данные свидетельствуют о том, что обновление в миокарде может происходить именно за счет клеток – сердечных предшественников, однако активность этого процесса на очень низком уровне.

Представляет интерес использование в терапевтических целях возможности мобилизации эндогенных клеток–предшественников КМЦ из их ниши – в пределах здорового сердца. В работе K.–L. Laugwitz и соавт. (2005) показано присутствие $isl–1^+$ клеток в постнатальном сердце крыс, мышей и человека [48]. Исследователи использовали isl–1 в качестве маркера недифференцированных предшественников КМЦ в эмбриогенезе. Islet–1 – LIM представляет собой гомеодоменный фактор транскрипции, маркирующий клеточную популяцию, вносящую заместительный вклад в развитие эмбрионального сердца [48]. Субпопуляция $isl–1^+$ недифференцированных предшественников остается в сердце эмбриона мыши продолжительное время после рождения, их число значительно снижается в период с 12,5 по 18,5 сут. эмбрионального развития. После рождения лишь незначительное количество $isl–1^+$ кардиомиобластов все еще выявляется в (500–600) в миокарде 1–5–дневных крыс. Места скопления (кластеры) $isl–1^+$ клеток были обнаружены и в предсердии, тогда как в желудочке выявлялись лишь единичные клетки.

Эксперименты по кокультивированию с неонатальными КМЦ другой линии мышей показывают, что $isl–1^+$ клетки представляют собой аутентичную эндогенную популяцию предшественников (кардиомиобластов), которые демонстрируют высокоэффективную степень превращения в клетки с фенотипом «взрослых» КМЦ, со стабильной экспрессией маркеров КМЦ (25%) в отсутствие слияния и обычным метаболизмом Ca^{2+}.

Похожие эксперименты проводили на мышах, популяцию резидентных клеток– предшественников из сердца характеризовали как $CD31^-/Sca1^+$ клетки. Популяцию характеризовали по способности исключать ядерный краситель Hoechst, за это свойство обычно отвечает MDR–1 (multi drug

resistance) – это белок, способный выкачивать из клетки лекарственные вещества и красители. Далее, на выделенных клетках продемонстрировали экспрессию CD31 и Sca1, а также не обнаружили маркера islet–1 [49].

Исследователи продемонстрировали дифференцировку $CD31^{-}/Sca1^{+}$ клеток в КМЦ с присущими им биохимическими маркерами и функциональными свойствами (способностью к сокращению, особыми ионными токами) при кокультивировании со взрослыми КМЦ. Для такой дифференцировки необходим контакт со зрелыми КМЦ из сердца, который становится внешним сигналом из микроокружения, влияющим на клетку–предшественник.

Распределение (локализация) СКС в сердце

Несколько работ посвящено выделению и распределению незрелых клеток – предшественнников в миокарде млекопитающих [42, 50, 51].

Локализация и специфические функции тех или иных групп клеток в сердце зависят от механической нагрузки, приходящейся на данный участок ткани. Нагрузка на стенку желудочка распределена следующим образом – она максимальна в базальной части и середине стенки и значительно снижается к верхушке, наименьший «механический стресс» зафиксирован в предсердии.

По результатам исследований, именно участки с наименьшей нагрузкой являются нишами для СКС. Однако для них характерно и образование кластеров в срединной части стенки желудочка (рис. 3).

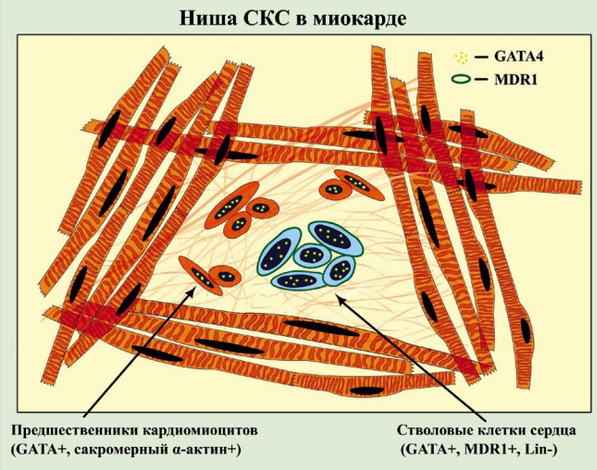

Рис. 3. Тканевая ниша СКС

Таким образом, явление распределения ниш для СКС зависит от механической нагрузки в данной анатомической области органа. Гомеостаз в таких нишах определяется равновесием между симметричным и асимметричным делением СКС. Кроме того, незрелые клетки в нишах формируют контакты с окружающими поддерживающими клетками посредством интегринов и коннексинов [51].

Заключение

В данный момент ведется поиск оптимального источника клеток для поддержания функций постинфарктного миокарда. Основными целями остаются улучшение кровоснабжения, увеличение объема фракции выброса, предотвращение повторных инфарктов. Существует ряд вопросов, требующих ответа перед проведением трансплантации. Это происхождение клеточного материала (сейчас предпочтение отдается аутогенным клеткам), способ дифференцировки и ее необходимость, количество вводимых клеток и способ их введения.

Основными, максимально изученными на данный момент клетками остаются мезенхимальные клетки костного мозга; однако эффективность их применения до сих пор однозначно не доказана. Также стоит упомянуть, что клинические испытания СК в кардиологии хотя и сопряжены с рядом трудностей, все равно опережают фундаментальные исследования в этой области по темпам своего развития.

С появлением ряда работ, посвященных описанию популяции клеток сердца, способной самообновляться, делиться и дифференцироваться в ответ на нарушение, возникла возможность приблизиться к пониманию функций СКС, их локализации, молекулярной характеристики и механизмов их возможной активации.

Кроме того, существует мнение, что эффект от введения клеток различного фенотипа, использующихся в предварительных клинических экспериментах, может быть обусловлен именно активацией резидентных СКС [52, 53].

Перспективным направлением представляется использование СКС и в клеточной терапии в кардиологии. Эти клетки аутогенны, исходно расположены в сердце и связаны с кардиомиоцитами и эндотелием сосудов сердца по происхождению и локализации. Таким образом, в будущем применение СК в кардиологии связано не только с введением стволовых клеток непосредственно в миокард или кровоток, мобилизацией незрелых клеток, а также с манипулированием и попыткой регулирования деятельности СКС. Возможно, наилучшего результата можно достичь при сочетании всех трех способов.

Объяснением недостаточной регенерации во время инфаркта может служить предположение, что СКС приспособлены к поддержанию нормального баланса клеточной гибели и самообновления миокарда в норме (низкими темпами) и их способности и количества недостаточно для обеспечения адекватной репарации при последствиях ишемии. Существует острая необходимость в понимании роли экзогенных сигналов (с помощью цитокинов и ростовых факторов) для разработки способов стимуляции СКС прямо в миокарде. Остается ряд вопросов, на которые необходимо найти ответы перед началом терапевтического использования СКС:

1. Как обеспечить перемещение СКС из места их расположения (ниш) в ишемизированный или поврежденный инфарктом участок?
2. Каким образом активировать их пролиферацию и дифференцировку?
3. Как преодолеть недостаток кровоснабжения в пораженном участке и перекинуть сосудистый «мост» между здоровой и ишемизированной тканью?

ЛИТЕРАТУРА:

1. Cleland J.F.G., McGowan J. Heart Failure due to Ischaemic Heart Disease: Epidemiology, Pathophysiology and Progression. J Cardiovasc Pharmacol 1999; 33(suppl. 3):S17–S29.

2. Kim W.H., Joo C.U., Ku J.H. et al. Cell cycle regulators during human atrial development. Korean J Intern Med 1998; 13(2):77–82.

3. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., et al. Mobilized bone marrow repair the infracted heart, improving function and survival. PNAS 2001; 98: 10344–10349.

4. Friedenstein A.J., Gorskaja J.F., Kulagina N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol 1976; 4: 267–274.

5. Koh G.Y., Soonpaa M.H., Klug M.G., et al. Stable fetal cardiomyocyte grafts in the hearts of dystrophic mice and dogs. J Clin Invest 1995; 96(4):2034–42.

6. Leor J., Patterson M., Qumones M.J. et al. Transplantation of Fetal Myocardial Tissue Into the Infarcted Myocardium of Rat A Potential Method for Repair of Infarcted Myocardium? Circulation 1996; 94: 332–336.

7. Li R.K., Mickle D.A.G., Weisel R.D. et al. Natural history of fetal rat cardiomyocytes transplanted into adult rat myocardial scar tissue. Circulation 1997; 96:179–187.

8. Fernandes K. J. L., McKenzie I. A., Mill P., Smith K. M., Akhavan M., Barnabй–Heider F. A dermal niche for multipotent adult skin–derived precursor cells. Nat Cell Biol 2004; 6: 1082 – 1093.

9. Quaini F., Urbanek K., Beltrami A.P., Finato N., Beltrami C.A., Nadal–Ginard B., Kajstura J., Leri A., Anversa P. Chimerism of the transplanted heart. N. Engl. J. Med. 2002; 346: 5–15.

10. Muller A., Pfeiffer P., Koglin J., Schдfers H–J., Seeland U., et al. Cardiomyocytes of non–cardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. Circulation 2002; 106 : 31–35.

11. Strauer B.E., Brehm M., Zeus T., Kцstering M., Hernandez A., et al. Repair of infracted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. Circulation 2002; 106: 1913–1918.

12. Wollert K.C., Lotz M. J., Lichtenberg S. R., Lippolt P., Breidenbach C., Fichtner S., Korte T., Hornig B., Messinger D. Intracoronary autologous bone–marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. Lancet 2004; 364: 141–148.

13. Katritsis D.G., Sotiropoulou P.A., Karvouni E. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infracted human myocardium. Catheter Cardiovasc Interv 2005; 65: 321–329.

14. Archundia A., Aceves J.L.,Lopez–Hernandez M., et al. Direct cardiac injection of G–CSF mobilized bone–marrow stem–cells improves ventricular function in old myocardial infarction. Life Sci 2005; 78: 279–283.

15. Stamm C., Westphal B., Kleine H.D., Petzsch M., Kittner C., et al. Autologous bone–marrow stem–cell transplantation for myocardial regeneration. Lancet 2003; 361: 45–46.

16. Bartunek J., Vanderheyden M., Vandekerckhove B., et al. Intracoronary injection of CD133–positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. Circ 2005; 112: I178–I183.

17. Watanabe C. Intracoronary adipose tissue derived stem cell therapy preserves left ventricular function in a porcine infarct model. Paper presented at Transvascular Cardiovascular Therapeutics Annual Meeting, September 2004, Washington DC, USA.

18 . Schдchinger V., Tonn T., Dimmeler S., et al. Bone–marrow–derived progenitor cell therapy in need of proof of concept: design of the REPAIR–AMI trial. Nat Clin Prac Cardiovasc Med 2006; 3 (1): 23–28.

19. Menasche P., Hagege A. A., Vilquin J.T., Desnos M., et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol 2003; 41:1078–83.

20. Erbs S. Linke A., Adams V.,et al.. Transplantation of blood–derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo controlled study. Circ Res 2005; 97: 756–762.

21. Tirziu D., Simons M. Angiogenesis in the human heart: gene and cell therapy. Angiogenesis. 2005;8(3): 241–51.

22. Ripa R.S., Jorgensen E., Wang Y., et al. Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte–colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST–elevation myocardial infarction: result of the double–blind, randomized, placebo–controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. Circulation2006; 113: 1983–1992.

23. Askari A.T., Unzek S., Popovic Z.B., et al. Effect of stromal–cell–derived factor 1 on stem–cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. Lancet 2004; 362 : 697–703.

24. Okada H., Takenura G., Kosai K., et al. Postinfarction gene therapy against transforming growth factor–beta signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure. Circ 2005; 111:2430–2437.

25. Losordo D.W. Vale P.R., Hendel R.C., Milliken C.E., Fortuin F.D. Phase × placebo–controlled, double –blind, Dose–escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer be catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. Circ 2002; 105:2012–2018.

26. Shintani S., Kusano K., Ii M., Iwakura A., Heyd L. et al. Synergistic effect of combined intramyocardial CD34+ cells and VEGF2 gene therapy after MI. Nat ClinPract Cardiovasc Med 2005; 2:123–128.

27.Pislaru S.V., Simari R.D. Gene transfer for ischemic cardiovascular disease: is this the end of the beginning or the beginning of the end? Nat ClinPract Cardiovasc Med 2005; 2: 138–144.

28. Vassalli G., Bueler H., Dudler J., von Segesser L.K., Kappenberger L. Adeno–associated virus (AAV) vectors achieve prolonged transgene expression in mouse myocardium and arteries in vivo: a comparative study with adenovirus vectors. Int J Cardiol 2003; 90: 229–238.

29. Brockes J.P., Kumar A., Velloso C.P. Regeneration as an evolutionary variable. J Anat 2001; 199: 3–11.

30. Poss K.D., Wilson L.G., Keating M.T. Heart regeneration in zebrafish. Science 2002; 298: 2188–2190.

31. Leferovich J.M. Bedelbaeva K., Samulewicz S., Zhang X.M., Zwas D. Heart regeneration in MRL mice. PNAS 2001; 98:9830–9835.

32.Румянцев П.П. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации. Наука; 1982.

33. Urbanek K., Quaini F., Bolli R., Leri A., Kajstura J., Anversa P. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. PNAS 2005; 102(24):8692–7.

34. Varma J., Prabhu S., Anversa P.A., Bolli R. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(10):3766–71.

35. Beltrami A.P., Urbanek K., Kajstura J., et al. Evidence that ь human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. N Engl J Med 2001; 344: 1750–1757.

36. Beltrami A.P. Urbanek K., Kajstura J., Yan S.M., Finato N., et al. Cardiac c–kit positive cells proliferate in vitro and generate new myocardium in vivo. Circulation 2001; 104: 324.

37. Oh H., Wang S. C., Prahash A., Sano M., Moravec C. S., at al. Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. PNAS 2003;100:5378–5383.

38. Gilbert S. F. Developmental Biology. 6th ed, 2000.

39. Tzahor E., Lassar A. B. Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis. Genes Dev 2001; 15:255–260.

40. Schultheiss T.M., Xydas S., Lassar A.B. Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. Development 1995; 121(12):4203–14.

41. Andree B., Duprez D., Vorbusch B., Arnold H.H., Brand T. BMP–2 induces ectopic expression of cardiac lineage markers and interferes with somite formation in chicken embryos. Mech Dev 1998;70(1–2):119–31.

42. Moon R. T., Brown J. D., Torres M. WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. Trends Genet 1998; 13:157–162.

43. Markwald R. R., Trusk T., Moreno–Rodriguez R. Formation and septation of the tubular heart: Integrating the dynamics of morphology with emerging molecular concepts. In M. de la Cruz and R. R. Markwald (ed.), Living Morphogenesis of the Heart. Birkhauser Press, Boston; 1998.

44. Smadja D.M., Bieche I., Uzan G., Bompais H., Muller L., et al. PAR–1 activation on human late endothelial progenitor cells enhances angiogenesis in vitro with upregulation of the SDF–1/CXCR4 system. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25(11):2321–7.

45. Gallo P., Peschle C., Condorelli G. Sources of cardiomyocytes for stem cell therapy: an update. Pediatr Res 2006; 59(4):79R–83R.

46. Beltrami A.P., Barlucchi L., Torella D., et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell 2003; 114: 763–776.

47. Messina E., Angelis L.D., Frati G., et al. Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells From Human and Murine Heart. Circ Res 2004; 95: 911–921.

48. Laugwitz K–L., Moretti A., Lam J., et al. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages, Nature 2005; 433 :647–653.

49. Wilson S. F., Colucci M.D., Liao R., Pfister O., Mouquet F., et al. CD31– but Not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. Circ Res. 2005; 97:52–61.

50. Cesselli D., Beltrami A.P., Urbanek K., Kajstura J., et al Cardiac stem cells are nested in niches of the adult mouse heart and possess the ability to divide and differentiate in the various cardiac lineages. Circulation 2002; 106: II–14.

51. Urbanek K., Cesselli D., Rota M., Nascimbene A., Angelis A., HosodaT., Bearzi C., Boni A, Bolli R., Kajstura J., Anversa P., Leri A. Stem cell niches in the adult mouse heart. PNAS 2006; 103 (24): 9226–9231.

52. Yoon Y.S., Wecker A., Heyd L., et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. J Clin Invest 2005; 115:326 –38.

53.Behfar A., Zindman L.V., Hodgson D.M., et al. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. FASEB J 2002; 16: 1558–66.