

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И
КАРДИОМИОГЕНЕЗ В
НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch
Tomsk Scientific Center
State Organization "Scientific Research Institute of Cardiology"

V.P. Shakhov
C.V. Popov

STEM CELLS AND CARDIOMYOPLASTY IN NORM AND PATHOLOGY

Scientific & Technical Translations



Tomsk 2004

ГУ Научно-исследовательский институт кардиологии
Томского научного центра Сибирского отделения
Российской академии медицинских наук

В.П. Шахов
С.В. Попов

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И КАРДИОМИОГЕНЕЗ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

Scientific & Technical Translations



Томск 2004

УДК 612.12-008.318:612.018:615.22:615.212.7:
616.45-001.1/3:616.12-005.4-092:613.863

Шахов В.П., Попов С.В. **Стволовые клетки и кар-
Ш31 диомиогенез в норме и патологии.** – Томск: STT, 2004.
– 170 с.

ISBN 5-93629-171-5

В монографии обобщаются современные данные о морфофункциональных свойствах стволовых клеток, способных дифференцироваться в кардиомиоциты и клетки эндотелия, принимающих участие в развитии сердца и его репарации при повреждении. На основании многолетних исследований и данных мировой литературы рассматриваются фундаментальные механизмы коммитирования эмбриональных и мезенхимальных стволовых клеток и вопросы, связанные с их ролью в репарации сердечной ткани. Выявленные закономерности позволили определить главные критерии проведения эффективной клеточной терапии острого инфаркта миокарда, установлены основные показания, возможные осложнения и противопоказания для ее проведения.

Для кардиологов, патофизиологов, хирургов, биоинженеров, биотехнологов, студентов и аспирантов, а также специалистов, работающих в области клеточных и критических технологий, в регенераторной медицине.

**УДК 612.12-008.318:612.018:615.22:615.212.7:
616.45-001.1/3:616.12-005.4-092:613.863**

Рецензент – член-корреспондент РАН
Л.И. Корочкин.

ISBN 5-93629-171-5

© Шахов В.П., Попов С.В., 2004
© STT™, 2004

ПРЕДИСЛОВИЕ

В последнее время внимание биологов и медиков приковано к проблеме стволовых клеток. **Стволовые клетки** – это клетки, сохраняющие потенциал к развитию в разных направлениях. Из стволовой клетки может возникнуть и кожная, и нервная, и кровяная клетка. Понятие о стволовых клетках зародилось в России благодаря трудам выдающихся гистологов – Александра Александровича Максимова, одного из основоположников современной гистологии, и Александра Яковлевича Фриденштейна.

Различают два вида стволовых клеток: **эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и региональные стволовые клетки (СК)**. Первые присутствуют в самых ранних эмбрионах, когда еще не начался процесс органогенеза. Вторые обнаруживаются позднее, когда формируются органы и ткани. Раньше считали, что взрослый орган лишен СК. Однако, благодаря работам А.Я. Фриденштейна, удалось показать, что они присутствуют и во взрослом организме, хотя и в очень малом количестве (доли процента).

СК выявляют практически во всех органах, включая центральную нервную систему. Их наличие повышает восстановительные способности организма, и в том числе и нервной системы.

Региональные нервные стволовые клетки локализуются главным образом в отделе мозга, именуемом **гиппокампом**, и в **субвентрикулярной** области, где расположены клетки, выстилающие стенку желудочков мозга. Их можно выделять и высевать в культуру тканей, растущую в специальной среде.

Наряду с региональными стволовыми клетками, которые при повреждении тканей соответствующего органа мигрируют к зоне повреждения, делятся и дифференцируются, образуя в этом месте новую ткань, существует и “центральный склад запчастей” – **стромальные клетки костного мозга**. Эти клетки универсальны, они поступают с кровотоком в поврежденный орган или

ткань и на месте под влиянием различных сигнальных веществ превращаются в нежные специализированные клетки, которые замещают погибшие. В частности, установлено, что введение стромальных клеток костного мозга в зону повреждения сердечной мышцы (зону инфаркта) практически полностью устраняет явления постинфарктной сердечной недостаточности у экспериментальных животных. Так, стромальные клетки, введенные свиньям с экспериментальным инфарктом, уже через восемь недель полностью перерождаются в клетки сердечной мышцы, восстанавливая ее функциональные свойства.

Результаты такого лечения инфаркта впечатляющи. По данным Американского кардиологического общества за 2000 год, у крыс с искусственно вызванным инфарктом 90% стромальных клеток костного мозга, введенных в область сердца, трансформируются в клетки сердечной мышцы.

Японские биологи получили из стромальных клеток костного мозга мышей клетки сердечной мышцы. В лабораторных условиях в культуру стромальных клеток добавляли 5-азоцитидин, и они начинали дифференцироваться в клетки сердечной мышцы. Такая клеточная терапия весьма перспективна для восстановления сердечной мышцы после инфаркта, поскольку для нее используются собственные стволовые стромальные клетки.

Они не отторгаются, кроме того, при введении взрослых стволовых клеток исключена вероятность их злокачественного перерождения.

Широко используется терапия стромальными клетками в ортопедии. Это связано с существованием особых белков, так называемых ВМР (костные морфогенетические белки), которые индуцируют дифференцировку стромальных клеток в клетки костной ткани — остеобласты. Клинические испытания в этом направлении дали многообещающие результаты. Например, в США 91-летней пациентке с незаживающим в течение 13 лет переломом вживили специальную коллагеновую пластинку с нанесенными на нее ВМР. Поступающие в зону перелома стромальные клетки “притягивались” к пластинке и под влиянием ВМР превращались в клетки костной ткани. Через 8 месяцев после установки такой пластинки сломанная кость у больной восстановилась. Сейчас в США проходят испытания и скоро начнут широко применяться в клинике специальные пористые губки, наполненные одновременно и стромальными клетками, и нужными индуцирующими веществами, направляющими развитие клеток по требуемому пути.

Большое значение придают стволовым клеткам (и, в частности, стромальным) при лечении различных нейродегенеративных и неврологических заболеваний – паркинсонизма, болезни Альцгеймера (старческое слабоумие), хореи Гентингтона, мозжечковых атаксий, рассеянного склероза и др.

Не случайно именно на стромальные стволовые клетки возлагают большие надежды в связи с клеточной терапией. Между тем остро ощущается дефицит обзорной литературы, посвященной этим клеткам. Существенный вклад в дело восполнения данного пробела вносит книга В.П. Шахова и С.В. Попова “Стволовые клетки и кардиомиогенез в норме и патологии”. Сразу же хочется отметить, что содержание этого фундаментального труда значительно шире его названия. Авторам удалось изложить современные данные, касающиеся природы и поведения стволовых клеток вообще, и осветить перспективы их использования в клеточной терапии. Следует при этом отметить достаточно богатый собственный опыт авторов в работе со стволовыми клетками, что обеспечивает квалифицированное и местами увлекательное изложение научного материала. Значительное место в книге занимают как раз стромальные стволовые клетки, биология которых в самых различных аспектах подробно анализируется авторами. Книга насыщена богатым фактическим материалом, в том числе полученным авторами. Положительным фактом является то, что подобающее место уделено отечественным авторам, внесшим достойный вклад в исследование проблемы стволовых клеток.

Не сомневаюсь, что представляемая книга будет крайне полезной для самого широкого круга читателей – как для медиков, так для и биологов

*Член-корреспондент
Российской Академии Наук
Л.И. Корочкин*

ВВЕДЕНИЕ

Растущие показатели сердечно-сосудистой заболеваемости на фоне беспрецедентно низкой для мирного времени средней продолжительности жизни российских граждан, особенно мужчин, определяют социально-экономическую значимость решения этой проблемы. Хирургия сердца и сосудов занимает важное место в системе оказания медицинской помощи этому самому большому контингенту больных. Мировая практика показывает: вложив дополнительные средства в здравоохранение, государство через несколько лет получает ощутимый экономический эффект от снижения заболеваемости и смертности населения. Тем не менее, в 2001 г. сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), включая ишемическую болезнь сердца, по-прежнему были причиной более 50% всех случаев смерти как в России (табл. 1–3, Бокерия, Гудкова, 2002), так и за рубежом, и остаются ведущей причиной

Таблица 1

Показатели смертности населения от болезней сердца и сосудов (на 100 тыс. населения)

Причина смерти	2000 г.		2001 г.		Динамика показателя, %
	п	%	п	%	
Всего умерших от всех причин	1535,1	100	1607,5	100	+ 1,9
Болезни системы кровообращения	849,4	55,3	869,4	55,6	+ 1,9
В том числе ишемическая болезнь сердца	398,9	26,0	408,4	26,1	+ 2,4
В том числе цереброваскулярные болезни	319,8	20,8	329,7	21,1	+ 3,1

Таблица 2

**Впервые зарегистрированные сердечно-сосудистые заболевания в РФ
(Справочник «Здоровье населения и деятельность
учреждений здравоохранения в 2001 г.», МЗ РФ. – М., 2002)**

Контингент	2000 г.		2001 г.		Динамика показателей, %
	Абс. число	На 100 тыс. чел.	Абс. число	На 100 тыс. чел.	
Взрослые	2237482	2008,6	2358175	2112,8	+5,2
Подростки	70897	973,8	75590	1033,3	+6,1
Дети	174407	675,4	170936	676,2	+0,1

развития застойной сердечной недостаточности (Ozbaran et al., 2004).

В США ежегодно регистрируется более 1,1 млн инфарктов миокарда (ИМ) и 400 тыс. случаев развития сердечной недостаточности (СН). Около 20% пациентов с диагнозом СН умирают в течение года (American Heart Association, 2001).

По данным МЗ РФ, в 2001 г. имело место дальнейшее увеличение пациентов с впервые установленным диагнозом ССЗ (табл. 2).

Из приведенных данных видно, что при некотором уменьшении абсолютного числа детей с болезнями сердца и сосудов уровень распространения последних в этой возрастной группе за прошедший год практически не изменился. Общее число больных ССЗ, зарегистрированных в лечебно-профилактических учреждениях России (так называемая накопленная заболеваемость) за последние два года, представлено в таблице 3 (Бокерия, Гудкова, 2002).

Основное место среди заболеваний сердечно-сосудистой системы у взрослых занимает ишемическая болезнь сердца (ИБС) – 46,9% случаев в 2001 г., среди которых около 3% приходится на острый инфаркт миокарда (ОИМ) (табл. 4). Количество ОИМ на 100 тыс. населения в 2001 г. составило 143,2 человека (Бокерия, Гудкова, 2002).

Следует отметить, что частота повторных ОИМ в 2001 г. выросла по сравнению с 2000 г. почти на 2% (соответственно 20,5 и 20,9 на 100 тыс. взрослого населения страны).

Как правило, результатом ИБС и ОИМ является развитие сердечной недостаточности (Бокерия, Гудкова, 2002). Сердеч-

Таблица 3

Распространенность сердечно-сосудистых заболеваний в РФ

Федеральный округ	2000 г.		2001 г.		Динамика показателя, в %
	Абс. кол-во	На 100 тыс. чел.	Абс. кол-во	На 100 тыс. чел.	
Центральный	6193712	16810,2	6421777	17479,9	+4,0
Северо-Западный	2348421	16276,8	2378836	16552,3	+1,7
Южный	2292016	10987,6	2443170	11682,2	+6,3
Приволжский	4468931	14001,7	4765266	14966,5	+6,9
Уральский	1221052	9703,6	1270204	10109,4	+4,2
Сибирский	2771296	13369,1	2978536	144406,4	+7,8
Дальневосточный	700634	9816,1	764832	10761,7	+ 9,6
Всего	19996062	13902,2	21022621	14651,6	+5,4

Таблица 4

Заболеваемости ИБС и ОИМ в России (на 100 тыс. взрослого населения)

Федеральный округ	ИБС в 2000 г.		ИБС в 2001 г.		ОИМ 2000 г.	ОИМ 2001 г.
	Выявл. впервые	Всего	Выявл. впервые	Всего	Всего	Всего
Центральный	6426,3	421,5	6495,0	418,1	155,5	155,7
Северо-Западный	6113,6	380,7	6025,2	360,3	152,4	148,7
Южный	4198,7	427,0	4227,3	446,2	120,6	116,2
Приволжский	4085,3	425,3	4356,5	454,4	151,1	153,2
Уральский	3336,0	401,1	3289,4	424,0	154,1	153,2
Сибирский	4324,8	480,1	4452,4	508,7	130,6	131,2
Дальневосточный	3285,5	362,4	3426,6	376,7	114,2	112,6
Средняя по РФ	4880,6	423,7	4972,9	436,4	144,0	143,2

ная недостаточность является одной из главных проблем здравоохранения всех экономически развитых стран (Болл и др., 1995; Cleland, McGowan, 1999). Для лечения СН в настоящее время используют широкий спектр лекарственных препаратов и немедикаментозных методов, таких как коронарное шунтирование, стентирование, кардиомиопластика, искусственное сердце,

трансплантация сердца, ультрафильтрация и др. Между тем, частота развития СН и распространенность её в человеческой популяции нарастает, именно поэтому существует необходимость в разработке принципиально новых, доступных и эффективных методов коррекции СН (Беленков и др., 1997).

Одним из таких направлений является так называемая регенераторная медицина, использующая стволовые клетки. С помощью ее клеточных технологий впервые стало возможным восстанавливать поврежденные и деформированные структуры сердечной ткани. Следует отметить, что термин "стволовые клетки" был предложен нашим соотечественником, ставшим в последствии основоположником американской школы общей патологии, А. Максимовым в 1907 г. Считается, что теоретической основой данного направления явилось открытие D. Tomson с сотрудниками (1998) пула эмбриональных стволовых клеток человека. Эти клетки были найдены у животных еще в 1981 г., а основные методы, позволяющие выявлять мультипотентные стволовые (стромальные) клетки взрослого организма, были разработаны еще в начале 70-х гг. прошлого столетия А.Я. Фриденштейном. Однако, несмотря на приоритетные для нашей страны идеи, мы не смогли своевременно воспользоваться этими достижениями.

На наш взгляд, уместно вспомнить и о работах J. Till, E. McCulloch (1961), T. Bradley, D. Metcalf (1966), T. Dexter (1989), И.Л. Черткова (1977) и их многочисленных последователей, которые внесли существенный вклад в понимание функций и значения стволовых кроветворных клеток и кроветворного микроокружения.

Однако в силу того, что в данный период развития биомедицины не было достоверных маркеров, в частности, генетических и иммунологических, с помощью которых можно было идентифицировать ту или иную популяцию стволовых клеток, все разговоры носили поверхностный характер. Только в конце XX века удалось доказать, что во взрослом организме существует пул мультипотентных стволовых клеток (МПСК), способных восстанавливать практически все известные линии мезенхимальных, нейральных, эндодермальных и других клеток, включая кардиомиоциты.

Тем не менее, используя разные источники МПСК (костный мозг, кожа, жировая ткань и т.п.), а также технологии по выделению, сепарации, культивированию и перепрограммированию данных категорий прогенераторных клеток, в различных лабо-

раториях были получены противоречивые и часто взаимоисключающие результаты. Остаются непонятными судьба трансплантируемых МПСК, то, как происходит их распределение, встраивание в поврежденную ткань и взаимодействие с окружающими клетками на разных стадиях развития того или иного патологического процесса. Более того, такие на вид простые вещи, как способ и сроки введения МПСК больным с острым инфарктом миокарда, также остались практически не изученными.

В данной работе мы пытались понять, насколько возможно с помощью аутологичных МПСК костного мозга улучшить функцию сердечной ткани при моделировании острого инфаркта миокарда. На наш взгляд, наиболее патогенетической моделью является классическая коронароокклюзия, которая и легла в основу главной экспериментальной модели поражения сердца в данной монографии. Среди пула МПСК мы выбрали мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые обладают более высоким потенциалом по отношению к образованию мышечных, в том числе кардиомиогенных, ангиогенных элементов. Кроме того, их свойства наиболее изучены, а технология получения отработана и хорошо воспроизводится во многих лабораториях мира. В качестве контрольной группы клеток были выбраны мононуклеары костного мозга, которые содержат сложный коктейль моноцитов, лимфоцитов, миелоцитов, гемопоэтических прекурсоров и других клеток, которые потенциально могут оказать позитивное, либо негативное влияние на функцию поврежденного миокарда.

В первую очередь необходимо было определить алгоритм технологии выделения аутологичных стволовых клеток. Оценить потенциал мезенхимальных стволовых клеток, способных трансформироваться в кардиомиоциты и эндотелиоидные элементы. Определить наиболее эффективные способы перепрограммирования СК в миокардиальные структуры, а также их число и сроки оптимальной трансплантации.

Эта работа была бы невозможна без патронажа академика РАМН Р.С. Карпова, а также Медицинской промышленной компании "Электропульс" (генеральный директор А.А. Кострикин), сотрудников НИИ кардиологии ГНЦ СО РАМН – д.м.н. А.С. Афонасьева, к.м.н. А.В. Крылатова, к.м.н. Н.В. Соленковой, сотрудников кафедры технологии силикатов Томского политехнического университета – проф. В.И. Верещагина, В.П. Игнатова, а также к.т.н. В.И. Итина, проф. Г.К. Попова, к.т.н. В.И. Карпицкого, академика РАМН Ю.М. Захарова, В.И. Пономарева, проф.

В.Э. Гюнтера, к.м.н. И.Н. Ивасенко, к.т.н. А.А. Милляра, проф. А.Я. Фриденштейна, академика РАМН Е.Д. Гольдберга, к.м.н. А.Л. Хшиво, проф. А.Г. Бабаевой, к.м.н. А.Б. Афонина, академика РАМН А.М. Дыгая, к.м.н. А.О. Голосова, А.А. Бадаева, В.Я. Яковлева, Е.В. Сергеевой, д.м.н. А.В. Карлова и многих других наших коллег, за что мы приносим им глубокую благодарность.

ГЛАВА 1

РАЗВИТИЕ СЕРДЦА. РОЛЬ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КАРДИОМИОГЕНЕЗЕ

1.1. РАЗВИТИЕ СЕРДЦА

Известно, что кардиомиоциты, миобласты и мезотелий эпикарда развиваются из висцерального листка спланхнической мезодермы, окружающей эндокардиальную трубку. Напротив, эндокард, а также соединительная ткань миокарда и эпикарда формируются из мезенхимы (Быков, 1997).

Линейная схема развития сердца у человека представлена на рис. 1.1, а схематическая картина формирования сердечной ткани – на примере куриного эмбриона (рис.1.2).

Эмбриональная мезенхима – это клеточная сеть рыхлой соединительной ткани, выполняющая множественные метаболические, сигнальные, механические (опорные) и морфогенетические функции. Конденсация мезенхимы за счет клоногенного роста стволовых клеток запускает синтез первичных морфогенетических сигналов, ведущих к закладке органов. Параллельно мезенхима обеспечивает опережающее развитие коммуникаций (кровеносные и лимфатические сосуды), а также формирует клеточный каркас (stroma) органов. Интервенция мезенхимальных клеток во время органогенеза необходима для "разметки" трехмерной "карты" будущих органов и рестрикции действия гомеозисных Нох-генов, определяющих будущие размеры и границы органов. Согласно концепции о позиционной информации, в организме существует морфогенетическое поле. Оно контролируется с помощью экспрессии гомеозисных генов типа *HOX1*, *HOX2*, *HOX3*, *HOX4*, *HOX7*, заставляя клетки помнить не только мес-

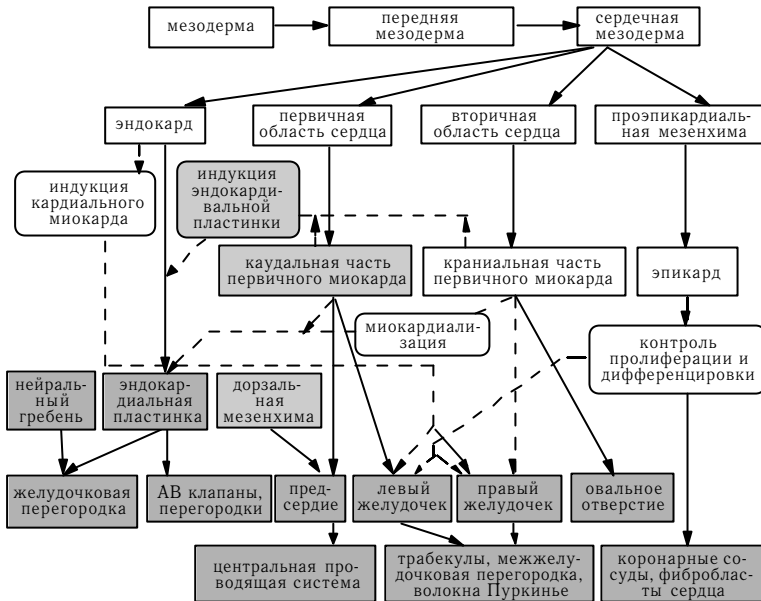


Рис. 1.1. Линейная схема кардиомиогенеза (Yarrison B., 1998, с дополнениями)

то своей локализации в соответствии с координационными осями, но и выполнять миссию, которую они должны осуществить в процессе своей жизни, например восстановление мышечных и сосудистых тканей при их повреждении. Считается, что в сохранении позиционной информации большую роль играют мезенхимальные элементы, в частности мезенхимальные стволовые клетки, макрофаги, эндотелий, лимфоциты, гладкомышечные волокна и фибробласты (Репин, 2000; Карлов, Шахов, 2001; Gilbert, 1994).

Независимое происхождение и множественные функции мезенхимы во внутриутробном развитии подчеркивают множественность функций этой гетерогенной клеточной сети. Сердце, печень, почки, легкие и другие органы собраны из повторяющихся "функциональных единиц" специализированных клеток (паренхимы) среди "прослойки" мезенхимы, формирующей каркас органа, кровеносные и лимфатические сосуды. Изучение стволовых клеток паренхимы кроветворной, иммунной и нервной

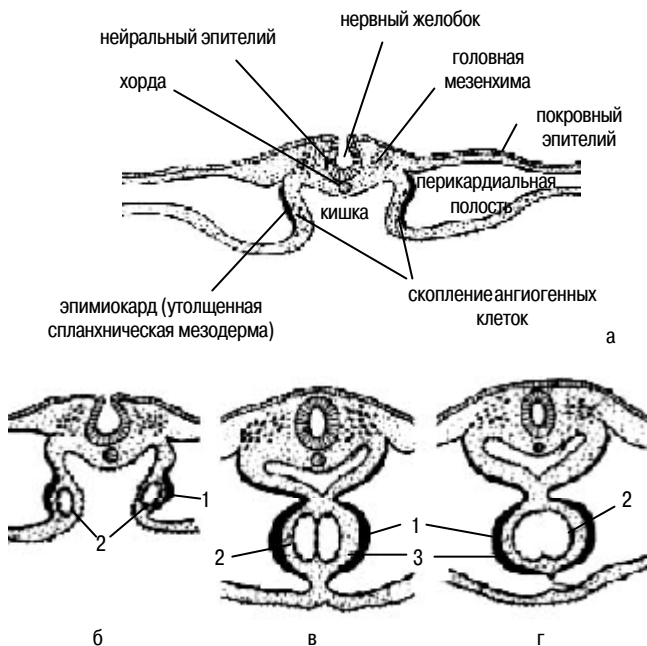


Рис. 1.2. Ранние этапы развития сердца куриного эмбриона: а) 25 ч; б) 26 ч; в) 28 ч; г) 29 ч. 1 – закладка эпикарда, 2 – закладка эндокарда, 3 – закладка миокарда (по В.Л. Быкову, 1998)

ткани значительно обогнало изучение стволовых клеток мезенхимы тех же органов (Репин, 2000).

Закладка сердца у человека происходит на 3-ю неделю внутриутробного развития, когда в шейном отделе над желточным мешком возникают из мезенхимы сначала две эндокардиальные трубки, выстланные эндотелием. Они представляют собой зачаток эндокарда. Трубки растут и окружаются висцеральным листком спланхнотомы. Спланхнотом утолщается и формирует миоэпикардиальные пластинки, которые окружают эндокардиальные трубки. По мере смыкания кишечной трубки обе закладки сердца сближаются, срастаются, а их внутренние стенки исчезают. При этом сердечная трубка имеет двухслойную структуру (однокамерное сердце), которая соединяется с развивающимися кровеносными сосудами (Гансбургский, Павлов, 1999).

Из эндокардиальной ее части формируется эндокард, а из миоэпикардиальной пластинки – миокард и эпикард (Румянцев, 1982; Полежаев, 1995, 2000). Данная схема развития сердца предполагает активное участие в морфогенезе мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Однако до настоящего времени остается неясным вклад МСК в эмбриональном и раннем постнатальном развитии сердечной ткани.

Согласно вышеуказанной схеме, гистогенез сердечной мышечной ткани происходит из прекардиальной мезодермы. Направленность этого процесса такова. Первоначально из мезодермальных стволовых клеток образуются фетальные кардиомиобласты. Затем они трансформируются в кардиомиоциты, способ-

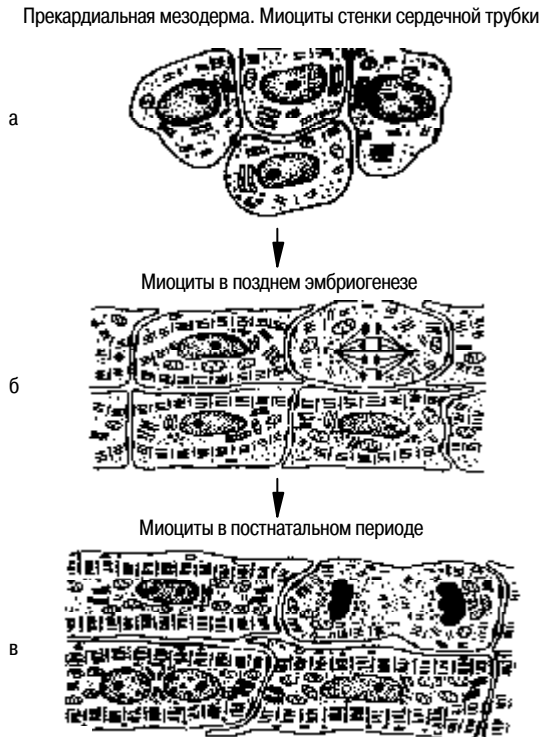


Рис. 1.3. Гистогенез сердечной ткани (по П.П. Румянцеву, 1982)

ные к делению. Этот процесс сопровождается появлением миофибрилл и постепенным возрастанием их количества (Румянцев, 1982).

Одновременно эволюционируют структуры вставочных дисков, диад, триад, трофического аппарата и формируются дефективные КМЦ. Процессы репродукции и миофибриллогенеза в этих клетках не находятся в столь конкурентных отношениях, как в скелетной мускулатуре. Следует отметить, что данные КМЦ сохраняют способность к митозам. Однако митоз часто не идет до конца, а происходит кариорексис с формированием одно-, двухъядерных КМЦ.

Кардиомиоциты и эндотелиальные клетки представляют собой первые два слоя в первичной сердечной трубке. Транскрипционные факторы Nkx2.5 и GATA-4 являются одними из наиболее ранних маркеров для прекардиальных клеток, которые возникают из латеральной пластинки мезодермы. До момента образования сердечной трубки прекардиальные клетки уже экспрессируют некоторые специфические кардиальные гены, включая и те, которые кодируют сократительные белки и предсердный натрийуретический фактор. Следовательно, дифференцировка кардиомиоцитов предшествует последующим морфогенетическим событиям, ведущим к формированию сердца. На линии клеток P19 было продемонстрировано, что GATA-4 способен только потенцировать, но не инициировать кардиальную дифференцировку. Эктопическая экспрессия каждого из генов, Nkx2.5, GATA-4, GATA-5 и GATA-6, у эмбрионов *Xenopus* недостаточна для индукции кардиомиогенеза. Требуется их координированное действие с другими факторами, присутствующими в прекардиальных клетках. Установлено, что GATA-4 фактор и Nkx2.5 могут взаимодействовать посредством С-терминальных "цинковых пальчиков" и соседней щелочной области GATA-4 и С-терминально распространяющегося гомеодомена Nkx2.5. Обнаружено, что GATA-4 и Nkx2.5 способны синергично активировать промотор натрийуретического гормона. Кроме того, их кооперация необходима для связывания с ДНК. Два домена активации в С- и N-терминальных областях GATA-4, а также репрессорный домен в С-терминальной области Nkx2.5 участвуют в этом процессе. Предполагается, что GATA-4 посредством взаимодействия с Nkx2.5 демаскирует С-терминальный ауторепрессорный домен Nkx2.5. Помимо взаимодействия с промотором натрийуретического гормона, выявлено взаимодействие GATA-4 / Nkx2.5 и с другими кардиальными промоторами и кардиальным α -актином. Ока-

залось, что избыточная экспрессия GATA-4 и Nkx2.5 в линии клеток P19CL6 достаточна для индукции кардиальной программы дифференцировки. Кроме того, взаимодействие GATA-4/Nkx2.5 управляется с помощью морфогенетического белка кости (МБК) сигнального пути через митоген активируемую протеинкиназу (МАПК). Одной из особенностей взаимоотношений GATA-4/Nkx2.5 является их высокая специфичность. Nkx2.5 взаимодействует с GATA-4 и GATA-5, но не с GATA-6. Установлено, что GATA и Nkx белки могут взаимодействовать на нескольких уровнях. При этом оказалось, что GATA-4 и GATA-6 являются ко-факторами. Взаимодействие GATA и MEF2 факторов показало, что их продукт является экспрессирующим ко-фактором, обладающим гистонацетилтрансферазной активностью (Wobus, Guan, 1998; Farrell, Kirby, 2001; Boheler et al., 2002).

На 4–5-й месяц развития плода начинает формироваться проводящая система сердца. Следует отметить, что с этого времени картина ЭКГ во многом аналогична сердцу взрослого человека. Еще одной особенностью образования проводящей системы у плода является то, что скорость дифференцировки кардиомиоцитов проводящей системы выше, чем у рабочих кардиомиоцитов.

В качестве индуктора кардиомиогенеза в системе *in vitro* последнее время наиболее часто используют вещество 5-азациитидин, которое, как предполагается, может блокировать остеогенную и жировую дифференцировку МСК (Doetschman et al., 1985; Grounds et al., 2002).

Кардиомиоцитоподобные клетки экспрессируют специфические гены: BNP, GATA4 и NKx2,5/Csx. По своему строению (структуре миофибрилл, наличию гранул) и способности к экспрессии гена ANP эти клетки приближаются к фетальным желудочковым кардиомиоцитам, которые определяются в сердце новорожденных крысят (Venance, Pang, 1989; Makino et al., 1999). Установлено, что полипотентные эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) могут дифференцироваться в кардиомиоциты *in vitro* с эффективностью около 50% (Doetschman et al., 1985; Wobus et al., 1991; Rohwedel et al., 1996). Эти клетки развились из тотипотентной эмбриональной бластоцисты и ранней мезодермы, энтодермы и эктодермы. Для МСК эта величина составляет около 30% (Makino et al., 1999). Эти данные косвенно подтверждают принципиальную возможность участия МСК в кардиомиогенезе.

Тем не менее, вопрос, как и на какой стадии развития эмбри-

она и раннего постнатального периода МСК включаются в процесс кардиомиогенеза, остается неясным.

1.2. СЕРДЕЧНАЯ ТКАНЬ ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА

Существуют пять специфических типов клеток сердечной ткани: рабочие, пейсмекерные, переходные, проводящие и секреторные кардиомиоциты. Кардиомиоциты составляют около 30% общего числа клеток миокарда. Однако их объем равен более 75% объема сердечной мышцы. Их масса варьирует в пределах 50% массы всего миокарда.

1.2.1. РАБОЧИЕ (СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ) КАРДИОМИОЦИТЫ

Рабочие (сократительные) кардиомиоциты сердца представляют собой морфофункциональные единицы сердечной мышечной ткани, расположены между элементами рыхлой волокнистой соединительной ткани, содержащей многочисленные капилляры и терминальные ветви двигательных аксонов клеток вегетативной нервной системы. Они имеют удлинненную (100–150 мкм) цилиндроподобную форму с одним, реже двумя и более, овальными, расположенными ближе к центру ядрами (рис. 1.4). Их концы соединяются друг с другом, образуя цепочки клеток,

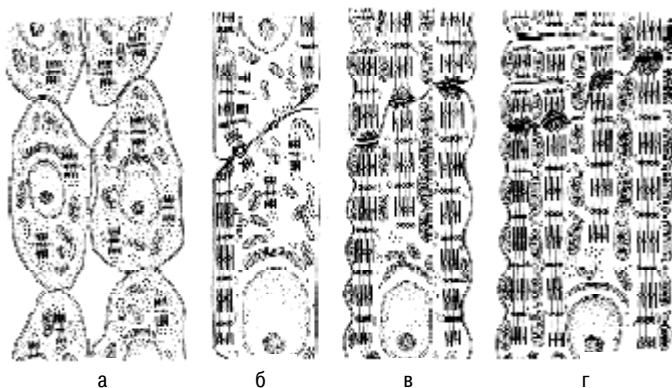


Рис. 1.4. Изменения ультраструктуры и формирования контактов кардиомиоцитов эмбриона (а), плода (б), новорожденного (в) и взрослого (г) человека (по О.В. Волковой, М.И. Пекарской, 1976)

формирующие функциональные волокна толщиной до 20 мкм, способные передавать управляющие сигналы друг другу через систему вставочных дисков. Клетки покрыты сарколеммой, состоящей из плазмолеммы и базальной мембраны, интегрированные с тонкими коллагеновыми и эластичными волокнами. На концах контактирующих КМЦ имеются пальцеобразные выпячивания и углубления, получившие название вставочных дисков. Выrost одной клетки достаточно плотно входит в углубление другой, образуя вставочный диск. На конце такого выступа можно выделить поперечный участок сконцентрированных контактов двух типов – десмосом (препятствующих расхождению кардиомиоцитов за счет механического сцепления) и промежуточных, где происходит прикрепление тонких актиновых нитей ближайшего саркомера к сарколемме КМЦ. На боковой поверхности выступа, формирующего его продольную часть, образуются многочисленные нексусы – щелевые контакты. Через эти ионные каналы происходит распространение возбуждения от одного рабочего КМЦ к другому. Рабочие КМЦ с помощью вставоч-

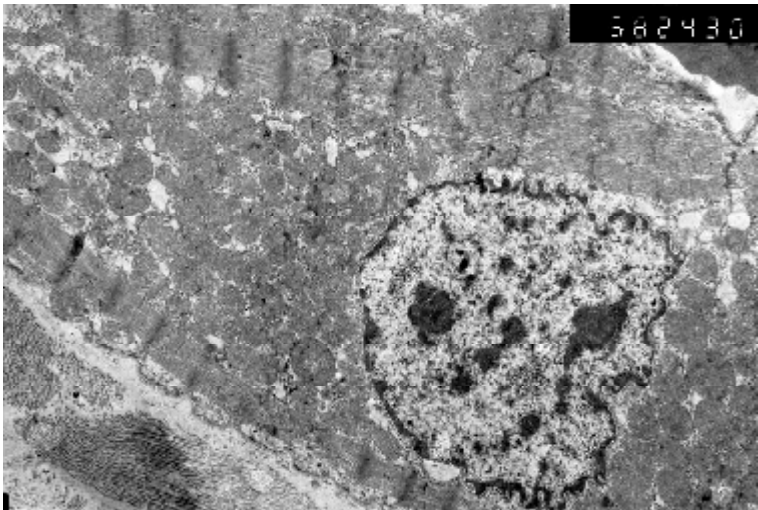


Рис. 1.5. Электронная микроскопия рабочего кардиомиоцита крысы. Хорошо видны: ядро с ядрышками, многочисленные митохондрии, поперечная исчерченность. Ув. 5800х

ных дисков объединены в так называемые сердечные мышечные волокна — функциональный синцитий.

Организация миофибрилл в КМЦ, входящих в их сократительный аппарат, во многом повторяет таковую для скелетной мышцы. Поперечная исчерченность КМЦ определяется чередованием в миофибриллах различно преломляющих поляризованный свет участков (дисков). Одни из них относятся к светлым изотропным (I), другие — к темным анизотропным (A) дискам (рис. 1.5, 1.6). Это определяется тем, что светлые диски не содержат, а темные содержат толстые миозиновые нити. Тонкие миозиновые нити состоят из актина, тропомиозина и тропонина, а толстые — из С-белка и миозина.

Актин — ключевой протеин, входящий в состав так называемого актиномиозинового хемомеханического преобразователя. Согласно модели скользящих нитей, сокращение клеток и волокон мышечных клеток осуществляется в результате взаимодей-

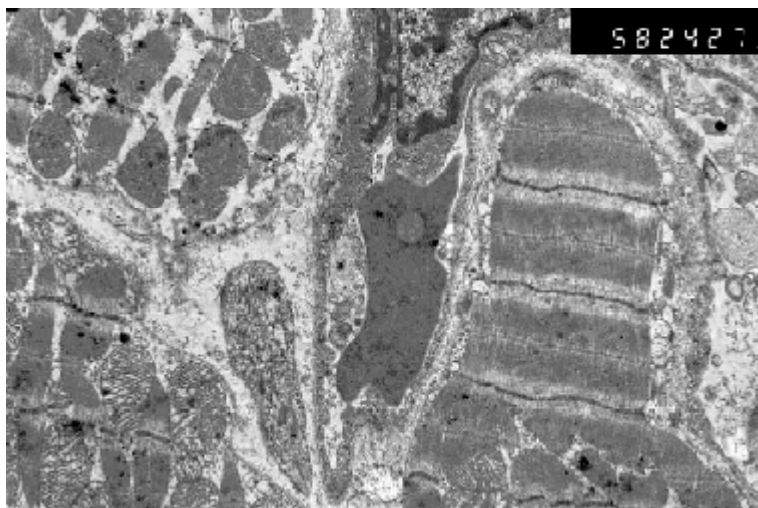


Рис. 1.6. Электронная микроскопия рабочих кардиомиоцитов человека в поперечных (слева) и продольном (справа) сечениях. Между ними находится капилляр с эритроцитом, а также перичитом. Видны многочисленные митохондрии в клетках. Справа в КМЦ отчетливо видна базальная мембрана, Z- и M-линии, H-зона, I-диск, A-диск. Ув. 5800х

ствия актина и миозина. Присутствует в глобулярной (G-a) и фибриллярной (F-a) формах. Изоформа α -актина кардиомиоцитов, входящих в состав Z-линии, является гомодимером, состоящим из двух полипептидов с м.м. 97 кД, отличается от молекулы α -актина скелетной мускулатуры, что является специфическим маркером данных клеток. Эти формы актина служат посредником между актином микрофиламентов и винкулином и талином – протеинами, связанными с мембранными интегринными. Винкулин является представителем белков, формирующих цитоскелет, а талин – сложный протеин с м.м. 270 кД – связывает, в свою очередь, винкулин с интегринными. Интегрины образуют семейство трансмембранных гликопротеинов, участвующих в качестве рецепторов в реакциях адгезии "клетка с клеткой" и "клетка с белками внеклеточного матрикса" (коллаген, эластин, фибронектин, витронектин и т.п.). Это гетеродимеры, состоящие в разных клетках из различных α - и β -субъединиц, формирующих внутриклеточные и внеклеточные домены. Они участвуют в передаче сигналов, регулирующих экспрессию геном и пролиферацию клеток. Актиновые нити образуют поперечные связи с α -актином, который, в свою очередь, может взаимодействовать с цитоплазматической частью β -субъединицы интегрина как непосредственно, так и через систему "винкулин – талин".

Тропомиозин входит в состав тонких нитей и состоит из двух полипептидных цепей, образующих двойную спираль. Полярные молекулы тропомиозина укладываются конец в конец в желобке между двумя спиральными цепочками F-актина. Кроме того, связываются с TnT участком тропонина с интервалом около 40 нм.

Тропонин – сложный протеиновый комплекс, состоящий из трех глобулярных субъединиц – TnT, TnC и TnI. TnC является Ca-связывающим белком, участвует в регуляции обмена кальция, а TnI – ингибиторный компонент, препятствует взаимодействию актина с миозином. Тропонин T связывает тропониновый комплекс с тропомиозином. Ген сердечного тропонина TNNT2, CMH расположен в Iq3 локусе 1-й хромосомы человека, а тропонина-I – в 19p13.2-q13.2 локусе TNNI3, TNN гена, определяющегося в 19-й хромосоме.

C-белок стабилизирует структуру миозиновых нитей, контролируя агрегацию миозина, обеспечивает одинаковый диаметр и стандартную длину толстых нитей. Его MYBPC1 ген расположен в Xp.12 локусе 12-й хромосомы человека рядом с генами миогенных факторов 5 и 6.

Миозин представляет собой гексамерный протеин, содержащий две тяжелые и четыре легкие цепи. Легкая ветвь сердечного миозина кодируется геном MYL2, расположенным в 12q23-q24.3 локусах 12-й хромосомы, а тяжелые α -форма – MYH6, β -форма – MYH7, SMH1 – генами, локализованными в 14q12 локусе 14-й хромосомы человека. Тяжелые цепи имеют форму двух спирально закрученных полипептидных нитей, имеющих на своих концах шарообразные (глобулярные) головки. В области глобулярных головок тяжелые цепи связываются с легкими. В мышечных волокнах миозин выполняет роль АТФазы (West, 1990).

Каждый светлый диск пересекает Z-линия, которая соединяет ее с толстой миозиновой нитью с помощью белка титина. Титин – гигантский полипептид с м.м 3000 кД, выполняющий роль своеобразной пружины.

Участок миофибриллы между соседними Z-линиями определяют как саркомер, являющийся его структурной единицей.

Т-трубочки в КМЦ проходят на уровне Z-линий. В связи с этим в большинстве случаев Т-трубочка контактирует только с одной терминальной цистерной, образуя, в отличие от скелетных мышц, диады, а не триады. Через них происходит передача возбуждения в виде возникновения потенциала действия через Ca^{++} каналы.

Главным источником энергии в КМЦ являются жирные кислоты, а не углеводы. При этом необходимая энергия формируется за счет взаимодействия АДФ с креатинфосфатом, в результате чего образуются АТФ и креатинин.

В отличие от рабочих желудочковых КМЦ, миоциты предсердий имеют ряд отличий, связанных в первую очередь с тем, что они выполняют меньшую сократительную функцию и играют большую роль в проведении возбуждения, секреции биоактивных веществ. В связи с этим их размеры несколько меньше, часть из них приобретает отросчатую форму с увеличением количества митохондрий, миофибрилл, Т-систем. При этом развитость саркоплазматического ретикулума у них ниже, с относительно повышенной гранулярностью.

В состав сократительного аппарата КМЦ предсердий и желудочков входят разные изоформы миозина, актина и других контактильных белков. Так, ген предсердного миозина (легкая цепь) имеет структуру, характерную для эмбриональных клеток, и кодируется MYL4 геном, расположенным в Хр.17 локусе 17-й хромосомы, тогда как в рабочих КМЦ этот белок локализуется в

12-й хромосоме человека. В предсердных КМЦ более выражен аппарат Гольджи и щелевидные контакты во вставочных дисках. Часть из них, особенно расположенных в области правого предсердия и ушков сердца, имеют еще более развитый аппарат Гольджи, гранулярный эндоплазматический ретикулум, содержащий в своем составе секреторные гранулы, аккумулирующие, в частности, такие пептиды, как натрийуретический фактор С, атриопептин и т.п. Это позволяет отнести их к группе секреторных клеток. Они реагируют на механическое растяжение, секретирова в кровь гормоноподобные вещества, которые через юктагломерулярный аппарат почек регулируют объем циркулирующей крови и артериальное давление.

Следует отметить, что предсердные КМЦ отличаются от желудочковых еще и тем, что в них более выражено участие гликогена в метаболизме клетки, за счет увеличения активности таких ферментов, как гликогенсинтетазы и фосфоорилазы на фоне снижения уровня сукцинатдегидрогеназы.

1.2.2. Пейсмекерные (синусные, клетки водители ритма, клетки проводящей системы первого типа, Р-клетки) кардиомиоциты

Эти клетки обладают способностью автоматически в определенном ритме сменять состояние сокращения на расслабление, воспринимают управляющие сигналы от нервных волокон. Пейсмекерные КМЦ формируют необходимый ритм сокращения сердца, создавая волну возбуждения через переходные и проводящие кардиомиоциты (рис. 1.7, а).

В центральной части синусового узла происходит формирование импульса Р-клетками с частотой 60–90 импульсов в минуту. По сравнению с рабочими кардиомиоцитами они имеют меньшие размеры с диаметром около 8–10 мкм, с небольшим количеством рыхло упакованных миофиламентов. А- и I-диски различаются нечетко. Кроме того, в них образование энергии происходит преимущественно за счет анаэробного гликолиза. Между этими клетками встречаются единичные межклеточные контакты в виде десмосом (адгезионные контакты) и некусов (щелевые контакты). Через щелевые контакты происходит ионное и метаболическое сопряжения клеток через трансмембранные протеины – коннексины, которые образуют каналы, регулирующие уровень внутриклеточного кальция.

Способность к генерации импульсов обусловлена высоким содержанием в цитоплазме свободного кальция при относитель-

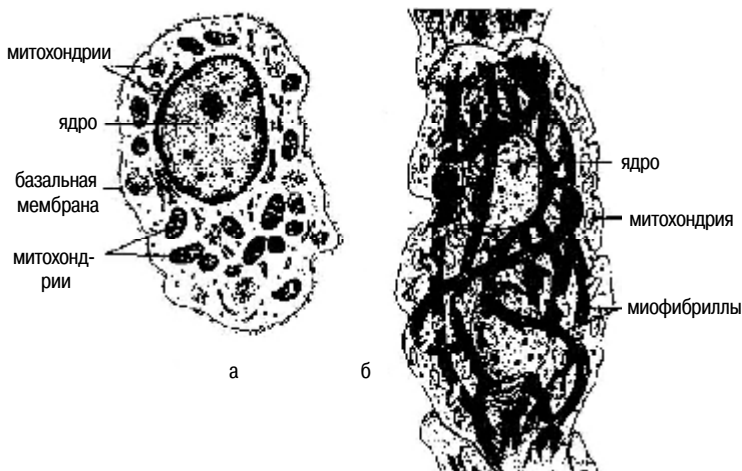


Рис. 1.7. Атипичные КМЦ (а) и КМЦ проводящей системы (б) (Н. Hees, F. Sinowefz, 1952)

но слабо развитой саркоплазматической сети. Система Т-трубочек практически отсутствует. В цитоплазме выявляется большое количество пиноцитозных пузырьков и кавеол.

Ткани синусового и атриовентрикулярного узлов имеют более высокое содержание соединительных волокон, кровеносных сосудов и нервных элементов (нейроны и двигательные нервные окончания), примерно в 1,5–5 раз превышающее таковое в рабочем миокарде. Однако следует отметить, что типичных нервномышечных синусов в них нет.

1.2.3. Переходные кардиомиоциты (клетки проводящей системы второго типа)

По периферии синусового узла, а также большей части атриовентрикулярного доминируют переходные клетки. Они больше Р-клеток, имеют вытянутую форму, могут содержать небольшое количество коротких Т-трубочек и миофибрилл.

Наряду с десмосомами и некуссами межклеточные контакты могут осуществляться за счет вставочных дисков. Основная функция этих клеток заключается в том, что они передают импульс от пейсмекерных КМЦ к клеткам пучка проводящей системы и

его ножек к рабочим кардиомиоцитам. Они способны к спонтанной генерации возбуждения с частотой 30–40 импульсов в минуту.

1.2.4. Клетки пучка Гиса и его ножек (волокна Пуркинье) (клетки проводящей системы третьего типа)

Клетки пучка Гиса больше клеток проводящей системы второго типа. Имеют эксцентрично расположенное ядро, тонкие относительно длинные миофибриллы, которые располагаются небольшими спиралевидными пучками по периферии клетки, мелкие митохондрии и небольшое количество гликогена. В них практически отсутствуют Т-трубочки. Они проводят импульс возбуждения от водителей ритма к волокнам Пуркинье (рис. 1.7, б).

Клетки волокон Пуркинье являются самыми большими клетками в сердечной ткани. Между собой они связаны большим количеством десмосом и щелевидных контактов, что обеспечивают высокую скорость проведения импульса. В них много гликогена, редкая сеть хаотично расположенных миофибрилл и отсутствуют Т-трубочки и вставочные диски.

1.3. ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КАРДИОМИОЦИТЫ

Исследование биологических свойств плюрипотентных стволовых клеток начато относительно недавно. Тотипотентные свойства сохраняются у эмбриональных клеток (ЭК) от стадии 2 до 8-го клеточного бластомера. Стволовые клетки, выделенные из эмбриона, в частности из внутренней массы клеток (эмбриобласта), бластоцисты, эмбриональной эктодермы и клеток полового гребня, имеют уже плюрипотентные свойства (Bradley et al., 1984; Deutschman et al., 1985; Wobus, 2001; Blau et al., 2001).

Прогениторные клетки и стволовые клетки взрослого организма способны к формированию мультипотентных типов стволовых клеток, но, как полагают, имеют более ограниченный потенциал, чем ЭСК. К настоящему времени выделено не менее трех типов плюрипотентных СК, соответствующих зародышевым листкам от эмбрионов млекопитающих на стадии эпибласта и из эмбрионального рака. Более поздние ЭК такими свойствами не обладают. Интересно, что если ЭК перенести в бластомер или включить в бластоцисту, то они вновь приобретают низкодиф-

ференцированные свойства и могут давать начало практически любым тканям организма, включая образования химер. В культуре ткани такие ЭСК требуют присутствия фидерного слоя, например, состоящего из эмбриональных фибробластов или STO клеток и лейкемииингибирующего фактора (ЛИФ) (Burdon et al., 1999). В этих условиях ЭСК развиваются относительно нормально, с сохранением здорового и устойчивого кариотипа, и имеют практически неограниченную способность к самоподдержанию (рис. 1.8) (Evans, Kaufman, 1981; Thomson et al., 1998).

Все это позволяет предположить, что данные клетки и полученные из них линии могут быть использованы в терапевтических целях (Thomson et al., 1998; Shambloott et al., 1998). Так, в эксперименте из ряда ЭСК мыши и человека была изучена принципиальная возможность их трансформации в КМЦ в системе *in vitro* (Doetschman et al., 1985; Skerjanc, 1999).

Наиболее частым объектом для изучения кардиомиогенеза являются культуры ЭК мыши. Использование генетических, структурных и функциональных свойств таких клеток в какой-то мере привело к пониманию программы развития кардиомио-

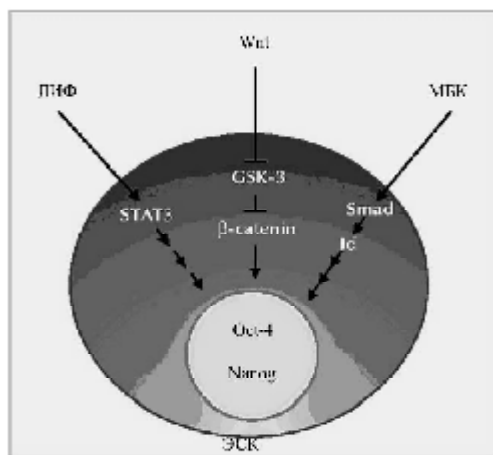


Рис. 1.8. Факторы, влияющие на дифференцировку ЭСК в направлении кардиомиогенеза: ЛИФ – лейкемииингибирующий фактор; МБК – морфогенетические белки кости; STAT 3, GSK-3, Smad, Id, β -catenin – цитоплазматические, трансмембранные протеины; Oct-4, Nanog – ядерные мессенджеры (К. Monzen, 1999)

цитов из ЭСК (Wobus et al., 1991; Rohwedel et al., 1996). Позднее аналогичные работы по развитию сердца из ЭСК были проведены и у человека (рис. 1.9) (Schuldiner et al., 2000; Kehat et al., 2001).

Процесс дифференцировки ЭСК в культуре ткани типа височной капли *in vitro* в течение 2–3 суток начинается с образования клеточных агрегатов. При последующем переносе их на фидерный слой эмбриональных фибробластов они на 3–7-е сутки формируют три типа зародышевых листков – эктодерму, энтодерму и мезодерму. К 7-м суткам в культуре появляются кардиомиоциты для которых было характерно наличие β -тубулина, тяжелой цепи α -миозина, легкой цепи 2v-миозина, тропонина Т и прояв-



Рис. 1.9. Схема получения ЭСК из карциномы, бластоцисты и полового бугорка фетуса (I. Wobus, 2002)

ление специфических для сердечной ткани электрофизиологических свойств (Wobus et al., 2002).

На процесс дифференцировки ЭСК в сторону кардиомиогенеза влияют многочисленные факторы и параметры культивирования, начиная от стартового числа клеток, размеров формируемых из них эмбрионных тел (ЭТ), ростовых факторов и добавок, выхода культуры на "плато" (Wobus et al., 2002). В ЭТ, кардиомиоциты расположены между эпителиальным слоем и базальным слоем мезенхимальных клеток (Hescheler et al., 1997).

КМЦ в эмбрионных тельцах после достижения ими плато своего развития, обычно на 4–5-е сутки, начинают спонтанно формировать между собой контакты и зоны – водители ритма. Между каждой бьющейся областью быстро устанавливаются связи, уровень которых повышается по мере дифференцировки и созревания КМЦ. Как правило, это свойство КМЦ сохраняется от нескольких дней до 1 месяца. Полностью дифференцированные кардиомиоциты часто утрачивают способность к сокращению. В культуре ткани *in vitro* J. Hescheler et al. (1997) выделяют три стадии дифференцировки сердечных клеток: раннюю (пейсмейкерподобные или первичные миокардиальноподобные клетки), промежуточную и терминальную (атриовентрикулярные, центральные и пуркинье-подобные клетки).

В течение ранних стадий дифференцирования, кардиомиоциты в пределах ЭТ представлены небольшими округлыми клетками. Как правило, обнаруживающиеся в них миофибриллы редки и плохо организованы, и часто бывают неполноценными. Тем не менее, другие КМЦ содержат параллельные связи миофибрилл (Westfall et al., 1997). Смежные кардиомиоциты часто показывают различную степень организации миофибрилл. По мере созревания клетки удлиняются, в них достаточно хорошо выражены миофибриллы и саркомы. Бьющиеся клетки формируют межклеточные контакты, во многом повторяющие структуру, наблюдаемую у развивающегося сердца (Westfall et al., 1997). При терминальной стадии дифференцирования в КМЦ миофибриллы, как правило, плотно упакованы, хорошо организованы и связаны между собой с четким проявлением саркомов, I-полос и Z-дисков (Fassler et al., 1996; Westfall et al., 1997). При этом обнаруживаются характерные для сердечной ткани вставочные диски, фасция адгеренс, десмосомы и другие межклеточные контакты (Doetschman et al., 1985; Robbins et al., 1990; Klug et al., 1996; Oyamada et al., 1996). В целом анализ данных различных авторов позволяет говорить о том, что образующиеся из ЭСК карди-

омиоциты *in vitro* по своей ультраструктуре, длине, диаметру, архитектонике и составу миофибрилл во многом соответствует таковым, наблюдаемым у новорожденных млекопитающих. В них рано, на стадии образования эмбрионидных тел, происходит экспрессия кардиальных генов, в частности они положительно реагируют на мРНК для GATA-4 и Nkx2.5 факторов транскрипции. Кроме того, эти клетки продуцируют предсердный натрий-уретический пептид, в них выявляются: легкая цепь миозина (ЛЦМ)-2v, тяжелая цепь α -миозина (α -ТЦМ) и β -миозина (β -ТЦМ), циклические колебания уровня Na^+ , Ca^{2+} ионов, и фосфаты. Белки саркомеров в кардиомиоцитах, полученных из ЭСК, содержат: титин (Z-диск, М-полоса), α -актин, миомезин, ЛЦМ, кардиальный тропонин Т и М (Boheler, Wobus, 2002). Фетальные КМЦ содержат небольшое количество I-тропонина, характерного для скелетных мышц, и достаточно высокую долю β -ТЦМ против α -ТЦМ и одновременно кардиальный I α -тропонин (Westfall et al., 1997). Все это может свидетельствовать о том, что ассоциированные с кардиомиогенезом гены продуцируются и функционируют в ЭСК в разное время и во многом соответствуют нормальному миокардиальному развитию (Kemp et al., 2002; Bhattacharya et al., 2004).

Спонтанно и ритмично сокращающиеся КМЦ наблюдаются в культуре ткани достаточно рано, кардиомиоциты имеют электрофизиологические характеристики, во многом соответствующие первичному миокарду плода. При дальнейшей дифференцировке вновь образующихся КМЦ из ЭСК они приобретают черты миокарда новорожденных организмов (Hescheler et al., 1997; Metzger et al., 1997). В них определяются рабочие кардиомиоциты, клетки Пуркинье, пейсмейкеры, которые по своим морфофункциональным характеристикам, в частности чувствительности к кальцию и межклеточным контактам, во многом соответствовали фетальным и неонатальным КМЦ. Однако в некоторых клетках слабо были выражены Т-каналы (Metzger et al., 1997; Hescheler et al., 1999). В терминальной стадии развития ЭСК, в отличие от ранней КМЦ, становятся более чувствительны к β -адренергическому возбуждению (Maltsev et al., 1999).

Индукцию кардиомиогенеза из ЭСК можно вызвать разнообразными факторами. Так, у мышей ЭК линии P19 под действием диметилсульфоксида формируются эмбрионидные тельца с высоким содержанием КМЦ (Skerjanc, 1999). Эти КМЦ способны к спонтанному сокращению и имеют параметры, характерные для ранних и терминально дифференцированных кардиомиоцитов (Wobus et al., 1994). Аналогичные данные были получены и для других линий,

например EG-1 (Rohwedel et al., 1996). Все эти клетки экспрессируют гены, ответственные за формирование специфических кардиомиогенных миофибрилл, принимающих участие в мышечном сокращении.

1.3.1. Манипуляции над ЭСК, приводящие к их кардиогенной дифференцировке

Известно, что GATA-4 ген включает программу кардиогенного развития мезодермальных клеток в процессе эмбрионального развития. При введении в ЭСК, клетки линии P19 GATA-4 гена, регулирующие кардиальные факторы транскрипции, приводят к снижению специфических эмбриональных маркеров типа Oct-4, SSEA-1 с повышением уровня мРНК для Nkx 2.5, MLP, Mhox, сократительных протеинов (кардиального тропанина C, тяжелой цепи β -миозина), натрийуретического пептида (Wobus, Guan, 1998; Boheler et al., 2002).

Сверхэкспрессию специфического гена можно вызвать путем инъекции в ядро соответствующего генетического материала. Такая технология часто используется для получения трансгенных мышей. Такую технику применили Grier с соавторами (2000) путем введения GATA-4 гена в линию P19 ЭСК. Оказалось, что при отсутствии клеточной агрегации сверхэкспрессия GATA-4 гена в P19 клетках приводит к увеличению мРНК для факторов транскрипции типа Nkx2.5, MLP, и Mhox, сократительных белков (кардиальный тропонин C и β -ТЦМ), пептидных натрийуретических гормонов и ускорению терминальной дифференцировки (см. рис. 1.8). Таким образом, GATA-4 вносит вклад в дифференциацию мезодермальных клеток, активизирует кардиальную генетическую программу и является ядерной мишенью для индукции сигналов в определяющих коммитирование клетках-предшественниках для КМЦ.

У эмбрионов позвоночных в качестве сигнальной молекулы, рекрутирующей мезодермальные клетки в кардиомиоциты, служат морфогенетические белки кости 2 и 4-го типов (МБК-2, -4). Изучая роль МБК в дифференцировке КМЦ из клональной линии P19CL6, К. Монзен (1999) с соавторами показали, что суперэкспрессия данного протеина является в то же время антагонистом *poggin* гена. С другой стороны, суперэкспрессия *poggin* гена блокирует активацию генов, ответственных за выработку кардиальных факторов транскрипции, сократительных белков, предотвращая тем самым дифференцировку СК в способные к

сокращению КМЦ. Процесс дифференцирования СК в кардиомиоциты можно индуцировать: 1) путем суперэкспрессии МБК-2, 2) добавлением данного фактора в культуру клеток или 3) активацией ТАК-1 гена, относящегося к членам суперсемейства митоген-активированной протеин-3-киназы, которая преобразовывает передачу сигналов от МБК. Данная группа исследователей также продемонстрировала, что одновременная сверхэкспрессия Nkx-2.5 и GATA-4, но не Nkx-2.5 или GATA-4 по отдельности, может вызывать кардиогенную дифференцировку P19CL6 *poggip* клеток. Эти данные, полученные в системе *in vitro*, позволяют уточнить роль МБК в дифференцировке СК в кардиомиоциты. Однако механизм этого явления остается во многом еще малоизученным.

Следует отметить, что процент спонтанной дифференцировки ЭСК в кардиомиоциты в обычных условиях чрезвычайно мал и часто не превышает 3–5%, что делает их малоприспособленными для проведения клеточной терапии. В связи с этим целью многочисленных исследований является разработка технологий, повышающих этот параметр (Klug et al., 1996), например, с помощью трансдукции в СК разнообразных промоторных генов, ответственных за кардиогенную дифференцировку, в частности за продукцию легкой (ТЦМ-2v) и тяжелых ветвей миозина (β -ТЦМ), а также α -актина. Часто эти гены были связаны с геном, ответственным за продукцию зеленого флуоресцирующего протеина, что облегчает идентификацию образующихся кардиомиоцитов в системах *in vitro* и *in vivo*. Оказалось, что процент клеток, имеющих кардиальные маркеры, увеличивался до 99,6% (Wobus et al., 1991; Klug et al., 1996; Meyer et al., 2000; Muller et al., 2000). Тем не менее, не смотря на столь обнадеживающие результаты, следует подчеркнуть, что ген-модифицированные клетки в настоящее время запрещены ВОЗ к применению в клинической практике, т.к. негативные последствия данных манипуляций практически остаются малоизученными и требуют более углубленного исследования.

Кроме МБК, другие факторы, в частности лейкемииингибирующий фактор (ЛИФ), интерлейкин-6, обладают плеотропным действием, в которое вовлечена не только мезодерма, но и нейроектодерма, гемопоэз, процессы костеобразования и острое воспаление (Taupin et al., 1996).

ЛИФ важен для имплантации бластоцисты, самоподдержания СК и регулирует функцию эмбриональных и неонатальных КМЦ. Действие ЛИФ на кардиогенную дифференцировку ЭСК

достаточно сложно. Так, присутствие растворимой формы данного фактора в культуре ткани эмбрионных телец на 0–4-е сутки, с одной стороны, ингибирует образование мезодермы, а с другой – стимулирует кардиомиогенез (Bader et al., 2000).

Дефицит продукции ЛИФ или числа рецепторов для него на клетках, полученных методом "кнокаута" – выключения того или иного гена, приводит к нарушению процессов коммитирования и дифференцировки ЭСК в кардиомиоциты. Интересно, что низкие концентрации ЛИФ действуют на "кнокаут" клетки со сниженным числом рецепторов для данного фактора, стимулируя кардиомиогенез, тогда как высокие, напротив, замедляют этот процесс (Bader et al., 2001).

Использование ЛИФ-дефицитных клеток позволило выявить ряд новых факторов, принимающих участие в развитии сердца. Так, было показано, что ген *Cripto-1*, экспрессирующий эпидермальноподобный фактор роста, хорошо выражен в трофобласте, внутренней массе бластоцисты и впоследствии вызывает рестрикцию развития миокарда (Ciccodicola et al., 1989). Эмбрионы мышей, дефицитных по *Cripto-1* (*tdgf*), обычно погибают до рождения. Тем не менее, в системе *in vivo* его инактивация приводит к предотвращению экспрессии кардиальных транскриптов для α -, β -ТЦМ, ЛЦМ-2 α и 2 ν , а также антидиуретического фактора, и приводит к формированию дефектной прекардиальной мезодермы. Снижение функции *Cripto-1* в ЭСК мало влияет на процессы дифференцировки мезенхимальных, энтодермальных и эктодермальных элементов, но приводит к инактивации генов, ответственных за экспрессию ТЦМ, ЛЦМ-2 α и 2 ν . Следует отметить, что функция ряда факторов кардиальной транскрипции (*Nkx2.5*, *GATA-4*, и *MEF2C*) сохраняется в данной системе. Возможно, *Cripto-1* выполняет роль мастер-гена, регулирующего прогрессию мезодермы к формированию функционально полноценного миокарда (Xu et al., 1999).

GATA-4, вместе с *GATA-5* и *GATA-6* транскриптами, присутствует в прекардиальной мезодерме и впоследствии секвестрируется в эндокардиальный и миокардиальный слой сердечной трубки и развивающегося сердца (Wobus, Guan, 1998; Farrell, Kirby, 2001; Boheler et al., 2002). При недостатке *GATA-4* процесс формирования плода у мышей останавливается еще в матке из-за возникновения кардиальных дефектов (Kuo et al., 1997; Molkentin et al., 1997). С другой стороны, супрессия данного транскрипта в системе *in vitro* приводит к относительно слабому ингибированию процесса кардиогенной дифференцировки ЭСК

(Grepin et al., 1997). В образующихся КМЦ сохраняются саркомеры и атриовентрикулярные комплексы. По-видимому, роль GATA-4 в кардиомиогенезе не является детерминирующей, так как из ЭСК с дефицитом данного транскрипта сохраняется способность к формированию всех трех зародышевых листков с выраженными миокардиальными маркерами. Можно полагать, что другие гены данного семейства, типа GATA-5, -6, восполняют дефицит функции GATA-4 (Narita et al., 1997).

Другие гены, в частности основного семейства HAND1 (Helix-loop-helix), принимающие участие в ранних стадиях кардиомиогенеза ЭСК, не вызывают для их кардиальной дифференцировки в системе *in vitro*. Возможно, их функцию компенсируют другие гены, в частности Nkx2.5 и ответственные за продукцию α -актина, ЛЦМ-2v и ЛЦМ-2 α (Firulli et al., 1998; Riley et al., 2000).

1.3.2. Роль цитоскелета и экстрацеллюлярного матрикса в трансформации ЭСК в кардиомиоциты

Соответствующее развитие сердца в эмбриогенезе во многом зависит от структурной интеграции элементов, формирующих сердечную трубку, в частности протеинов экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) и сократительных белков. Достаточно убедительно продемонстрировано, что протеины ЭЦМ принимают участие в процессах пролиферации и дифференцировки ЭСК в кардиомиоциты через механические и биохимические пути, использующие поверхностные рецепторы и белки цитоскелета, в частности коллаген, десмин и интегрин-1 (Schoenwaelder, BurrIDGE et al., 1999). Однако они не всегда нужны для нормального развития КМЦ. Тем не менее, у животных с мутацией образования десмина частично супрессируется образования миокарда (Weitzer et al., 1995). С другой стороны, "кнокаут" у мышей с дефицитом образования коллагена 1-го типа может привести к разрыву сосудов на 13-е сутки развития эмбриона (Schnieke et al., 1983). На ранних стадиях развития плода или эмбрионидных телец *in vitro* наблюдается некоторое снижение образования числа сокращающихся КМЦ, которое позднее приходит к контрольным величинам. При этом образования мРНК для α -, β -ТЦМ, ТЦМ-2v, антидиуретического пептида практически не изменялось (Chipman et al., 1993; Ding, 1999).

Дефицит продукции интегрина-1 в ЭСК приводит к задержке их кардиального развития и активации генов, ответственных за

продукцию α -, β -ТЦМ, ТЦМ-2v, антидиуретического пептида и нарушению архитектоники саркомеров (Fassler, Meyer, 1995). Обычно остаются в живых только клетки с выраженными пейсмеркерподобными свойствами. Нарушение клеточного распределения интегринов- v и сверхрегуляция интегрин-3 коррелируют с ростом и выживанием эмбриональных пейсмеркерных клеток на ранней стадии дифференцировки. Однако интегрин-3 требуется для специализации, терминальной дифференцировки и проявления специфических кардиальных фенотипов у эмбриональных клеток (Fassler et al., 1996; Guan et al., 2001).

1.3.3. Роль внутриклеточного кальция в регуляции пролиферации и дифференцировки ЭСК в КМЦ

Кальцийзависимые протеины в процессе регуляции пролиферации и дифференцирования ЭСК в кардиомиоциты стали использоваться относительно недавно. Так, было показано, что калретикулин способен воздействовать на разнообразные функции клеток, включая регуляцию кальциевого гомеостаза, синтеза и транспорта ионных каналов, поверхностных рецепторов, интегринов, транспортеров. Часто эти эффекты связаны с взаимодействием цитоплазматических доменов интегриновых рецепторов (Coppolino et al., 1997). Снижение калретикулина в системе *in vivo* заметно снижает формирование сердечной ткани и повышает апоптоз КМЦ. В культуре ткани *in vitro* дефицит данного белка приводит к ухудшению клеточной адгезии и дифференцировки ЭСК в кардиомиоциты. Кроме того, снижается количество клеток, способных к сокращению в эмбриональных тельцах (Rauch et al., 2000). Однако механизм вышеописанных феноменов остается неясным и требует более детального исследования. Сердечный риаудиновый рецептор (PP) играет важную роль в регуляции уровня кальция в цитозолях КМЦ через специальные каналы. Они появляются на самых ранних стадиях развития миокарда и отвечают за способность его к сокращению. Выключение данного гена приводит к кальцийопосредованной гибели плода у мышей на 10-е сутки развития (Takeshima et al., 1998). ЭСК от таких животных, наряду с ускоренной дифференцировкой их в КМЦ, проявляют низкую сократительную способность. Кроме того, у них нарушен процесс диастолической деполяризации клеток. Предполагается, что регуляция внутриклеточного уровня кальция в КМЦ через PP предотвращает увеличение частоты сер-

дцебиения выше предельного уровня и неадекватную перфузию крови в сердечно-сосудистой системе (Bogdanov et al., 2001; Yang et al., 2002).

В недавнем исследовании (Harvard Medical School) скринингу подверглись 880 биологически активных веществ на предмет индукции дифференцировки ЭСК в кардиомиоциты. ЭСК предварительно были трансфицированы ген-конструкцией, содержащей сердечный тканеспецифичный промотор и ген флюоресцентного зелёного белка. То есть при образовании кардиомиоцитов клетки начинали светиться зелёным светом в флюоресцентном микроскопе. Оказалось, что только аскорбиновая кислота (витамин С) дает максимальное число светящихся клеток, т.е. кардиомиоцитов. Эти клетки ритмично сокращались и экспрессировали кардиомиоцитарные маркёры.

1.4. ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ЭСК В МЕДИЦИНЕ И КАРДИОЛОГИИ

Все вышеперечисленные данные об удивительных свойствах ЭСК позволили некоторым ученым выделить ряд основных направлений клеточной терапии, среди которых можно указать:

1. Восстановление поврежденных тканей и органов, в том числе миокарда, проводящей системы и сосудов.
2. В репродукционной медицине.
3. В биотехнологии при создании новых лекарственных препаратов, гормонов, ростовых факторов и т.п.
4. В токсикологии и радиологии.
5. В геронтологии и биологии развития человека и животных.

Как отмечает В.С. Репин (2000), способность "ЭСК к неограниченной пролиферации и вторичной дифференцировке в культуре только начинает использоваться для создания нового "биосырья" для трансплантации взамен донорских органов и фетальной ткани. Потребности медицины в новом биосырье практически неограниченны: только 10–20% людей вылечиваются благодаря удачной пересадке органа, 70–80% людей погибают без лечения на листе ожидания операции".

На практике, как отмечает Т. Thomson (2000), только в США выделены ЭСК из более 60 генетических различных бластоцист. Теоретически, если удастся разработать адекватные и воспроизводимые методы получения из них клеточных линий с направ-

ленной дифференцировкой, с созданием соответствующего клеточного банка, то практическое применение ЭСК для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы, дегенеративных заболеваний, иммунодефицитов, травм и др. станет реальностью (Вермель, 2004).

Обнаруженный факт превращения ЭСК в кардиомиоциты представляет собой существенный прогресс в кардиологии. Эти клетки могут стать потенциальным источником лечения инфаркта миокарда, кардиосклероза, сердечной недостаточности, пороков сердца, повреждений сосудов и т.п.

Однако без генетических манипуляций, как уже отмечалось, процент превращения ЭСК в кардиомиоциты остается невысоким. Кроме того, для ЭСК, в отличие от мезенхимальных СК, характерна высокая доля образования пейсмекерных клеток, что увеличивает риск формирования очагов экстрасистолии. ЭСК способны сливаться с кардиомиоцитами, формируя химерные клетки. Хорошо это или плохо с патогенетических позиций – остается неясным.

Еще одним недостатком является то, что ЭСК, благодаря высокому дифференцировочному потенциалу, могут легко дифференцироваться в другие типы клеток, например в фибробласты, жировые клетки, гладкомышечные элементы и т.д., что снижает их терапевтическое воздействие.

Несмотря на низкую антигенную активность, их способность проявлять после дифференцировки в зрелые клетки иммунные свойства донора может привести к развитию реакции отторжения или, напротив, формированию РТПХ.

Работа с ЭСК связана с этическими и религиозными аспектами, т.к. она проводится на человеческих эмбрионах, пусть даже на самых ранних стадиях их развития.

Однако главным негативным моментом является то, что они могут превращаться в опухолевые клетки, например, типа тератокариномы.

Тем не менее, при решении всех перечисленных проблем, ЭСК остаются достаточно перспективным, многообещающим материалом, который в настоящее время требует дальнейшего, более глубокого исследования.

ГЛАВА 2

МЕЗЕНХИМОПОЭЗ. СИСТЕМА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

2.1. МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТЕЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Основоположителем учения о мезенхимальных стволовых клетках считается наш соотечественник А.Я. Фриденштейн, который в начале 70-х гг. прошлого века открыл популяцию костномозговых негемопоэтических клеток, которые в культуре ткани формировали так называемые колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕф). В его лаборатории было установлено, что данная популяция родоначальных клеток обнаруживается не только в костном мозге, но и в лимфоидных органах. Часть из них способна к циркуляции (Фриденштейн, Лалыкина, 1973; Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А., 1980).

Мезенхимальные клетки являются примордиальными клетками мезодермальной природы, формирующими систему соединительной ткани организма. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) дают начало в эмбриогенезе и постнатальном периоде фибробластам, кардиомиоцитам, скелетной и гладкомышечной мускулатуре, остеобластам, хондроцитам, адипоцитам, эндотелиальным клеткам и стромальным элементам, формирующим гемопозиндуцирующее микроокружение (ГИМ). Их количество в костном мозге обычно варьирует в пределах $(1-5) \times 10^6$, которое с возрастом уменьшается (Чертков, Гуревич, 1984; Bianco et al., 1999, 2000). Они имеют фенотип $CD\ 13^+$, 29^+ , 44^+ , 105^+ , 14^- , 16^- , 34^- , 45^- , 56^- , 104^- , 106^- , $c-kit^-$, проявляют антиген для стволовых клеток, не экспрессируют антигены гистосовместимости I-HLA и HLA-DR и (Reyes et al., 2001). МСК экспрессируют гены для интерлейкинов-11, -15, -27 (ИЛ-11, -15, -27) и рецепторов для

ИЛ-10, -13, -17, фактора некроза опухоли β (ФНО- β) и костимулирующие молекулы для Т-клеток типа CD80 и CD86 (Wilson et al., 2003; Sun et al., 2003). Около 66% МСК человека в обычных условиях находятся в G₁ фазе клеточного цикла (Rangappa et al., 2003). Следует подчеркнуть, что мультипотентностью во взрослом организме обладают не только МСК, но и другие типы СК, например, нейральные и эпителиальные (табл. 2.1). Кроме того, существует класс более дифференцированных СК, которые могут определяться в отдельных органах и тканях, которые обладают низким дифференцировочным потенциалом, и их роль, очевидно, ограничивается самоподдержанием. В частности, речь идет о сателлитных мышечных клетках, овальных клетках в печени, клетках-предшественниках в базальном слое роговицы и т.д. (Bianco et al., 2001; Dennis, Charbord, 2002).

Кроме того, не исключено, что в костном мозге могут находиться еще более примитивные СК, способные к более 80 удвоениям в культуре ткани и дифференцирующиеся не только в клетки мезенхимальной линии, но и в эндотелиальные и эндодермальные прекурсоры, в частности, с формированием печеночных и эпителиоидных клеток (Schwartz et al., 2002; Reyes et al., 2001, 2002).

Таблица 2.1

Основные типы мультилинейных стволовых клеток, определяемых во взрослом организме

Тип стволовых клеток	Локализация	Путь дифференцировки
Мезенхимальные СК	Костный мозг, жировая ткань	Кардиомиоциты, миоциты, гладкомышечные клетки, астроглия, костная, хрящевая, стромальная ткани. Нервные клетки, эндотелий
Кроветворные СК	Костный мозг, селезенка (грызуны)	Эритроциты, гранулоциты, моноциты-макрофаги, остеокласты, клетки Купфера, лимфоциты, тромбоциты
Нейральные СК	Головной мозг, кожа	Нейроны, астроциты, олиго-дендроциты, клетки крови
Эпителиальные СК	Кожа, эпидермис	Все типы клеток в эпителиальных криптах, все типы клеток эпидермального слоя
Печёночные стволовые клетки	Печень	Гепатоциты, эпителий желчных протоков, кишечный эпителий, клетки поджелудочной железы, миоциты
Дермальные стволовые клетки	Кожа, слизистые	Нейроны, глия, гладкие миоциты, адипоциты

Интересно, что если МСК костного мозга взрослого организма ввести в раннюю бластоцисту, то из них образуются практически все типы соматических клеток. Более того, при трансплантации в организм облученных животных из них формируются не только мезенхимальные ткани, но и кроветворные, эпителиоидные, легочные, желудочно-кишечные, нейро-эктодермальные элементы (Bianco et al., 1999; Kopen et al., 2000; Iang et al., 2002). Все это делает МСК идеальным источником стволовых клеток для проведения клеточной терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы.

В настоящем разделе мы остановимся только на классе мезенхимальных (мезенхимных) стволовых клеток костного мозга. Это продиктовано тем, что данная категория прогенераторных клеток наиболее изучена по отношению их морфофункциональных свойств, фенотипу, способности к коммитированию, пролиферации, дифференцировке в направлении кардиомиогенеза, ангиогенеза, фиброгенеза и других линий тканей, принимающих участие в механизмах адаптации и восстановления поврежденных структур сердца (Kopen et al., 1999; Reyes et al., 1999; Makino et al., 1999; Toma et al., 1999; Weissmann et al., 2000; Dennis, Charbord, 2002).

Главными функциями МСК костного мозга являются:

1. Формирование, гемопозиндуцирующего микроокружения (ГИМ).
2. Формирование стромального микроокружения (СМ).
3. Участие в морфогенезе.
4. Самоподдержание и восстановление пула МСК.
5. Участие в гомеостатических реакциях организма и в процессах регенерации, репарации и адаптации системы мезенхимальных клеток (костный мозг, мышечной, костной, хрящевой и др. тканей) в норме и патологии.

С филогенетических позиций мезенхимальные клетки появляются раньше, чем кроветворная и сосудистая системы, по видимому, во время появления группы животных, лишенных крови и полостных жидкостей, таких как губки, кишечнополостные и плоские черви (Махимов, 1927; Заварзин, 1953; Otkreyjd, 1977). У губок они представляют так называемые амебоциты, располагающиеся в мезоглее и обладающие полифункциональными свойствами (Хадорн, Венер, 1989). Амебоциты иглокожих при контакте с различными поверхностями обладают способностью уплощаться и формировать однородный синцитий. Кроме

того, они могут формировать многоклеточные агрегаты и много-ядерные симпласты (Заварзин, 1985; Новицкий и др., 1997).

Следует подчеркнуть, что миграция МСК из костного мозга в органы в большинстве случаев происходит только тогда, когда происходит опустошение (истощение) в периферическом компартменте системы МСК или при повреждении ткани. Такой процесс наблюдается при переломах костей, повреждении мышечной ткани (Шахов и др., 2003; Ferrari et al., 1998). В обычных условиях процессы физиологической регенерации в этих тканях, очевидно, не требуют дополнительного притока МСК из центрального органа и осуществляются за счет собственных резервов. Несколько иная ситуация разыгрывается в миокарде при его повреждении, т.к. в нем отсутствуют МСК. Более детально эта проблема будет рассмотрена в главе 3.

Синонимами обозначения МСК могут выступать такие термины как КОЕф, мезенхимальные прогениторные клетки, костномозговые стромальные клетки, мультипотентные стволовые клетки костного мозга, мезенхимные или мезодермальные СК (Conget, Minguell, 1999; Minguell et al., 2001; Dennis J., Charbord, 2002). Большинство названий отражает скорее смысловую, нежели функциональную сторону вопроса. В нашей работе мы будем использовать термины "мезенхимальные стволовые клетки", "мезенхимопозз", "система мезенхимальных клеток".

В жидкой культуре костного мозга с низкой плотностью клеток МСК формируют колонии, состоящие преимущественно из фибробластоподобных клеток разной степени зрелости (Фриденштейн, Лалыкина, 1973; Fridenstein et al., 1976; Castro-Malaspina et al., 1980). Исследование клеточного цикла показало, что только 10% клеток в мезенхимальных колониях участвует в процессах пролиферации (фазы: $S+G_2+M$). Большинство фибробластоподобных элементов находится в состоянии покоя (фазы: G_0/G_1). В свою очередь, на основании анализа ДНК и РНК, а также характера культивирования было установлено, что покоящиеся МСК представляют собой неоднородную группу. Часть из них, по-видимому, встала на путь коммитирования и дифференцировки в том или ином направлении (Tamir et al., 2000). Гетерогенность клеток, входящих в состав колоний, отчетливо проявляется по отношению к их пролиферативной активности. Так, одни МСК способны к 3–4 удвоениям, тогда как другие – к 15 и более (Bruder et al., 1997; Digirolamo et al., 1999; Phinney et al., 1999). Многие авторы подчеркивают, что такой разноречивой в полученной информации может быть вызван не только функцио-

нальными особенностями МСК, но и техникой выделения, культивирования клеток, состоянием донора и его возрастом, наличием той или иной патологии и т.п. (Blazsek et al., 1999; Koc et al., 1999; Galotto et al., 1999).

В процессе культивирования МСК, как правило, сохраняют свой кариотип и теломеразную активность. В отличие от кроветворных стволовых клеток, мезенхимальные МСК не несут на своей поверхности рецепторы CD45⁺, CD-34⁺ и CD-14⁺ (Conget et al., 1999; Pittenger et al., 1999).

Основные функциональные и фенотипические характеристики МСК представлены в таблице 2.2.

МСК формируют достаточно динамичную систему в костном мозге, состоящую из дифференцированных фибробластов, ретикулярных клеток, эндотелия, компонентов экстрацеллюлярного матрикса, цитокинов. При этом взаимодействие между собой и с другими клетками осуществляется через специфические рецепторы и молекулы адгезии (табл. 2.2) (Klein, 1995; Reese et al., 1999; Cheng et al., 2000). Особенно важным в этом процессе является экспрессия CD44 антигена. Трансмембранный протеин CD44 представляет собой рецептор для различных лигандов, таких как гиалуран и остеопонтин. Эти рецепторные взаимодействия, по-видимому, могут играть важную роль в пространственной организации межклеточного материала не только в костном

Таблица 2.2

Основные функциональные и фенотипические характеристики костномозговых МСК (по J. Minguell et al., 1999, с дополнениями)

Тип маркерных молекул или факторов	Характеристика, тип
Специфические антигены	SH2, SH3, SH4 STRO-1 α -актин гладких мышц MAB1740
Продуцируемые цитокины и ростовые факторы	Интерлейкины: 1 α , 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15; ЛИФ, ФСК, Flt-3, лиганды для ГМ-КСФ, Г-КСФ, М-КСФ
Рецепторы для цитокинов и ростовых факторов	ИЛ-1, 3, 4, 6, 7; ЛИФ, ФСК, Г-КСФ, ИФ γ , ФНО-2, ТФР-I α , ТФР-II α , β -ФРФ, ЭПФР, ФРВТ
Молекулы адгезии	Интегрины: α vB3, α vB5; Интегриновые ветви: 1 α , 2 α , 3 α , 4 α , 5 α , v α , B1, B3, B4 ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM-1, LFA-3, L-селектин, эндоглин, CD44
Молекулы экстрацеллюлярного матрикса	Коллаген-типы: I, III, IV, V, VI, фибронектин, ламинин, гиалуоновая кислота, протеогликаны

мозге, но и в костной ткани (Minguell, 1993; Yamazaki et al., 1999).

С помощью культуральных методов был выявлен ряд факторов, способных вызвать дифференцировку МСК в том или ином направлении (табл. 2.2). Следует подчеркнуть, что ни в одном исследовании (кроме опытов с трансфекцией специфических кардиомиогенных генов) не удалось вызвать перепрограммирование данной категории СК, превышающей 40–60%. Более подробно эти вопросы будут рассмотрены ниже, в главе 3.

Когда культуры костномозговых МСК исследуют по отношению их пролиферативного статуса, то часто выявляется их неоднородность. Так, D. Colter et al. (2000) показали, что в культуре ткани обнаруживается так называемый некоммитированный пул МСК (МСКн). МСКн представлены незначительным количеством малых и агранулярных клеток с низкой способностью к формированию колоний и не реагирующих на специфический Ki-67 антиген клеточного цикла, которые отличаются от более дифференцированных (коммитированных) МСК низкой пролиферативной активностью. Число покоящихся МСКн в культуре ткани обычно не превышает 1%. Они вступают на путь коммитирования и дифференцировки под продолжительным действием эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и зависят от присутствия фактора роста фибробластов 2-го типа (ФРФ-2) (Kagawachi et al., 2000). МСКн практически не чувствительны к антиметаболиту – 5-фторурацилу, не несут маркеров, характерных для остеогенных, адипогенных клеток, имеют низкое содержание РНК и высокий уровень экспрессии гена для ODC, что указывает на непролиферативный статус клетки (Berardi et al., 1995; Juan, Darzynkiewicz, 1998; Iwata et al., 1999). Логично предположить, что между различными субпопуляциями МСК существует тесная взаимосвязь. Очевидно, что более примитивные прогениторные клетки, к которым можно отнести пул МСКн, являются базовым звеном, обеспечивающим самоподдержание стволовых клеток в костном мозге на постоянном уровне и слабо реагирующим на факторы активации и супрессии. Более дифференцированные МСК обеспечивают пластичность и адекватный ответ на действие экстремальных факторов. Ряд авторов считает, что такое взаимодействие регулируется по аутокринному механизму (Colter et al., 2000). Однако прямых данных, подтверждающих или опровергающих это предположение, нет.

Следует подчеркнуть, что доказательства существования МСКн получены в основном при изучении клональных культур

костного мозга *in vitro*. Несмотря на все успехи, еще предстоит выяснить, имеются ли в целостном организме человека аналогии МСКн (Castro-Malaspina et al., 1980). Это чрезвычайно трудная задача, т.к. количество "обычных", коммитированных МСК в костном мозге не превышает $(1-5) \times 10^6$, тогда как для МСКн это количество, согласно культуральным исследованиям, еще меньше и не должно превышать величину $(0,1-1) \times 10^7$.

2.2. КОММИТИРОВАННЫЕ МСК КОСТНОГО МОЗГА (МСКк)

Как уже было сказано, в культуре костного мозга наряду с пулом МСКн существует более многочисленная категория, обладающая высоким пролиферативным потенциалом, которую можно отнести к коммитированным МСК (МСКк). Эти прогенираторные клетки также не являются однородными. Условно среди них можно выделить СК, способные дифференцироваться в:

- а) кардиомиоциты, скелетные миоциты, гладкомышечные миоциты, остеоциты, хондроциты и адипоциты;
- б) остеоциты, хондроциты и адипоциты;
- в) остеоциты и адипоциты или хондроциты и адипоциты;
- г) эндотелиоидные клетки.

Дифференцировки МСКк в том или ином направлении в системе *in vitro* можно добиться путем добавления индукторов и супрессоров. Так, например, остеогенную дифференцировку можно вызвать при добавлении в культуру β -глицерофосфата и аскорбиновой кислоты, адипогенез — за счет введения дексаметазона, изобутилметилксантиана и метиндола. Хондрогенез стимулируют трансформирующим фактором роста- α (ТФР- α), миогенез и кардиомиогенез — аскорбиновой кислотой, дексаметазоном и 5-азациитидином (табл. 2.3).

Таким образом, мезенхимопоэз на уровне коммитированных МСК представляет собой сложный многоступенчатый процесс постепенного ограничения пролиферативной и дифференцировочной способности прогенираторных клеток. По мере продвижения исходных клеток к конечному фенотипу, они, с одной стороны, теряют способность к самовосстановлению и, с другой, — усиливают процессы дифференцировки (Potten, 1986; Beresford et al., 1992; Dennis, Caplan, 1996; Nicok et al., 1998; Rao, Dravid, 1999).

Большинство исследователей придерживаются мнения, что коммитирование, пролиферация, дифференцировка и созревание

Таблица 2.3

Активаторы и супрессоры, влияющие на дифференцировку МСК в системе *in vitro*

Путь дифференцировки	Активаторы	Супрессоры	Фенотипические маркеры:	
			молекулярные	клеточные
Кардиомиоциты, мышечные клетки, гладкомышечные клетки	GATA-4,5,6, MEF-2C; ВТЕВ-2, С, 5-азацитидин, витамин ДМСО, дексаметазон		MyoD Myf 5 и 6 MEF-2, миогенин, n MRF4	Сокращающиеся клетки
Адиipoциты	PPAR- γ 2; C/EBP- α /, дексаметазон, изобутилметаксантин, инсулин, индометацин	wnt-10b; GATA-2	PPAR- γ 2, C/EBP β , адипсин, лептин, липаза	Липидные вакуоли в цитоплазме
Хондроциты	Sox-9, ТФР- β , аскорбиновая кислота	NFAT-p	Cbfa-1, аттрикан	Матрикс из коллагена-II, IX типов
Остеобласты	Cbfa-1, МБК-2, дексаметазон, витамин С, В-глицерофосфат	PPAR- γ 2	Остеопонтин, остекальцин, щелочная фосфатаза, Cbfa-1	Коллаген-I и III типов

Примечание: Cbfa-1 – основной связывающий фактор A1; PPAR- γ 2 – пероксисомный активизированный рецептор пролифератор 2 γ ; C/EBP- α / β – фактор, связывающий протеин α / β ; NFAT-p – ядерный Т-фактор активации; MEF-2C – миоцит-специфический связывающий фактор-2C; ВТЕВ-2 – основной транскрипторный регуляторный элемент, связывающий белок, МБК – морфогенетический белок кости.

любых типов СК, включая и мезенхимальные, зависят от интегрального действия разнообразных факторов, формирующих стромальное индуцирующее микроокружение. Исходя из этого посыла, ряд авторов пытается построить иерархическую структуру мезенхимальных клеток как для обычных, так и экстремальных условий (Карлов, Шахов, 2001; Caplan, 1995; Fukushima, Ohkawa, 1995; Bach et al., 2000) (рис. 2.1). Первые попытки схематично изобразить иерархическую структуру развития МСК были предприняты в 1995 г., когда А. Caplan предложил "гипотезу мезенгенного процесса". Вслед за этим последовал ряд моделей, большинство из которых предполагали наличие иерархической структуры для так называемых исходных остеогенных клеток, принимающих участие в процессе развития костных клеток

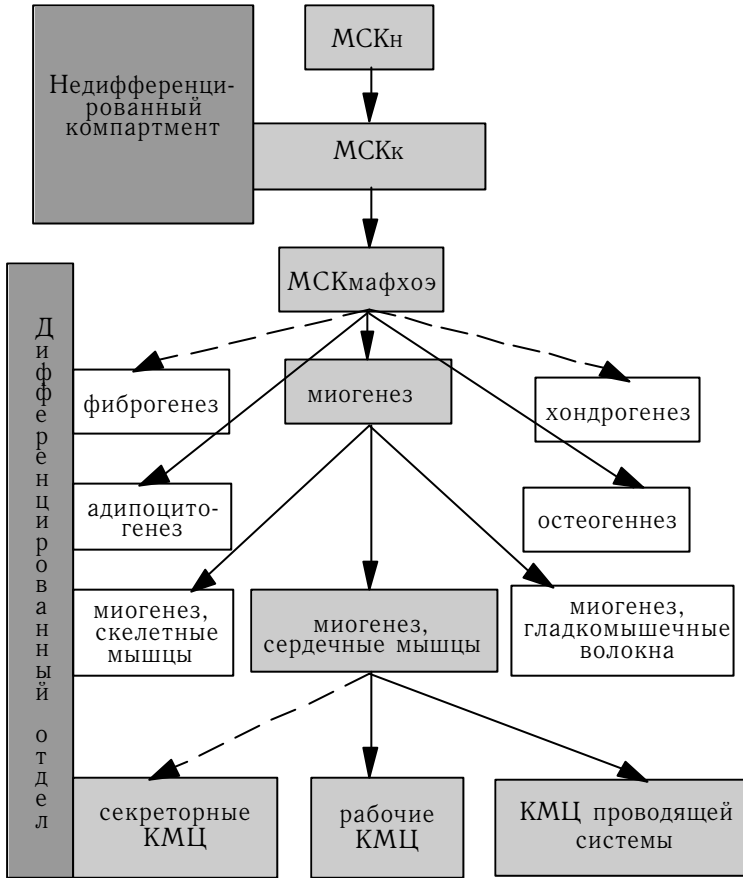


Рис. 2.1. Иерархическая модель мезенхимопоэза в направлении образования кардиомиоцитов: МСКн(к) – некоммитированные (коммитированные мезенхимальные стволовые клетки), МСКмафхоэ – мезенхимальные, поли-, тетра-, три-, би-, унипотентные стволовые клетки, способные формировать миоциты, адипоциты, фибробласты, хондроциты, остеогенные и эндотелиальные клетки, КМЦ – кардиомиоциты

(Haynesworth et al., 1992; Gronthos et al., 1999; Bordinon et al., 1999). Основным недостатком иерархической модели мезенхимопоэза является то, что многие цитокины, ростовые и диф-

ференцирующие факторы, активаторы, супрессоры и ингибиторы, действующие на уровне МСК, пока еще не определены. Кроме того, пластичность МСК, их способность изменять свой фенотип в зависимости от обстоятельств, а также отсутствие надежных генов-маркеров для МСКн или МСКк и их дифференцированных потомков достаточно трудно объяснить с вышеуказанных позиций (Minguell et al., 2001).

2.3. СПОСОБНОСТЬ КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ ФОРМИРОВАТЬ КОЛОНИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В СИСТЕМЕ IN VITRO

Для определения общего количества МСК, формирующих колониобразующие единицы фибробластов (КОЕф), была использована техника А.Я. Фриденштейна (1977) с некоторыми модификациями. Опыты были проведены на 55 мышах-гибридах F₁ (СВАхС57В1/6) обоего пола, массой 18–20 г. Кроме того, использовали клетки костного мозга самцов крыс породы Вистар, массой 150–160 г. У животных из бедренной кости вымывали костный мозг полной средой, состоящей из 90% среды DI-MEM "Sigma", 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) "Sigma", 280 мг/л L-глутамина "Merck", 10⁻⁶ М дексаметазона "Sigma", 100 ЕД/мл пенициллина "Sigma", 100 мкг/мл стрептомицина "Sigma". Клеточность жизнеспособных клеток доводили до (0,1–10)×10⁶/мл и разливали по 10 мл в 50-мл флаконы "Orange Scientific". Клетки культивировали в течение 2–4 недель при 37 °С, 100% влажности и 5% CO₂. Через 3 суток неприлипшие клетки собирали вместе с надосадочной средой и замещали новой порцией полной среды. Замену среды проводили через 4–6 суток. В течение всех сроков культивирования готовили препараты клеток для цитологических (азур II-эозин), цитохимических (на щелочную фосфатазу, α-нафтилацетат эстеразу, ализариновый красный О) и иммуноферментных анализов. Под колониями (КОЕф) подразумевали клеточные агрегаты, содержащие более 50 клеток (Гольдберг и др., 1992).

В результате проведенных исследований было установлено, что адгезирующие клетки костного мозга к 5–6-м суткам формируют колонии, содержащие округлые клетки (рис. 2.3, 2.4), которые к 12–14-м суткам превращаются в фибробластоподобные и иные элементы (рис. 2.2, 2.5, 2.7).

Так, на 14–18-е сутки клетки дифференцировались в фибробластоподобные, миоцитоподобные, ретикулярные, хондрогенные, ос-

Таблица 2.4

Зависимость между количеством вводимых костномозговых клеток мышей гибридов F_1 (CBAx57Bl/6) и числом выросших из них фибробластоподобных колоний

N/N, группы	Количество вводимых клеток, $\times 10^6$	Количество КОЕф в первичной культуре	Количество рекультивированных клеток, $\times 10^3$	Количество КОЕф во вторичной культуре
1	0,1	$7,1 \pm 0,3$	10	$5,5 \pm 1,2$
2	0,5	$14,5 \pm 1,9$	20	$8,9 \pm 2,3$
3	1,0	$30,3 \pm 4,1^*$	40	$17,3 \pm 3,3^*$
4	2,0	$50,2 \pm 7,7^*$	80	$29,3 \pm 5,5^*$

Примечание: * – обозначены достоверные значения ($P < 0,05$) по сравнению с 1-й группой.

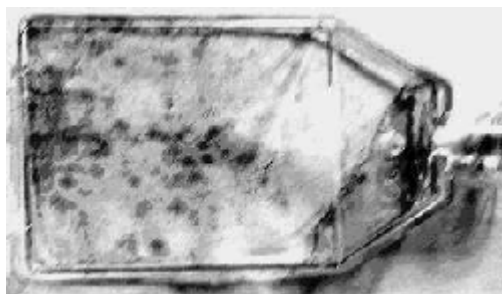


Рис. 2.2. Многочисленные макроколонии, выросшие на 14-е сутки культивирования клеток костного мозга мыши F_1 (CBAx57Bl/6). Окраска азур II-эозином

теогенные, адипоцитогенные, эндотелиоидные и другие элементы, что соответствует данным других авторов (Фриденштейн, Лурия, 1980; Bianco et al., 2000, 2002). Некоторые типы клеток представлены на рис. 2.6–2.10.

Часть клеточного материала после 14 суток инкубации диссоциировали с помощью раствора трипсина и версена, реже с помощью коллагеназы и проназы и переносили в новые флаконы и культивировали еще 14 дней. Эффективность клонирования КОЕф представлена в табл. 2.4 и на рис. 2.11 (КОЕф).

У людей костный мозг получали путем аспирации его из подвздошной кости. После чего материал переносили в центрифуж-

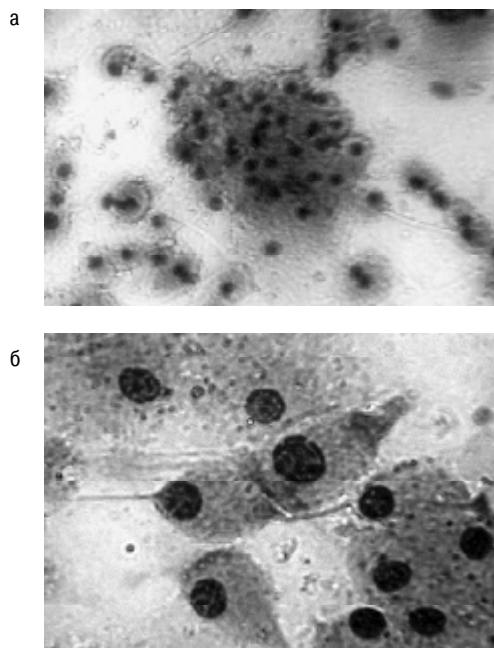


Рис. 2.3. Незрелая мезенхимальная колония (а, ув. 400х) и ее фрагмент (б, ув. 900х), выросшая на 7-е сутки культивирования клеток костного мозга мыши F_1 (СВАхС57Вl/6), окраска азур II-эозином

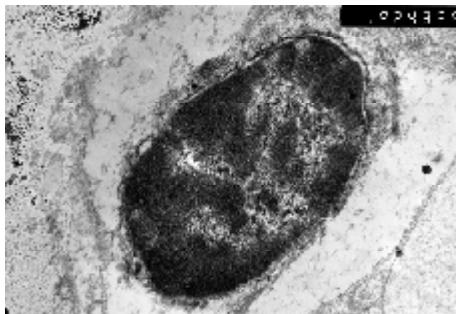


Рис. 2.4. Электронная микроскопия "округлой" клетки, выросшей на 7-е сутки культивирования клеток костного мозга мыши F_1 (СВАхС57Вl/6), ув. 19200х

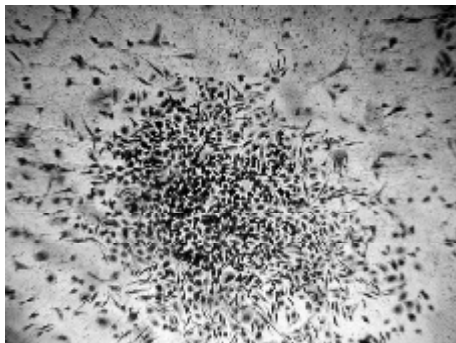


Рис. 2.5 Зрелая колония, состоящая из многочисленных фибробластоподобных клеток, выросшая при культивировании костного мозга мыши $F_1(\text{CBA} \times \text{C57Bl}/_6)$, ув. 100х, окраска азур II-эозином

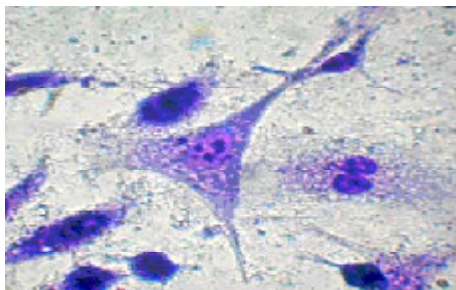


Рис. 2.6. Ретикулярная клетка, обнаруженная в культуре ткани костного мозга мыши $F_1(\text{CBA} \times \text{C57Bl}/_6)$ на 14-е сутки, ув. 900х, окраска азур II-эозином

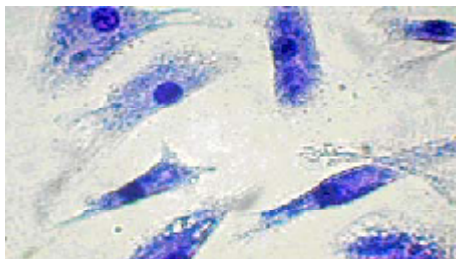


Рис. 2.7. Фибробластоподобные клетки, выявленные в культуре ткани костного мозга крысы породы Вистар на 14-е сутки, ув. 900х, окраска азур II-эозином

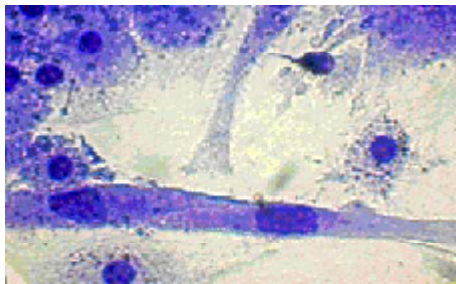


Рис. 2.8. Эндотелиоидные клетки, обнаруженные в культуре ткани костного мозга мыши $F_1(CBA \times C57Bl/6)$ на 12-е сутки, ув. 900х, окраска азур II-эозином



Рис. 2.9. Миоцитоподобные клетки, обнаруженные в культуре ткани костного мозга мыши $F_1(CBA \times C57Bl/6)$ на 14-е сутки, ув. 900х, окраска азур II-эозином

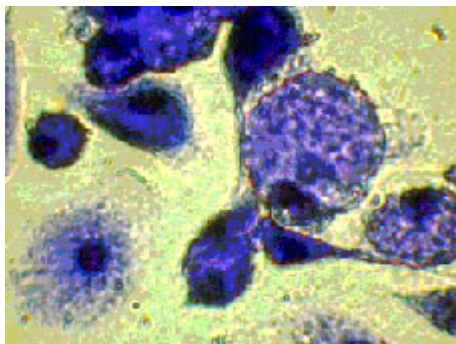


Рис. 2.10. Адипоциты, обнаруженные в культуре ткани костного мозга мыши $F_1(CBA \times C57Bl/6)$ на 14-е сутки, ув. 600х, окраска азур II-эозином

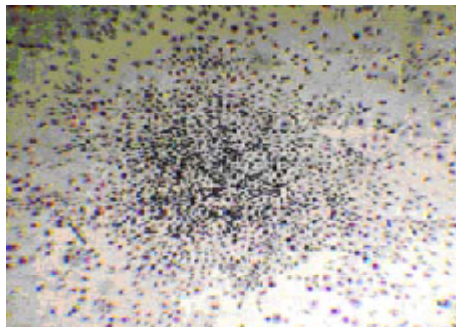


Рис. 2.11. Колония фибробластоподобных клеток, выросшая при пересеве культуры фибробластов костного мозга мыши F_1 (СВАхС57В1/6), на 10-е сутки наблюдений, ув. 100х, окраска азур II-эозином

ные пробирки, содержащие среду RPMI-1640 ("Sigma"), содержащую 1% бычьего сывороточного альбумина ("Sigma") и 100 ЕД/мл гепарина ("Spofa"). После двукратного центрифугирования при 3000 об./мин в течение 10–15 мин при 0 °С и замены на свежую порцию, материал освобождали от эритроцитов путем их лизиса в трис-буфере (Гольдберг и др., 1992). Затем надосадочную жидкость удаляли и замещали полной средой, состоящей из 90% среды D-MEM "Sigma", 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) "Sigma", 280 мг/л L-глутамина "Merck", 10^{-6} М дексаметазона "Sigma", 100 ЕД/мл пенициллина "Sigma", 100 мкг/мл стрептомицина "Sigma". Клеточность жизнеспособных клеток доводили до $(0,5-1) \times 10^6$ /мл и разливали по 10 мл в 50-мл флаконы "Orange Scientific". Клетки культивировали в течение 2–3 недель при 37 °С, 100% влажности и 5% CO_2 . Через 3 суток неприлипшие клетки собирали вместе с надосадочной средой и замещали новой порцией полной среды. Замену среды проводили через 4–6 суток. В течение всех сроков культивирования готовили препараты клеток для цитологических (азур II-эозин), цитохимических (на щелочную фосфатазу, ализариновый красный О) и иммуноферментных анализов. Под колониями (КОЕф) подразумевали клеточные агрегаты, содержащие более 50 клеток (Гольдберг и др., 1992).

Эффективность клонирования КОЕф из костного мозга человека была на 20–40% ниже, чем у мышей, наиболее вероятно — за счет вариабельности материала, разбавления его кровью и по-