

Д.В. Гольдштейн^{1,3}, Т.Х. Фатхудинов^{2,3}

¹ ФГБУ "Медико-генетический научный центр" РАМН, Москва

² ФГБУ "НИИ морфологии человека" РАМН, Москва

³ ЗАО «РеМеТэкс», Москва

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ клеточной терапии миокарда

В данной работе проводится анализ литературных и собственных результатов исследований в области клеточной терапии миокарда. Сформулированы основные нерешенные вопросы этой области регенеративной медицины.

Ключевые слова: клеточная терапия, заболевания сердца, репаративная регенерация.

16

В конце XX века благодаря развитию молекулярной и клеточной биологии были разработаны методики селективного изолирования и культивирования стволовых/прогениторных клеток, а в 1998 г. Джеймс Томпсон получил первую линию эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) из бластоцисты [1]. Все это создало предпосылки для проведения многочисленных экспериментальных работ по изучению свойств полученных *in vitro* клеток. В фундаментальной биологии и медицине появились новые направления исследований по изучению роли стволовых/прогениторных клеток в процессах роста, развития, репаративной регенерации и при развитии опухолей. В настоящее время технические возможности позволяют в лабораторных условиях выделять, наращивать и модифицировать стволовые/прогениторные клетки из самых различных источников. Широкое развитие исследований по применению клеток для лечения многих заболеваний открыло новую главу в медицинской науке, которую называют регенеративной медициной.

Одним из самых активно развивающихся направлений регенеративной медицины является клеточная терапия миокарда. Актуальность изучения репарации миокарда и методов, направленных на ее стимуляцию, обусловлены крайне высокой распространенностью и летальностью от сердечно-сосудистых заболеваний [2]. Несмотря на достижения в профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний, возможности терапевтического и хирургического лечения такого их наиболее частого осложнения, как хронической сердечной недостаточности (ХСН), к настоящему времени исчерпаны [3]. Единственным эффективным методом лечения тяжелой ХСН считают трансплантацию сердца, однако вследствие дефицита донорских органов эту проблему решить невозможно [4]. В качестве «моста» к трансплантации сердца (или даже альтернативы) многими исследователями была

предложена клеточная терапия миокарда [5]. Технологии применения клеточной терапии в кардиологии разрабатывают уже на протяжении 15 лет. Накоплено достаточно экспериментальных и клинических данных, однако в этой области регенеративной медицины по-прежнему остаются нерешенными многие вопросы, которые мы попытаемся сформулировать в данной работе.

Современное состояние исследований

На сегодняшний день уже не возникает сомнений в том, что восстановительные процессы в миокарде происходят не только за счет образования рубца и гипертрофии сохранившихся кардиомиоцитов (КМЦ), но и за счет пролиферации резидентных и экзогенных (внесердечных) клеток-предшественников [6]. К резидентным клеткам относят сами КМЦ, которые в определенных условиях способны к ограниченной пролиферации. Еще П.П. Румянцев показал, что КМЦ не являются терминально дифференцированными клетками [7]. Было неоднократно доказано, что после повреждения миокарда увеличивается число диссоциированных КМЦ, выявляются признаки синтеза ДНК, рабочие КМЦ положительно окрашиваются моноклональными антителами (МАТ) к маркерам пролиферации (Ki67), и, возможно, происходит дедифференцировка КМЦ, после чего они вступают в митоз [8]. Все эти данные демонстрируют возможность рабочих КМЦ пролиферировать и участвовать в репарации миокарда.

Кроме того, в последнее время активно обсуждается гипотеза существования камбиальных (стволовых) клеток сердца. Так, группой ученых под руководством Р. Anversa [6] в верхушке и предсердиях сердца были выявлены так называемые ниши, в которых исследователи обнаружили скопление мелких округлых клеток, экспрессиру-

Goldshstein D.V.^{1,3}, Fatkhudinov T.Kh.^{2,3}

¹ Research Center for Medical Genetics RAMS, Moscow

² Institute of Human Morphology RAMS, Moscow

³ Remetex Close Corporation, Moscow

Actual Problems of Cell Therapy for Cardiac Diseases

This article reviews the literary and own dates of cell therapy for cardiac diseases. The principal unresolved issues were formulated.

Key words: cell therapy; cardiac diseases; reparative regeneration.

ющих маркеры недифференцированных клеток (c-kit), транскрипционные факторы ранних кардиомиобластов (GATA4, MEF2C) и одновременно белки, характерные для зрелых КМЦ (connexin43, α -sarcomeric actin). Основываясь на комбинации дифференцировочных маркеров, ученые предположили, что эти клетки являются стволовыми клетками сердца. Однако после этого не последовало работ, прямо демонстрирующих возможность этих стволовых клеток сердца дифференцироваться в рабочие КМЦ и клетки кровеносных сосудов в условиях повреждения миокарда.

Но, даже если учитывать наличие камбия в сердце, система репаративной регенерации сердца является несостоятельной и не обеспечивает органотипической регенерации. Эволюционно сложился дополнительный механизм репарации миокарда, а именно участие в этом процессе экзогенных внесердечных клеток-предшественников КМЦ. Давно было отмечено, что при разнополю трансплантации красного костного мозга при гемобластозах происходит химеризация миокарда [9]. Тогда на аутопсии в сердце реципиента женского пола выявлялись КМЦ с Y-хромосомой. Это позволило предположить, что клетки красного костного мозга после гибели КМЦ мигрируют в область повреждения, дифференцируются в КМЦ и обеспечивают замещение погибших сократительных элементов. Химеризацию при трансплантации костного мозга наблюдали не только в тканях сердца, но и печени, почек и др. органах [10]. Таким образом, концепция клеточной терапии основывается на предположении о дифференцировке экзогенных клеток-предшественников в специализированные клетки поврежденной ткани.

Благодаря развитию этой концепции стали появляться тысячи научных публикаций, посвященных трансплантации клеток самых разных фенотипов для замещения погибших КМЦ. В последнее время интенсивность экспериментальных и клинических исследований в нашей стране и за рубежом в области клеточной терапии миокарда не только не снизилась, но и продолжает нарастать, что свидетельствует об актуальности и перспективности этого направления. Можно выделить две основные нозологические формы, в отношении которых проводится большинство экспериментальных и клинических исследований по клеточной терапии: острый инфаркт миокарда (ОИМ) и хроническая сердечная недостаточность (ХСН). При всех вариантах поражения сердца целью трансплантации клеток является стимуляция образования новых кровеносных сосудов и восстановление сократительных элементов сердца.

В настоящее время в лабораторных условиях получить КМЦ и клетки кровеносных сосудов не сложно. Их можно выделить из тканей, уже содержащих эти клетки, например из фетального сердца [11], либо предифференцировать из клеток-предшественников красного костного мозга. Существуют отработанные протоколы, позволяющие получать *in vitro* КМЦ из гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и из мультипотентных стромальных клеток (МСК) [12]. Однако это совсем не означает, что эти же клетки *in situ* также будут дифференцироваться в КМЦ, эндотелий и т.п. под действием местного микроокружения.

Данные, полученные в многочисленных экспериментальных исследованиях на лабораторных животных, продемонстрировали высокую эффективность трансплантации клеток, что выражалось в уменьшении размера инфаркта или рубца, гипертрофии перифокального миокарда, обратном ремоделировании левого желудочка (ЛЖ), увеличении количества и объемной плотности кровеносных сосудов в области повреждения [13]. Все это приводило

к улучшению локальной и глобальной сократимости ЛЖ, увеличению фракции выброса и функции сердца в целом. В ранних публикациях с помощью различных методов витального маркирования клеток исследователи получали подтверждение кардиомиогенеза и ангиогенеза с участием трансплантированных клеток [14]. Позже стали появляться публикации, в которых не выявляли образования новых КМЦ из трансплантированных клеток, а улучшение сократительной функции миокарда ЛЖ оказалось более чем умеренным [15–17]. Однако при анализе противоречивых результатов экспериментальных исследований необходимо учитывать, что чаще всего в них не применяли единые подходы в получении клеток, выборе сроков и способов введения клеток и методов верификации результатов. Так или иначе, проведенные экспериментальные исследования послужили основанием для начала клинических испытаний трансплантации клеток.

Клинические исследования позволили более объективно оценить результаты клеточной терапии миокарда. Главное, что удалось продемонстрировать в результате многочисленных клинических исследований — это безопасность технологий. Стало ясно, что трансплантация клеток не приводит к клинически выраженным иммунологическим реакциям, эктопическому остеогенезу, образованию опухолей, тромбоэмболическим и токсическим осложнениям [18]. Однако относительно эффективности клеточной терапии миокарда в литературе можно найти неоднозначные результаты. В подавляющем большинстве исследований авторы утверждают, что трансплантация клеток достоверно эффективна, но при рассмотрении динамики конкретных показателей сердечной деятельности выявляется, что изменяются они весьма умеренно. Так, фракция выброса (ФВ) после введения клеток при ОИМ и ХСН изменяется в пределах 5 – 15% [19]. Все же нужно учитывать, что динамика эхокардиографических показателей не всегда коррелирует с субъективными показателями клинического состояния больного, таких как толерантность к физическим нагрузкам, индексы качества жизни (DASI) и др. [20]. Поэтому необходим поиск более специфичных и чувствительных методов обследования и обязательное исключение плацебо-эффекта.

Сейчас стало ясно, что клеточная терапия не является радикальным методом лечения, приводящим к избавлению от тяжелых заболеваний сердца, но в составе комплексного лечения может служить мостом к хирургической операции и трансплантации сердца. Это особенно актуально для больных, у которых медикаментозное лечение неэффективно, а хирургические операции им не показаны в связи с тяжестью их состояния. Трансплантация клеток в составе комплексного лечения может существенно улучшить результаты терапии и обеспечить подготовку пациента к оперативному вмешательству или улучшить результаты хирургического лечения [20].

Тем не менее, остается нерешенным целый ряд вопросов, которые мы подробно обсудим ниже.

Какие клетки трансплантировать?

С целью стимуляции ангиогенеза и репарации миокарда применяют самые различные варианты клеточных трансплантатов. В самом начале развития данного направления проводили исследования, в которых изучали влияние трансплантации даже кожных фибробластов [21] на восстановительные процессы в сердце. Фетальные КМЦ трансплантировали во многих экспериментальных и клинических исследованиях и полу-

чали положительные результаты. Эти клетки хорошо пролиферируют в культуре и обладают всеми необходимыми для КМЦ свойствами, в том числе электромеханическими. Они эффективно приживаются, формируют щелевые контакты с КМЦ хозяина и обеспечивают улучшение сократительной функции миокарда [11]. Однако, учитывая их аллогенное происхождение, нельзя исключить элиминацию этих клеток иммунной системой. Кроме того, существуют этические ограничения, препятствующие использованию фетального материала.

Позднее большие надежды возлагали на скелетные миобласты, которые можно выделить и нарастить в необходимом количестве из мышечной ткани самого больного. Но существенные различия между электромеханическими свойствами миобластов и КМЦ приводило к формированию аритмий и десинхронизации функционального синцития сердца. Проведенные клинические исследования не продемонстрировали значительной эффективности применения скелетных миобластов [22].

В настоящее время в качестве основного источника получения материала для клеточной терапии миокарда используют красный костный мозг, который служит источником экзогенных стволовых/прогениторных клеток, принимающих участие в репарации миокарда и ангиогенезе. В большинстве проведенных клинических исследований применяли нефракционированные мононуклеары костного мозга, так как методика их получения давно отработана, является простой, не требует специальных условий, оборудования и, что самое главное, времени для экспансии [23]. Однако ядродержащие клетки костного мозга, в основном представлены клетками крови на разных стадиях созревания, фибробластами, остеобластами, адипоцитами, и лишь в незначительном количестве присутствуют ГСК (1-3%) и МСК (0,01-0,05%). Если даже надеяться на кардиомиогенез при трансплантации нефракционированных мононуклеарных клеток (МНК), то можно рассчитывать только на активность популяций незрелых клеток, которые присутствуют в трансплантате в совсем незначительных количествах.

Большинство клинических испытаний было проведено с использованием именно мононуклеарных клеток костного мозга. Метаанализ проведенных клинических исследований позволяет говорить о клинической безопасности трансплантации МНК костного мозга, но фракция выброса как интегральный показатель функции сердца при этом увеличивается не более чем на 5-10%. Так, наиболее освещенные испытания BOOST [24] и TOPCARE-AMI [25] продемонстрировали, что в результате интракоронарной трансплантации аутогенных МНК костного мозга через 5 дней после ОИМ улучшается кровоснабжение миокарда на микроциркуляторном уровне и не развиваются какие-либо серьезные осложнения, однако фракция выброса увеличивается незначительно.

По нашему мнению, одной из причин выявления умеренной клинической эффективности трансплантации клеток костного мозга является выбор клеточного трансплантата. Применение МСК для клеточной терапии мы считаем более перспективным, так как эти клетки можно эффективно изолировать и наращивать в большом количестве. Их пролиферативные свойства и пластичность должны обеспечить более эффективные приживляемость и стимуляцию репарации миокарда. В проведенном нами экспериментальном исследовании при интракоронарном введении МСК при постинфарктном кардиосклерозе наблюдалась выраженная стимуляция ангиогенеза и репа-

ративных процессов миокарда, что проявлялось в уменьшении размеров рубца, утолщении и укреплении его стенки, гипертрофии перифокального миокарда, уменьшении дилатации полости ЛЖ. При трансплантации нефракционированных МНК было выявлено увеличение размеров рубца, дилатация полостей, но при этом также увеличивались толщина стенки рубца и перифокального миокарда, количество и объемная плотность кровеносных сосудов (рис. 1) [17]. Таким образом, согласно нашим данным, более предпочтительной является трансплантация МСК по сравнению с МНК костного мозга.

Каким должен быть способ трансплантации клеток?

Существуют два основных способа введения клеток в сердце: интракоронарный и интрамиокардиальный. Кроме того, можно найти работы, в которых клетки для стимуляции репарации сердца вводили внутривенно [26]. Данная методика на сегодняшний день считается неэффективной, так как при таком способе введения очень незначительная доля клеток заселяет поврежденный миокард. Несомненно, эффективным способом доставки клеток является их непосредственное введение в толщу миокарда как трансэпикардиально [27] во время операции на открытом сердце, так и трансэндокардиально с помощью специальных катетеров, например NOGA [28]. В последнем случае на конце катетера можно расположить датчик, который позволяет проводить электромеханическое картирование миокарда и определять оптимальные области трансплантации клеток. Однако все варианты интрамиокардиальной трансплантации являются инвазивными, требуют дорогостоящего оборудования, длительной госпитализации и имеют существенный риск различных осложнений. В частности, при введении даже небольшого объема клеточного трансплантата возникает механическое повреждение миокарда, что может вызывать аритмии. Необходимо также учитывать, что в процессе механического повреждения введенные клетки могут погибать.

В настоящее время интракоронарный способ введения клеток считают оптимальным, так как по эффективности доставки он соответствует интрамиокардиальному, но является гораздо менее инвазивным [29]. В нашем экспериментальном исследовании на модели трансвентрикулярного интракоронарного введения клеток через 30 суток после ОИМ было показано, что даже при неселективном введении в правую и левую коронарные артерии трансплантационные меченые клетки мигрировали в область повреждения миокарда, а не распределялись равномерно по всем тканям сердца [30]. Уже через сутки после трансплантации меченые клетки выявляли только в области повреждения сердца. При этом клетки локализовались в рубцовой ткани и не были обнаружены в сохранившихся участках некроза и перифокальной области, что указывает на их хоминг в зону повреждения. Меченые клетки имели фибробластоподобный фенотип и располагались между пучками коллагеновых волокон.

Учитывая системный способ трансплантации клеток, через 1, 14 и 30 суток после трансплантации мы исследовали гистологические препараты селезенки, печени и легких на наличие меченых клеток. Кроме тканей сердца, значительную долю меченых клеток выявляли в селезенке; в печени и легких обнаружили лишь единичные флуоресцентно меченые клетки (рис. 2).

Как следует из гистограммы, трансплантационные МСК более эффективно приживаются в тканях сердца.

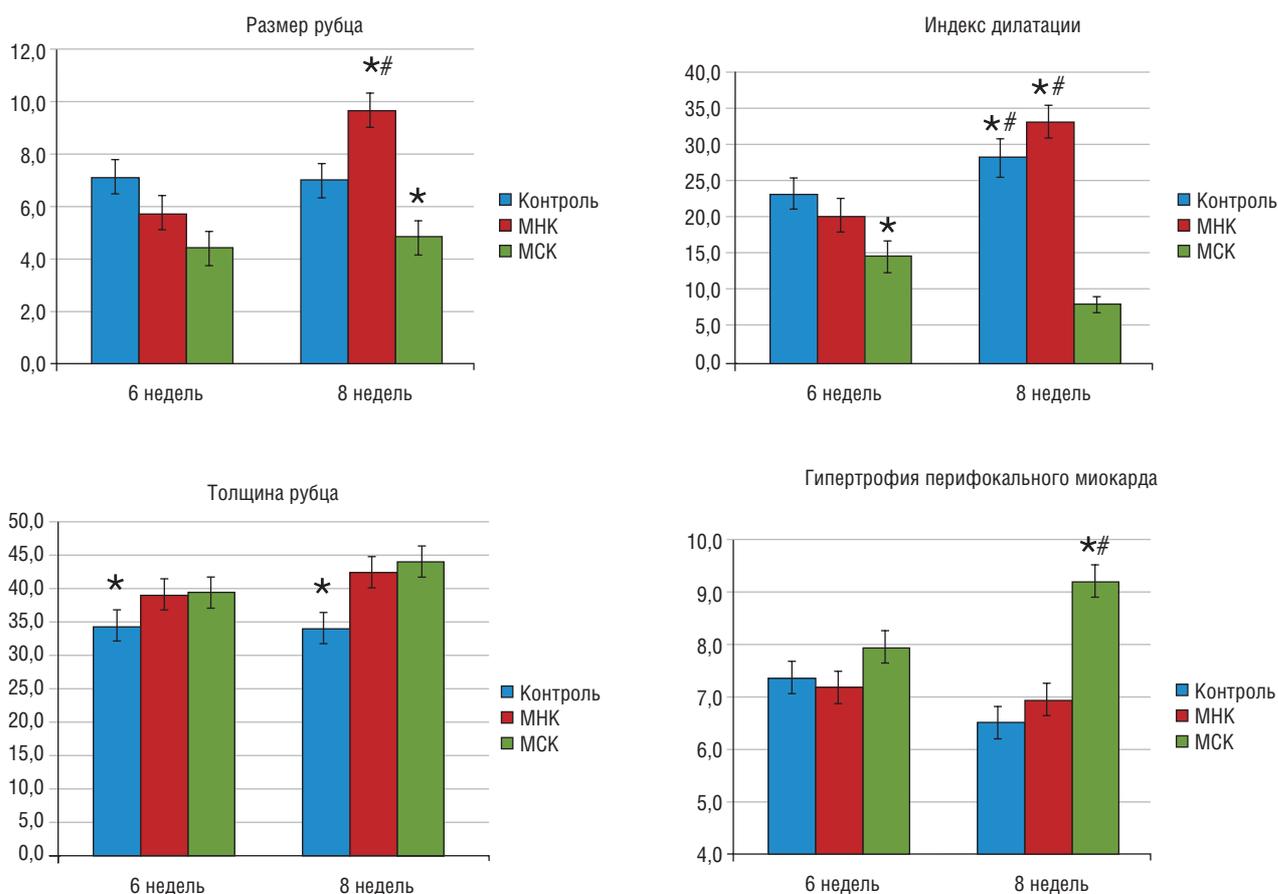


Рис. 1. Динамика морфометрических показателей ЛЖ через 6 и 8 нед после ОИМ (через 2 и 4 нед после интракоронарной трансплантации у крыс).

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении групп; # – $p < 0,05$ при сравнении с предыдущим сроком наблюдения.

При трансплантации МНК происходит более выраженный хоминг в селезенку, естественную нишу для клеток введенного трансплантата.

Таким образом, при интракоронарной трансплантации клетки мигрируют в область повреждения и принимают участие в репарации миокарда. Данный способ доставки клеток является более безопасным, менее дорогостоящим, а по своей эффективности приближается к интрамиокардиальной трансплантации.

На какой стадии заболевания следует трансплантировать клетки?

С точки зрения повышения эффективности клеточной терапии немаловажным является вопрос, на какой стадии заболевания трансплантировать клетки. Вводить клетки во время ОИМ или через несколько часов после него, по нашему мнению, является нецелесообразным, поскольку трансплантированные клетки, оказавшись в области некроза и ишемии, будут повреждены, как и КМЦ. И все же существует мнение, что такая трансплантация в острую фазу ОИМ может быть эффективна за счет противовоспалительного и иммуномодулирующего эффектов стволовых/прогениторных клеток и обеспечит уменьшение размера инфаркта [31]. На наш взгляд, обоснованно вводить клетки после стихания альтеративной фазы воспаления, т.е. не ранее, чем через 3 суток после реперфузии. На 7-е сутки в области повреждения начинает формироваться грануляционная ткань, которая может обеспе-

чить оптимальные условия для хоминга и выживания трансплантированных клеток. В том случае, если целью клеточной терапии являются уменьшение размера инфаркта и улучшение кровоснабжения перифокального миокарда, оптимальным сроком трансплантации клеток является промежуток между 3-ми и 14-ми сутками после реперфузии.

Со 2-й по 8-ю неделю грануляционная ткань замещается фиброзной, за это время происходят процессы, обеспечивающие созревание рубцовой ткани. Они заключаются прежде всего в увеличении плотности и толщины коллагеновых волокон и уменьшении числа клеток

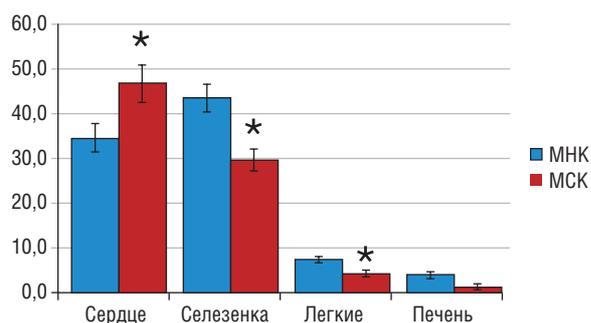


Рис. 2. Распределение меченых трансплантированных МНК и МСК по органам через 30 сут после введения.

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении групп.

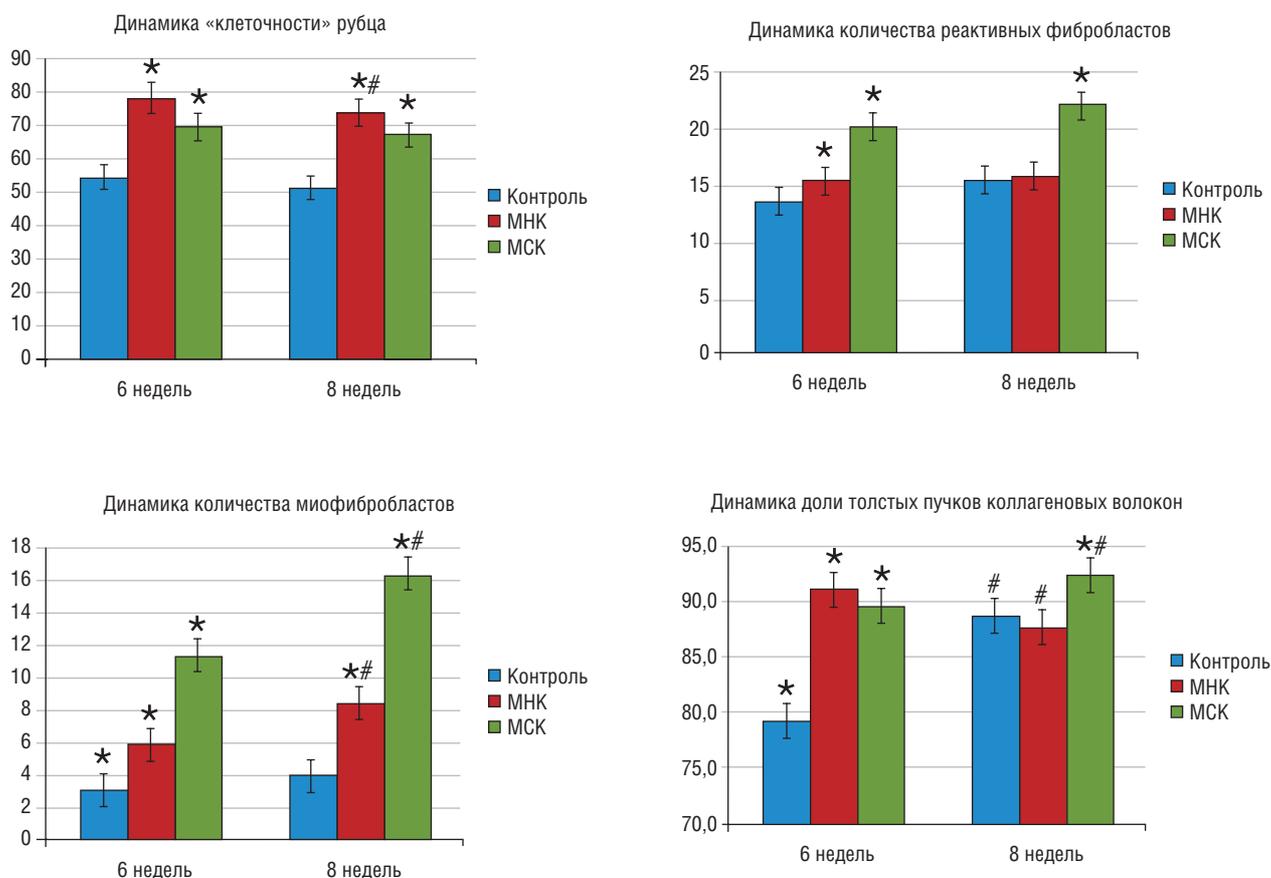


Рис. 3. Динамика морфометрических показателей рубцовой ткани через 6 и 8 нед после ОИМ (через 2 и 4 нед после интракоронарной трансплантации) у крыс.

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении групп; # – $p < 0,05$ при сравнении с предыдущим сроком наблюдения.

в ткани. Следовательно, мишенью клеточной терапии миокарда может являться обратное ремоделирование ЛЖ. С этой целью клетки вводят через 14 суток после реперфузии и при уже давно сформированной ХСН. В этом случае трансплантированные клетки могут участвовать в созревании и перестройке рубцовой ткани. В нашем эксперименте клетки костного мозга трансплантировали через 4 недели после ОИМ, т.е. в самый разгар фибропластических процессов в месте повреждения [17]. Учитывая продемонстрированный хоминг, даже на поздних сроках в зоне повреждения сохраняется высокая концентрация хемокинов, обуславливающих миграцию клеток костного мозга в рубцовую ткань. Трансплантированные клетки красного костного мозга (возможно, собственно фибробласты или их предшественники) мигрировали в рубец и обнаруживались только там, дифференцируясь в фибробласты и миофибробласты. Они пролиферировали, активно синтезировали компоненты межклеточного вещества рубцовой ткани, что привело к утолщению и уплотнению рубцовой стенки (рис. 3).

Ранее полагали, что через 2 месяца после ОИМ рубцовая ткань окончательно сформировывается и в дальнейшем не претерпевает никаких изменений, и рубец через 10 лет ничем не отличается от двухмесячного [32]. По современным представлениям, рубцовая ткань не является инертной структурой, и даже через 8 недель после острого инфаркта миокарда происходит ее активная перестройка, которая продолжается по мере

ремоделирования ЛЖ [33]. Так, было показано, что у крыс в течение 3 месяцев после инфаркта наблюдали высокую концентрацию мРНК проколлагена I типа. Учитывая продолжительность жизни человека, активный синтез коллагена должен наблюдаться у него в течение многих лет после ОИМ [34].

В настоящее время считают, что одной из причин патологического ремоделирования ЛЖ и развития сердечной недостаточности после ОИМ является недостаточное образование или прогрессирующие разрушение внеклеточного коллагенового матрикса в рубце [35]. Поэтому сейчас одним из направлений антиремоделирующей терапии является стимуляция фибропластических процессов в зоне инфаркта, которая обеспечивает утолщение и укрепление рубца и, таким образом, препятствует или замедляет патологическое ремоделирование. Считается, что утолщение и укрепление стенки ЛЖ в области рубца приводит к уменьшению напряжения в стенках всего ЛЖ, что, по закону Лапласа, приводит к уменьшению систолической дилатации левого желудочка [36].

Трансплантацию клеток можно рассматривать как один из вариантов антиремоделирующей терапии хронической сердечной недостаточности, так как даже интракоронарно введенные клетки мигрируют только в рубец, дифференцируются в фибробласты и миофибробласты, активно синтезируют компоненты межклеточного вещества, способствуют его упорядоченной организации и наращиванию прочности рубцовой стенки.

Каковы механизмы стимуляции репарации при трансплантации клеток?

По-прежнему не решенным остается вопрос о механизмах стимуляции ангиогенеза и репарации миокарда при трансплантации стволовых/прогениторных клеток. Активно обсуждаются две основные гипотезы: кардиомиогенез и ангиогенез путем трансдифференцировки трансплантированных клеток и стимуляция ангиогенеза и репарации за счет паракриной индукции [15].

Феномен трансдифференцировки незрелых соматических клеток стали активно изучать и обсуждать еще 15-20 лет назад [14, 37, 38]. Эта идея захватила умы многих выдающихся ученых прежде всего потому, что ставила под сомнение традиционную концепцию происхождения и развития клеток. Она предусматривала возможность применения стволовых клеток для восстановления органов и тканей разного происхождения, образованных из тканей других зародышевых листков. Например, данная концепция допускает использование гемопоэтических клеток для восстановления нервной ткани. Первые сообщения, посвященные этой проблеме, взбудоражили научную общественность, после чего последовало огромное число работ, в которых мезенхимальные предшественники легко превращались в клетки эктодермального или эндодермального происхождения и наоборот. Казалось, что костный мозг рассматривают как источник клеток для регенерации всех органов. Несмотря на предостережения авторитетных ученых [39], которые указывали на недоказательность данных выводов и считали необходимым исключить феномен слияния клеток, эта концепция очень популярна и на сегодняшний день. Считается, что незрелые клетки костного мозга, жировой ткани и вообще всех тканей, где есть строма, могут дифференцироваться во многие клеточные типы. Все это доказательно продемонстрировано в условиях *in vitro*, разработаны протоколы, которые позволяют, например, из МСК получить разные специализированные клетки [40]. Однако этого не происходит в условиях *in vivo*, и появляется все больше исследований, в которых показано, что трансплантированные клетки не дифференцируются в специализированные клетки сердца [15–17]. Возможно, это связано не с отсутствием феномена трансдифференцировки экзогенных клеток-предшественников, а с тем, что в культуре мы получаем клетки с ограниченной пластичностью или с тем, что микроокружение в области повреждения не способствует их дифференцировке в нужном направлении.

Выводы многочисленных исследований, в которых продемонстрировано превращение стволовых/прогениторных клеток в специализированные клетки сердца, основаны на выявлении в этих клетках дифференцировочных маркеров КМЦ, эндотелия и т.д. [6, 14]. Но при этом необходимо понимать, что наличие того или иного маркера совершенно не обуславливает факт превращения прогениторной клетки, например в функционально активный рабочий КМЦ. По нашему мнению, обязательными критериями трансдифференцировки клеток костного мозга в специализированные клетки должны быть локализация и морфология этих клеток, которые очень часто совсем не учитывают. Кроме того, при трансплантации маркированных клеток всегда сложно исключить феномен слияния. Слияние клеток часто наблюдают в культурах, *in vivo* этот феномен достоверно установить очень сложно, особенно для КМЦ. Кроме того, неясно, как изменяется жизнеспособность и функционирование клетки после слияния [41]. Поэтому слияние клеток не рассматривают как основной механизм терапевтической активности клеточной терапии.

В нашем экспериментальном исследовании [17, 30] все меченые клетки, независимо от варианта трансплантата, выявляли только в толще рубцовой ткани. При этом клетки располагались между пучками коллагеновых волокон и имели веретеновидную или полигональную форму. Некоторые меченые клетки положительно окрашивались МАТ к маркерам реактивных фибробластов (Fap α) (рис. 4) и миофибробластов (α SMA) (рис. 5). Не было получено данных, демонстрирующих возможность трансплантированных клеток дифференцироваться в кардиомиоциты или в клетки сосудистой стенки. Отсутствие флуоресцентной метки в кардиомиоцитах, эндотелиальных и гладкомышечных клетках кровеносных сосудов свидетельствует о том, что трансплантированные клетки не сливаются и не дифференцируются в кардиомиоциты и клетки кровеносных сосудов.

Дифференцировка трансплантированных клеток в фибробласты и миофибробласты приводила к укреплению рубцовой стенки и обратному ремоделированию ЛЖ, особенно в случае трансплантации аутогенных МСК.

Стимуляция ангиогенеза и гипертрофия перифокального миокарда, по-видимому, происходила за счет паракриной индукции, которую в нашем исследовании не изучали. Многие исследователи считают индукцию репаративных процессов за счет паракринных факторов, выделяемых трансплантированными клетками, основным механизмом регуляции регенерации [15]. В культуре клеток и после трансплантации показано, что стволовые/прогениторные клетки из различных источников продуцируют цитокины и факторы роста, регулирующие процессы заживления. Одни паракринные факторы стимулируют ангиогенез (VEGF, Ang I, FGF, PDGF и др.), другие ингибируют апоптоз (HGF, IGF-I), третьи стимулируют хонинг (Sdf-1) и иммобилизацию клеток костного мозга (GM-CSF), четвертые регулируют ремоделирование рубца (MMP-3 и -6), пятые индуцируют гипертрофию перифокального миокарда, а шестые оказывают противовоспалительное и иммуномодулирующее действие [15, 42]. При этом трансплантированные клетки сами регулируют локализацию, количество и продолжительность продукции паракринных факторов в зависимости от стадии восстановительного процесса, т.е. представляют из себя саморегулирующуюся систему с обратной связью. Возможно, что при выборе типа клеток для трансплантации необходимо учитывать, какие паракринные факторы они вырабатывают, а не основываться на теоретической возможности их трансдифференцировки.

Как верифицировать результаты клинических исследований?

Огромное количество клинических исследований посвящено клеточной терапии миокарда, многие из которых находятся уже на заключительной III фазе испытаний. Однако все они могут быть подвергнуты критике в отношении размера и репрезентативности выборки, однородности клинического материала, рандомизации, выбора типа клеточного трансплантата, что не позволяет провести метаанализ полученных данных [43]. Короткие сроки и ограниченный объем выборки в этих исследованиях не позволяют сделать вывод об эффективности какой-либо технологии клеточной терапии миокарда с точки зрения доказательной медицины, так как в них нельзя получить данные конечных точек клинической эффективности (смертность, выживаемость, продолжительность жизни). Поэтому для ограниченных клинических испытаний, носящих характер пилотных исследований, очень важно тщательно выбрать суррогатную точку клинической

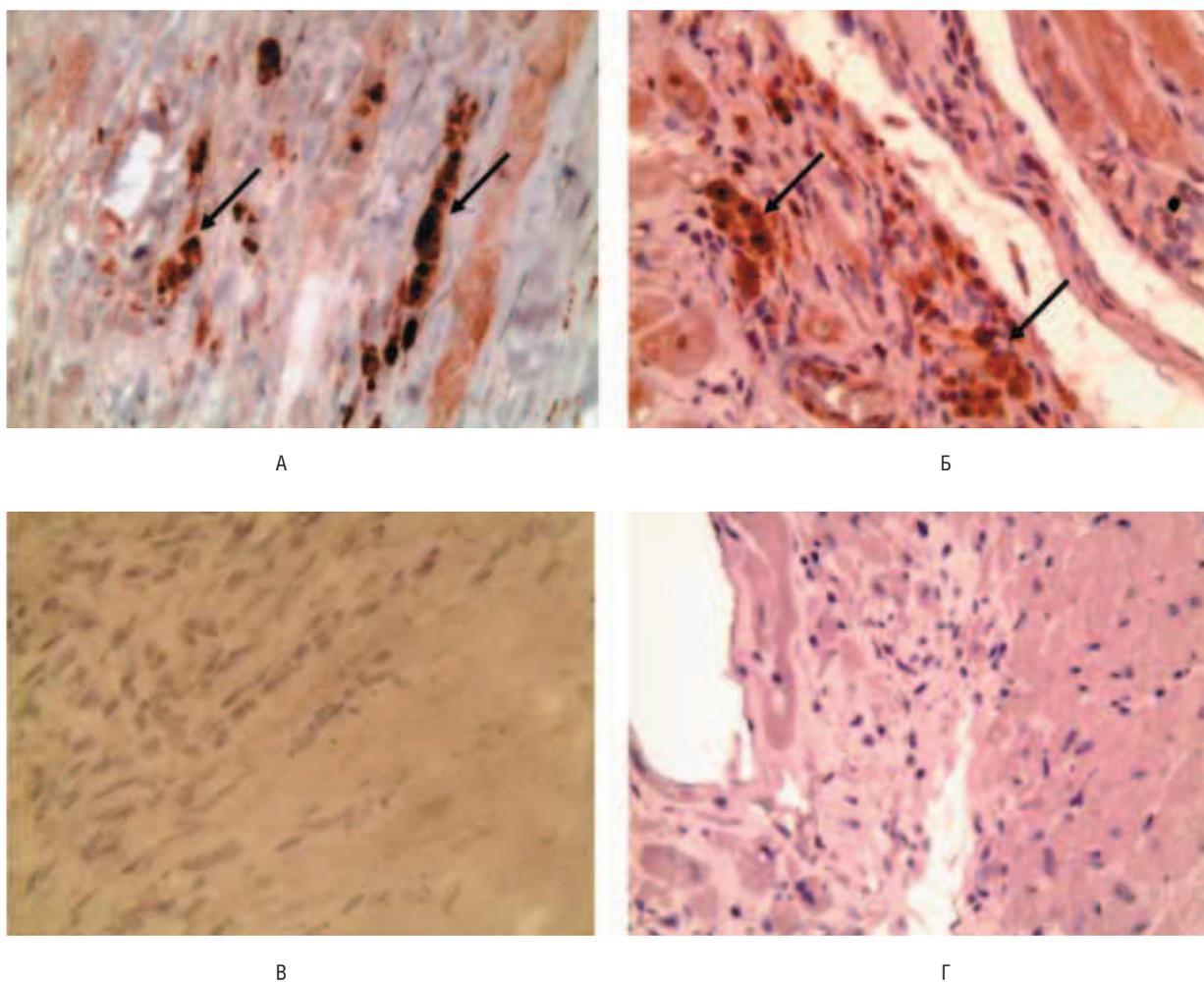


Рис. 4. Иммуногистохимическое окрашивание МАТ к Fapα, А – рубцовая ткань через 14 сут после введения МСК; Б – рубцовая ткань через 14 сут в контрольной группе, черные стрелки – реактивные фибробласты; В и Г – контроль без первичных МАТ; световая микроскопия, об. 40.

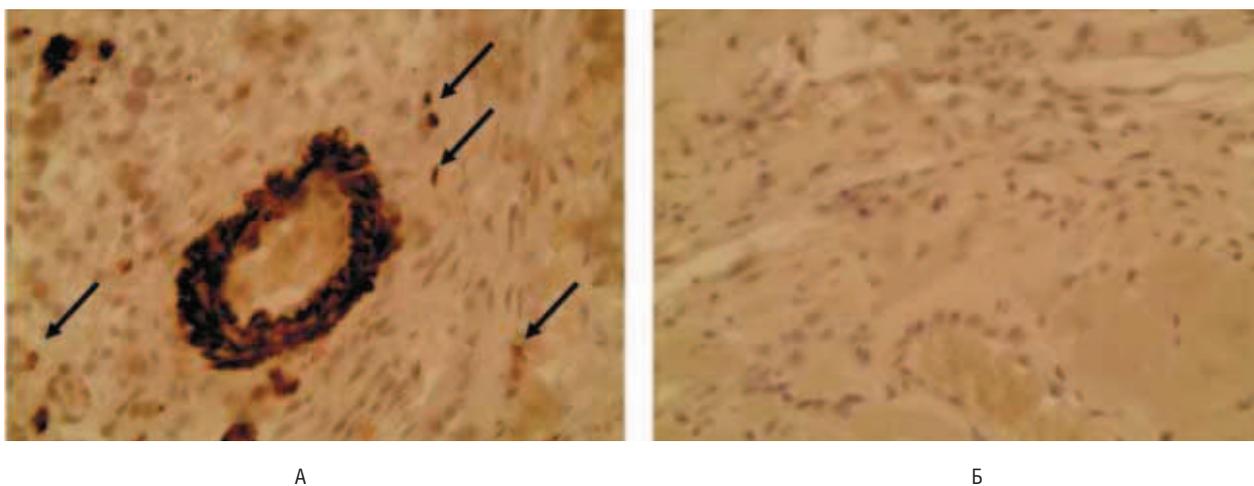


Рис. 5. Иммуногистохимическое окрашивание МАТ к α-SMA. А – рубцовая ткань через 14 сут после введения МСК, черные стрелки – миофибробласты; Б – контроль без первичных МАТ, световая микроскопия, об. 40.

эффективности, которая должна наиболее сильно коррелировать с реальными конечными точками [44].

В подавляющем большинстве клинических исследований клеточной терапии миокарда в качестве таких суррогатных точек используют эхокардиографические показатели

состояния и работы сердца (фракция выброса, конечный диастолический и систолический объемы) [22, 23, 24]. Однако данные показатели в результате клеточной терапии меняются незначительно [22], иногда их изменения можно считать методической погрешностью, что может свидетель-

ствовать либо о неэффективности лечения, либо о неправильном выборе суррогатных точек.

В клиническом исследовании эффективности интракоронарной трансплантации аллогенных МСК, проведенном нами на базе Российского научного центра хирургии им. акад. Б.В. Петровского, у 27 больных с дилатационной кардиомиопатией фракция выброса возросла с $20,5 \pm 1,6$ до $26,4 \pm 5,9\%$ ($p > 0,05$). Вместе с тем другие диагностические методы, к которым относятся уровень мозгового натрийуретического пептида (BNP) в плазме крови, 6-минутный тест, пиковое потребление кислорода, показатели качества жизни, имели положительную динамику и в большей степени коррелировали с клиническим состоянием и прогнозом при ХСН [19]. Так, уже через 2 недели после трансплантации клеток уровень BNP существенно снижался и достигал исходного уровня только через 6 месяцев (рис. 6). Это свидетельствует о высокой чувствительности и специфичности данного показателя для пациентов с ХСН. Поэтому уровень BNP часто используют в качестве суррогатной точки при клинических испытаниях эффективности лекарственных средств в отношении ХСН. BNP вырабатывается при ХСН преимущественно в желудочках сердца, и интенсивность его синтеза зависит от растяжения полостей желудочков сердца [45]. ФВ является расчетным эхокардиографическим параметром, на который влияет большое количество как интракардиальных, так и экстракардиальных факторов. Кроме того, диагностическая ценность таких показателей, как ударный объем, сердечный выброс и фракция выброса, ограничена их зависимостью от пред- и постнагрузки. Процедура же определения BNP предельно автоматизирована, и его уровень не зависит от субъективной оценки врача. Исходя из этого, мы считаем, что уровень BNP в крови является более объективным критерием как состояния миокарда, так и функционального состояния сердечно-сосудистой системы пациента.

В последнее время в клинических исследованиях, в основном за рубежом, для верификации результата применяют магнитно-резонансную, однофотонную эмиссионную и позитронно-эмиссионную томографии [46]. Эти методы позволяют наряду с глобальной сократимостью оценивать локальную сократимость, перфузию миокарда, метаболические процессы в тканях, то есть результаты технологии

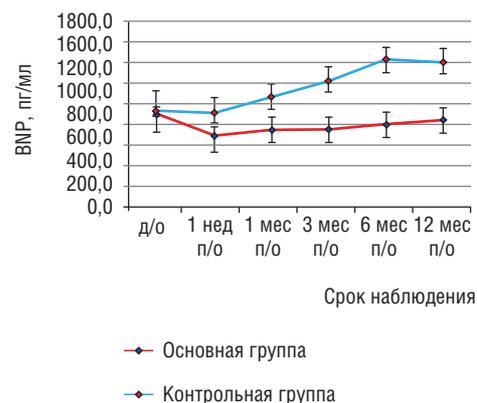


Рис. 6. Динамика средней концентрации мозгового натрийуретического пептида в крови после трансплантации аллогенных МСК.

лечения. Их применение, однако, ограничивается высокой стоимостью.

Направления дальнейших исследований

Несмотря на существующие нерешенные вопросы и даже в некоторой степени наступившее разочарование в отношении клеточной терапии, данное направление является крайне перспективным, так как в нем все еще остается обширное поле деятельности и научных разработок, которые позволят повысить эффективность существующих технологий стимуляции регенерации. Можно выделить несколько основных направлений дальнейших исследований, которые позволят сделать существенный прорыв в развитии технологии регенеративной медицины: тканевая инженерия кровеносных сосудов, клапанов, фрагмента и целого сердца; генетическая модификация стволовых/прогениторных клеток с целью повышения экспрессии нужного гена; получение КМЦ из эмбриональных и индуцированных плюрипотентных клеток; разработка способов селективной трансплантации и др. При этом данные направления находятся уже на экспериментальной стадии исследований и, возможно, скоро войдут в клиническую практику.

REFERENCES

- Thomson J., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 1998; 6 Novem: 1145–1147.
- Kharchenko V. I., Kakorina E. P., Koryakin M. V. i dr. Smertnost' ot serdechno-sosudistykh zabolevanii v Rossii i v ekonomicheski razvitykh stranakh. Neobkhodimost' usileniya kardiologicheskoi sluzhby i modernizatsii meditsinskoj statistiki v Rossijskoi Federatsii (analiticheskiy obzor ofitsial'nykh dannykh Goskomstata, Minzdrava Rossii, VOZ i ekspertnykh otsenok po probleme). *Rossiiskii kardiologicheskii zhurnal*. 2005; № 1 (51): 5–15.
- Koroteev A.V., Belyanko I.E.. Khirurgicheskoe lechenie serdechnoi nedostatochnosti. In: Tereshchenko S.N., editor. Nekotorye nereshenyye voprosy khronicheskoi serdechnoi nedostatochnosti. *Moskva*. 2007: 204–223.
- Belenkov Yu.N., Oganov R.G.. Kardiologiya. Natsional'noe rukovodstvo. *Moskva: Geotar-media*. 2007.
- Shumakov V.I., Khubutiya M.Sh. Dilatatsionnaya kardiomiopatiya. *Moskva*. 2003.
- Annarosa L., Kajstura J., Anversa P. Cardiac Stem Cells and Mechanisms of Myocardial Regeneration. *Physiol. Rev*. 2005; 85: 1373–1416.
- Rumyantsev P.P. Kardiomiotsity v protsessakh reproduksii, differentsirovki i regeneratsii. *L.: Nauka*. 1982: 288 s.
- van Amerongen M.J., Engel F.B. Features of cardiomyocyte proliferation and its potential for cardiac regeneration. *J. Cell Mol. Med*. 2008 Dec;12(6A):2233–44.
- Thiele J., Varus E., Wickenhauser C. et al. Regeneration of heart muscle tissue: quantification of chimeric cardiomyocytes and endothelial cells following transplantation. *Histol. Histopathol*. 2004. 19: 201–209.
- ten Hove W.R., Verspaget H.W., Barge R. et al. Liver chimerism after allogeneic blood stem cell transplantation. *Transplant. Proc*. 2007 Jan-Feb; 39(1):231–236.
- Zhang M., Method D., Poppa V. et al. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2001; 33(5):907–921.
- Makino S., Fukuda K., Miyoshi S. et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J. Clin. Invest*. 1999;103(5):697–705.
- Passier R., van Laake L., Mummery C. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature*. 2008; 453(15): 322–329.
- Orlic D., Kajstura J., Chimenti S. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001; 410 (5): 701–705.

15. Daif W., Hale S., Kloner R. Role of a paracrine action of mesenchymal stem cells in the improvement of left ventricular function after coronary artery occlusion in rats. *Regenerative Med.* 2007; 2(1): 63–68.
16. Stamm C., Nasser B., Choi Y.H. et al. Cell therapy for heart disease: great expectations, as yet unmet. *Heart Lung Circ.* 2009 Aug;18(4):245–56.
17. Baikova Yu.P., Fatkhudinov T.Kh., Bol'shakova G.B. i dr. Reparatsiya miokarda pri transplantatsii mononuklearnykh kletok kostnogo mozga. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine.* 2010; 4: 203–211.
18. Bochkov N.P., Nikitina V.A. Tsitogenetika stvolovykh kletok che-loveka. *Molekulyarnaya meditsina.* 2008; 3: 40–47.
19. Wollert K., Drexler H. Cell therapy for the treatment of coronary heart disease: a critical appraisal. *Nat. Rev. Cardiol.* 2010; 7:204–215.
20. Fatkhudinov T.Kh., D'yachkov A.V., Koroteev A.V. i dr. Bezopasnost' i effektivnost' transplantatsii allogennykh mul'tipotentnykh stromal'nykh kletok pri khirurgicheskom lechenii dilatatsionnoi kardiomiopatii. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine.* 2010; 1: 10–17.
21. Kellar R., Landeen L., Shepherd B. et al. Scaffold-Based Three-Dimensional Human Fibroblast Culture Provides a Structural Matrix That Supports Angiogenesis in Infarcted Heart Tissue. *Circulation.* 2001;104:2063–2068.
22. Reinecke H., MacDonald G., Hauschka S. et al. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J. Cell Biol.* 2000, 149(3):731–740.
23. Menasche P. Cell-based Therapy for Heart Disease: A Clinically Oriented Perspective. *Molecular Therapy.* 2009; 17(5): 758–766.
24. Meyer G., Wollert K., Steffens L. et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation.* 2002; 113: 1287–1294.
25. Schachinger V., Assmus B., Honold J. et al. Normalization of coronary blood flow in the infarct-related artery after intracoronary progenitor cell therapy: intracoronary Doppler substudy of the TOPCARE-AMI trial. *Clin. Res. Cardiol.* 2006 Jan; 95(1): 13–22.
26. Hofmann M., Wollert K., Meyer G. et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation.* 2005;111(17):2198–2202.
27. Patel A., Geffner L., Vina R. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2005; 130(6): 1631–1638.
28. Charwat S., Lang I., Dettke M. et al. Effect of intramyocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear stem cells on the regional myocardial perfusion. NOGA-guided subanalysis of the MYSTAR prospective randomised study. *Thromb Haemost.* 2010 Mar;103(3):564–71.
29. Freyman T., Polin G., Osman H. et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *European Heart Journal.* 2006; 27:1114–1122.
30. Fatkhudinov T.Kh., Slashcheva G.A., Bol'shakova G.B. i dr. Napravleniya migratsii mononuklearov kostnogo mozga pri intrakoronarnom transventrikulyarnom vvedenii. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine.* 2009; 4:222–228.
31. Bartunek J., Wijns W., Heyndrickx G. et al. Timing of intracoronary bone-marrow-derived stem cell transplantation after ST-elevation myocardial infarction. *Nature clinical practice cardiovascular medicine.* 2006; 3: 52–56.
32. Kumar V., Abbas A. et al. 7 ed. *Pathologic Basis of Disease.* Elsevier Inc. 2004: 1525.
33. Souders C., Bowers S., Baudino T. Cardiac Fibroblast. The Renaissance Cell. *Circ. Res.* 2009;105:1164–1176.
34. Sun Y., Weber K. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovascular Research.* 2000; 46: 250–256.
35. Jugdutt B. Ventricular Remodeling After Infarction and the Extracellular Collagen Matrix. *Circulation.* 2003; 108: 1395–1403.
36. Landa N., Miller L., Feinberg M. Effect of Injectable Alginate Implant on Cardiac Remodeling and Function After Recent and Old Infarcts in Rat. *Circulation.* 2008; 117: 1388–1396.
37. Eglitis M., Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1997; 94: 4080–4085.
38. Ferrari G., Cusella-DeAngelis G., Coletta M. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998; 279: 1528–1530.
39. Weissman I., Anderson D., Gage F. Stem and progenitor cells: Origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiation. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2001;17: 387–403.
40. Prockop D., Kota D., Bazhanov N. et al. Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs). *J. Cell. Mol. Med.* 2010; 14(9): 2190–2199.
41. Lucas J., Terada N. Cell fusion and plasticity. *Cytotechnology.* 2003; 41: 103–109.
42. Burchfield J., Dimmeler S. Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair.* 2008; 1(4): 1–11.
43. Bochkov N.P. Kletochnaya terapiya v svete dokazatel'noi meditsiny. *Klinicheskaya meditsina.* 2006;10: 4–9.
44. Yagudina R.I., Chibilyaev V.A. Ispol'zovanie konechnykh i surrogatnykh tochek v farmakoeconomicheskikh issledovaniyakh. *Farmakoeconomika.* 2010; 3(2): 12–18.
45. Suzuki E., Hirata Y., Kohmoto O. et al. Cellular Mechanisms for Synthesis and Secretion of Atrial Natriuretic Peptide and Brain Natriuretic Peptide in Cultured Rat Atrial Cells. *Circulation Research.* 1992;71: 1039–1048.
46. Rodriguez-Porcel M. In vivo imaging and monitoring of transplanted stem cells: clinical applications. *Curr. Cardiol. Rep.* 2010 Jan;12(1):51–8.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Гольдштейн Дмитрий Вадимович, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории генетики стволовых клеток МГНЦ РАМН, генеральный директор ЗАО «РеМеТэкс»

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24, стр. 2

Тел.: (495)324-20-24

E-mail: dv@rm7.ru

Фатхудинов Тимур Хайсамудинович, кандидат медицинских наук, в.н.с. лаборатории роста и развития НИИМЧ РАМН, в.н.с. ЗАО «РеМеТэкс»

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24, стр. 2

Тел.: (499) 503-96-38

E-mail: fatkhudinov@gmail.com